

UBND TỈNH LÂM ĐỒNG
TRƯỜNG CAO ĐẲNG ĐÀ LẠT

GIÁO TRÌNH
MÔ ĐUN: CÔNG NGHỆ VI SINH
NGÀNH/: CÔNG NGHỆ SINH HỌC
TRÌNH ĐỘ: CAO ĐẲNG

Ban hành kèm theo Quyết định số: /QĐ-... ngàytháng....
năm.....
..... của

Lâm Đồng, năm 2018

TUYÊN BỐ BẢN QUYỀN

Tài liệu này thuộc loại sách giáo trình nên các nguồn thông tin có thể được phép dùng nguyên bản hoặc trích dùng cho các mục đích về đào tạo và tham khảo.

Mọi mục đích khác mang tính lệch lạc hoặc sử dụng với mục đích kinh doanh thiếu lành mạnh sẽ bị nghiêm cấm.

CHƯƠNG MỞ ĐẦU: GIỚI THIỆU MÔN HỌC

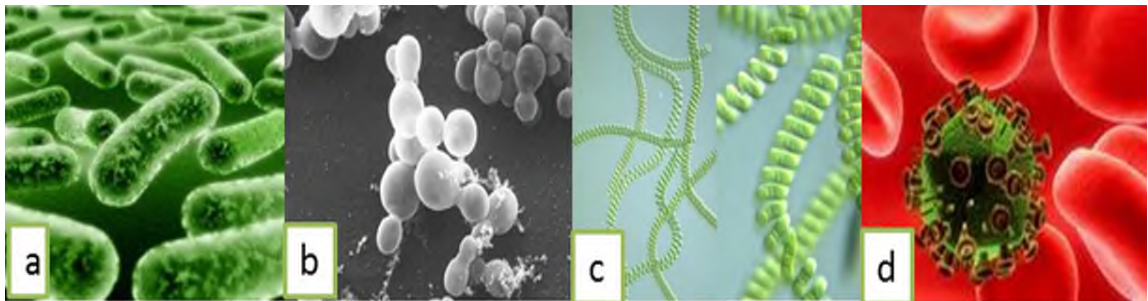
Vi sinh vật học đại cương là môn học cơ sở cung cấp những kiến thức cơ bản cho sinh viên chuyên ngành bảo vệ thực vật. Là cơ sở để sinh viên tiếp thu kiến thức các môn học chuyên ngành như bệnh cây, dinh dưỡng cây trồng. Để học tốt môn vi sinh đại cương, sinh viên cần phải có kiến thức cơ bản về di truyền, sinh học và sinh hóa học đại cương.

1. KHÁI NIỆM VÀ VAI TRÒ CỦA VI SINH VẬT

1.1. KHÁI NIỆM VI SINH VẬT

Vi sinh vật là các sinh vật có kích thước rất nhỏ muốn thấy rõ được chúng người ta phải sử dụng tới kính hiển vi. Vi sinh vật thường đo bằng micromet (μm) hoặc bằng nanomet (nm). Các vi sinh vật thường là đơn bào hoặc đa bào nhưng có cấu trúc đơn giản và rất kém phân hoá. Khác với các tế bào động vật và thực vật, các tế bào vi sinh vật có khả năng sống, phát triển và sinh sản một cách độc lập trong tự nhiên (hình 1.1).

Trong hệ thống phân loại tổng quát, vi sinh vật được chia thành các nhóm là vi sinh vật nhân nguyên thủy (gồm có vi khuẩn, xạ khuẩn, vi khuẩn lam và vi khuẩn nguyên thủy); vi sinh vật nhân thật (gồm có vi nấm, tảo và một số nguyên sinh động vật); và virút (virút là nhóm vi sinh vật đặc biệt chưa có cấu tạo tế bào và là các vi sinh vật có mức độ tiến hoá thấp nhất).



Hình 1.1. Một số vi sinh vật: (a) Vi khuẩn, (b) Nấm men, (c) Tảo lam, (d) Vi rút

Các môn học chuyên sâu thuộc ngành vi sinh vật học được phân chia theo từng nhóm vi sinh vật riêng biệt bao gồm virút học, vi khuẩn học, nấm học, tảo học và ký sinh trùng học. Các chuyên ngành nghiên cứu những tính chất riêng biệt của vi sinh vật bao gồm tế bào học, phân loại học, sinh lý học, sinh hóa học, di truyền học vi sinh vật, v.v. Vi sinh vật học có chuyên ngành ứng dụng ở rất nhiều lĩnh vực như vi sinh học y học, vi sinh học công nghiệp, vi sinh học thực phẩm, vi sinh học thú y, bệnh lý thực vật, vi sinh học đất, vi sinh học nước, vi sinh học không khí, v.v.

1.2 VAI TRÒ CỦA VI SINH VẬT TRONG TỰ NHIÊN VÀ ĐỐI VỚI ĐỜI SỐNG CON NGƯỜI

Vi sinh vật phân bố ở khắp mọi nơi trên trái đất và rất đa dạng về chủng loài. Tuy nhỏ bé nhất trong sinh giới nhưng năng lực hấp thu và chuyển hóa của vi sinh vật vượt xa các sinh vật bậc cao và chúng có tốc độ tăng trưởng và sinh sôi nảy nở

cực kì lớn. Trong quá trình tiến hóa lâu dài vi sinh vật đã tạo cho mình những cơ chế điều hòa trao đổi chất để thích ứng được với những điều kiện sống rất bất lợi. Năng lực thích ứng của vi sinh vật vượt rất xa so với động vật và thực vật. Vi sinh vật rất dễ phát sinh biến dị bởi vì thường là đơn bào, đơn bội, sinh sản nhanh, số lượng nhiều, tiếp xúc trực tiếp với môi trường sống. Do vậy mà vi sinh vật có vai trò quan trọng trong thiên nhiên cũng như trong hoạt động sống của con người.

Trong nông nghiệp, vi sinh vật sống trong đất và trong nước tham gia tích cực vào quá trình phân giải các xác hữu cơ thành CO_2 và các hợp chất vô cơ dùng làm thức ăn cho cây trồng và các sinh vật khác. Các vi sinh vật cố định nitơ thực hiện việc biến khí nitơ trong không khí thành hợp chất nitơ cung cấp cho cây cối. Vi sinh vật còn có khả năng phân giải các hợp chất khó tan chứa P, chứa K, chứa S và tạo ra các vòng tuần hoàn trong tự nhiên. Vi sinh vật tham gia tích cực trong quá trình hình thành chất mùn. Vi sinh vật là nguồn thức ăn tự nhiên quan trọng trong các thủy vực, là thành phần chủ yếu của các chế phẩm sinh học dùng cho việc quản lý môi trường nuôi thủy sản. Một số nhóm vi khuẩn có tác dụng rất lớn trong các hệ thống lọc sinh học.

Trong công nghệ thực phẩm, vi sinh vật là lực lượng sản xuất trực tiếp của công nghiệp lên men. Vi sinh vật sinh ra rất nhiều sản phẩm trao đổi chất khác nhau trong số đó có nhiều sản phẩm đã được sản xuất lớn ở qui mô công nghiệp như men bánh mì, rượu etilic, riboflavin, vitamin B_2 , penixilin, streptomixin, oxitetrasilin...

Trong các nguồn năng lượng mà con người có thể khai thác mạnh mẽ trong tương lai có năng lượng thu từ khối lượng chất sống của vi sinh vật. Vi sinh vật là động lực để vận hành các bể sinh khí sinh học. Vi sinh vật có vai trò quan trọng trong việc phân giải các phế thải nông nghiệp, phế thải đô thị, phế thải công nghiệp chúng đóng vai trò hết sức quan trọng trong việc bảo vệ môi trường.

Tuy nhiên, có không ít các vi sinh vật gây bệnh cho người, gia súc, gia cầm, tôm cá và cây trồng. Một số vi sinh vật gây ô nhiễm môi trường. Một số khác hư hao hoặc biến chất lương thực, thực phẩm, nguyên liệu, vật liệu, hàng hóa hay sản sinh các độc tố

2. NỘI DUNG MÔN HỌC

2.1. Phần lý thuyết: Bao gồm những kiến thức về vi sinh vật, trọng tâm của môn học đi sâu vào những kiến thức về cấu trúc, chức năng và các hoạt động sống của vi sinh vật. Môn học cũng đề cập đến mối quan hệ giữa vi sinh vật với các yếu tố môi trường và vai trò của vi sinh vật trong sản xuất nông nghiệp gồm 4 chương:

Chương 1: Đặc điểm cấu tạo, hình thái của các nhóm vi sinh vật

Chương 2: Quá trình dinh dưỡng của vi sinh vật

Chương 3: Ảnh hưởng của vi điều kiện ngoại cảnh đối với vi sinh vật và sự phân bố của vi sinh vật trong tự nhiên .

Chương 4: Vi sinh vật với các biện pháp kỹ thuật canh tác và quá trình bảo quản nông sản.

2.2. Phần thực hành: Cung cấp những kiến thức hỗ trợ cho phần lý thuyết và cũng là cơ sở để sinh viên tiếp cận các phương pháp cơ bản trong phân tích và

ngiên cứu vi sinh vật dùng trong chuyên ngành bảo vệ thực vật bao gồm 4 nội dung chính

Nội dung 1: Quan sát hình thái vi sinh vật

Nội dung 2: Phương pháp cố định tiêu bản và nhuộm tế bào vi sinh vật.

Nội dung 3: Đo kích thước và đếm số lượng tế bào vi vật

Nội dung 4: Phương pháp pha chế, đồ môi trường; phương pháp lấy mẫu, phân tích vi sinh vật trên cơ chất và kiểm tra kết quả phân tích vi sinh vật trên cơ chất

Chương 1. CÁC NHÓM VI SINH VẬT

1. VIRUT

1.1 LỊCH SỬ PHÁT HIỆN VIRUT

Vào năm 1892, một nhà sinh lí học thực vật người Nga tên là D.Ivanovskii, đã chứng minh mầm bệnh khảm ở thuốc lá sau khi được lọc qua các nền lọc vi khuẩn có kích thước nhỏ nhất vẫn có khả năng lây nhiễm trên các cây thuốc lá khác. Ông cho rằng đó là "độc tố vi khuẩn" hoặc "vi khuẩn cực tiểu".

Đến năm 1898 nhà vi sinh học Hà Lan M.Beijerinck (1851-1931) cũng nghiên cứu một cách độc lập mầm bệnh của bệnh khảm thuốc lá và ông cũng thu được kết quả giống như Ivanovskii. Cùng năm đó F. Loeffler và P. Frosch phát hiện ra virus gây bệnh lở mồm long móng ở bò. Cho đến năm 1909, Landsteiner và Popper chứng minh bệnh bại liệt ở người là do virus gây nên, đây cũng là bệnh virus đầu tiên ở người được biết đến. Nhiều nhà khoa học khác tiếp tục phát hiện ra các virus khác gây ra bệnh sốt vàng ở người (1902), bệnh dại ở gà (1908), bệnh u ở niêm dịch thỏ, bệnh X ở khoai tây... Năm 1915 nhà khoa học Anh F. Twort (1877-1950) và năm 1917 nhà khoa học pháp F. d' herelle phát hiện ra virus ở vi khuẩn đã đặt tên cho loại virus này thể thực khuẩn.

Virus học phát triển rất nhanh kể từ khi kính hiển vi điện tử ra đời năm 1939. Năm 1940 lần đầu tiên nhà khoa học người Đức Kausche và cộng sự chụp được hình dạng của virus gây bệnh khảm trên cây thuốc lá (TMV) dưới kính hiển vi điện tử. Các nhà khoa học đã chứng minh vật chất di truyền ở thể thực khuẩn là ADN, mở đầu cho giai đoạn nghiên cứu sinh học phân tử ở virus (1952). Nhờ các thành tựu mới mẻ nhất trong nghiên cứu kĩ thuật di truyền ở virus mà con người đã làm ra được nhiều loại vaccin phòng bệnh virus hiểm nghèo ở người và gia súc, gia cầm.

1.2 MỘT SỐ ĐẶC CHUNG CỦA VIRUT

Virus thường được gọi là hạt virus vì chúng chưa có cấu tạo tế bào.

Virus chứa những yếu tố di truyền là ADN hay ARN nằm trong một vỏ bọc protein và có thể có các hợp chất khác bao quanh bên ngoài vỏ

Virus sống ký sinh nội bào bắt buộc, vật chủ của virus bao gồm động vật, thực vật và vi khuẩn. Vì vậy virus cũng được phân loại theo vật chủ của tế bào mà chúng ký sinh là virus động vật, virus thực vật và virus vi khuẩn.

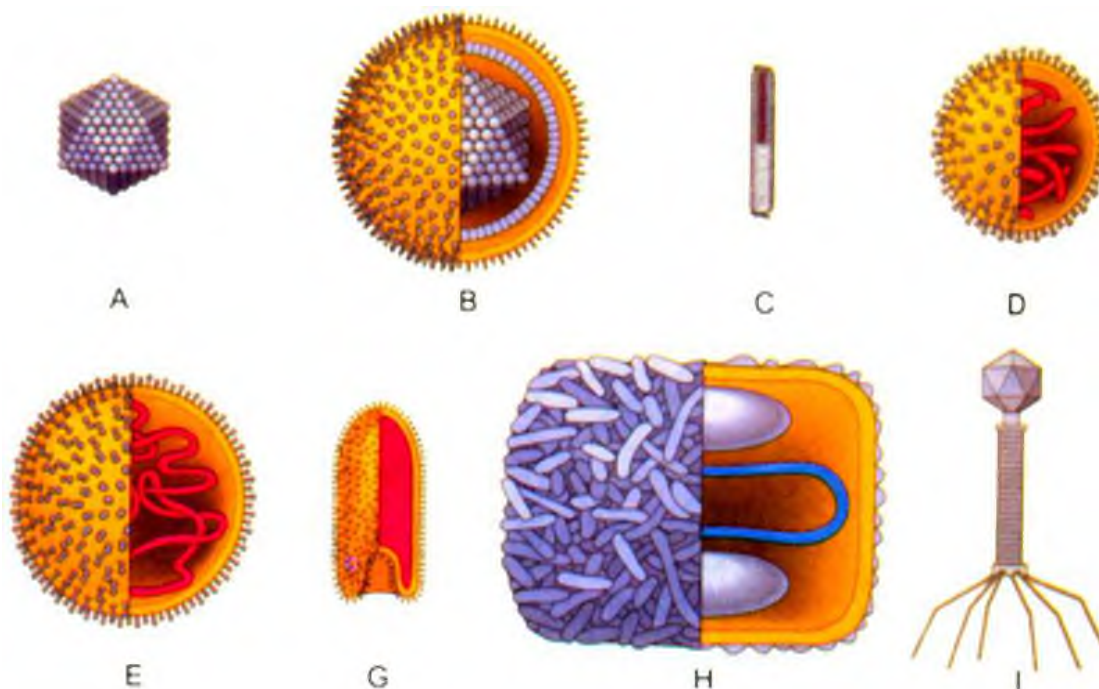
1.3 ĐẶC ĐIỂM HÌNH THÁI CỦA VIRUT

Virus có kích thước rất nhỏ dao động từ 5-300nm ($1\text{nm}=10^{-9}\text{m}$). Muốn quan sát hình thái và đo kích thước virus phải sử dụng kính hiển vi điện tử và các kĩ thuật phụ trợ. Virus có ba dạng chủ yếu là hình khối, hình que và hình hỗn hợp.

Cấu trúc xoắn: Capsom sắp xếp theo hình xoắn của axit nucleic. Cấu trúc xoắn thường làm cho virus có hình que hay hình sợi (virus khảm thuốc lá, virus bệnh dại) nhưng cũng có loại hình cầu (virus cúm, virus sởi).

Cấu trúc khối: Capsôme sắp xếp theo hình khối đa diện với 20 mặt tam giác đều (virut bại liệt).

Cấu trúc hỗn hợp: Có cấu tạo giống con nòng nọc. Đầu có cấu trúc khối chứa axit nucleic



Hình 1.2 . Hình thái của một số virut

Dạng khối: A – Virut bại liệt, mụn cơm ...; B – Virut hecpet, Dạng xoắn; C – Virut đốm thuốc lá; D – Virut cúm; E- Virut sởi, quai bị; G – Virut dại; Dạng hỗn hợp: H – Virut đậu mùa; I – Phagơ T₂

1.4 ĐẶC ĐIỂM CẤU TẠO CỦA VIRUT

Tất cả các virut đều bao gồm hai thành phần cơ bản: Lõi là axitnucleic (bộ gen), vỏ là prôtêin (cap sit) bao bọc bên ngoài.

1.4.1 Axit nucleic (lõi)

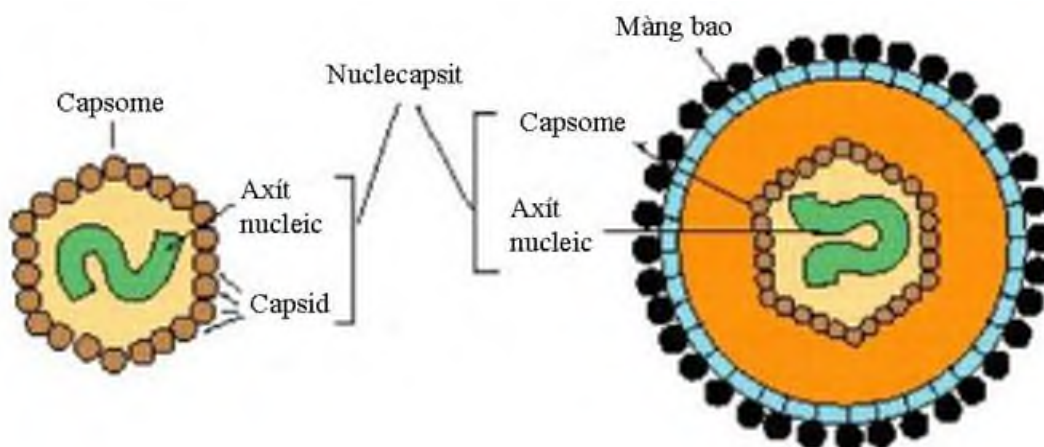
Axit nucleic là cơ sở lưu trữ, tái tạo mọi thông tin di truyền, vì vậy là thành phần quan trọng của mọi virut. Virut có nhiều loại hình axit nucleic và là cơ sở phân tử để phân loại virut. Các loại hình axit nucleic của virut được phân biệt dựa trên mấy điểm chủ yếu sau đây: (I) AND hay ARN, (II) Chuỗi đơn hay chuỗi xoắn kép, (III) Dạng sợi, dạng vòng kín hay dạng vòng hở và (IV) Hệ gen là một, hai hay nhiều thành phần.

1.4.2 Vỏ protein (capsit)

Vỏ capsit được cấu tạo từ các đơn vị prôtêin gọi là capsôme

Một số virut còn có thêm vỏ bao bên ngoài vỏ capsit, gọi là vỏ ngoài. Vỏ ngoài là lớp lipid kép và prôtêin. Trên mặt vỏ ngoài có các gai glycoprôtêin làm nhiệm vụ kháng nguyên giúp virut bám lên tế bào vật chủ gọi là màng bao. Màng bao thường là màng nhân,

màng tế bào chất hoặc là màng của các không bào của vật chủ bị virus cải tạo thành, virus không có vỏ ngoài gọi là virus trần.



**Hình
1.3.
Cấu
tạo
của
virus
1.5.
CHU**

TRÌNH NHÂN LÊN CỦA VIRUS TRONG TẾ BÀO VẬT CHỦ

1.5.1 Ở virus động vật và virus thực vật

Ở virus động vật và virus thực vật, hình thức sao chép có những khác nhau theo từng loại virus, nhưng nhìn chung quá trình sao chép diễn ra qua các giai đoạn như sau:

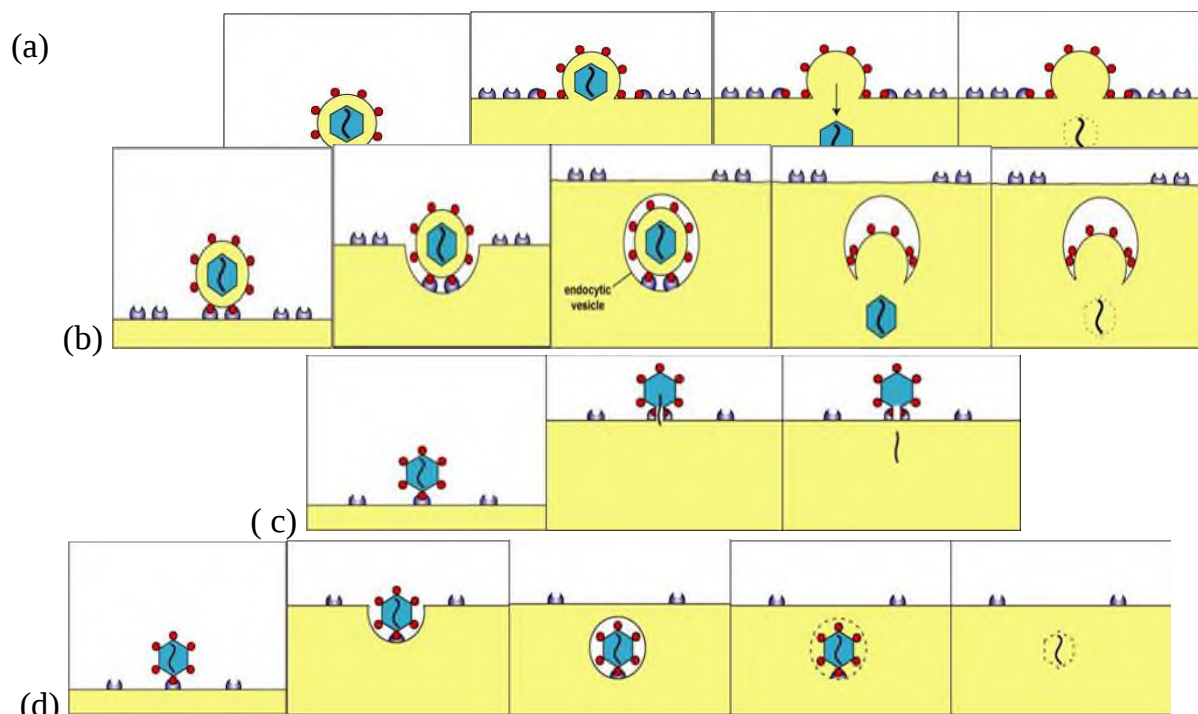
1.5.1.1 Giai đoạn hấp thụ trên bề mặt của tế bào vật chủ

Sự hấp thụ của virus lên bề mặt của tế bào chủ thường xảy ra một cách thụ động, do ngẫu nhiên hay do một tác nhân lan truyền nào đó chứ không phải do virus chủ động. Để virus có thể được hấp thụ, trên bề mặt tế bào của ký chủ phải có các thụ thể phù hợp với loại virus đó và tế bào chủ còn phải có khả năng hỗ trợ cho quá trình sao chép của virus sau đó.

1.5.1.2 Giai đoạn xâm nhập vào bên trong tế bào chủ

Virus có màng bao xâm nhập vào tế bào chủ bằng một trong hai cách: (1) Màng bao của virus kết hợp với màng bao của tế bào chủ tại vị trí của thụ thể và axit nucleic được giải phóng vào trong tế bào chất của tế bào chủ (hình 1.4.a); (2) Virus xâm nhập bằng sự thực bào nhờ màng tế bào chất của tế bào chủ (hình 1.4.b). Màng bao của virus sau đó được cởi bỏ nhờ các enzym và axit nucleic được giải phóng vào trong tế bào chất của tế bào chủ.

Virus không có màng bao cũng xâm nhập vào tế bào chủ bằng một trong hai cách: (1) Capsit của virus kết hợp với màng tế bào chất của tế bào chủ để đưa axit nucleic của virus vào trong tế bào chất của tế bào chủ (hình 1.4.c); (2) Virus xâm nhập bằng sự thực bào nhờ màng tế bào chất của tế bào chủ. Sau đó nhờ các enzym, axit nucleic được giải phóng vào trong tế bào chất của tế bào chủ (hình 1.4.d).



**Hình 1.4 (a&b). Sự xâm nhập của virus không có màng bao;
(c&d) Sự xâm nhập của virus có màng bao**

1.5.1.3 Giai đoạn tổng hợp các thành phần của virus

Quá trình tổng hợp các thành phần của virus được tiến hành nhờ vào hệ thống chuyển hoá trong tế bào chất của tế bào chủ từ các ribosomes, các ARN vận chuyển, các đường chất, năng lượng và các enzym. Hệ gen của virus sẽ được phiên mã thành ARN thông tin và sẽ được ribosom của tế bào chủ giả mã thành protein và enzym của virus. Trong giai đoạn đầu của quá trình sao chép hệ gen của virus được nhân lên hàng ngàn lần. Ở giai đoạn sau, các thành phần cấu trúc của virus như protein lõi và protein vỏ và các enzym của virus được tổng hợp. Cũng trong giai đoạn này, các protein và glycoprotein của virus (trường hợp virus có màng bao) sẽ liên kết vào màng tế bào chất của tế bào chủ

1.5.1.4 Giai đoạn lắp ráp

Ở giai đoạn này các phần của virus lắp ráp lại với nhau tạo thành nucleocapsit. Ở virus có màng bao, các capsit bao lấy các axit nucleic rồi sau đó các nucleocapsit tiến đến gần màng tế bào chất của tế bào chủ để các protein và glycoprotein của virus ở dạng kết hợp với màng nguyên sinh chất của tế bào chủ bao lấy chúng hình thành virus có màng bao hoàn chỉnh. Ở virus không có màng bao, các capsit bao lấy các axit nucleic rồi sau đó các nucleocapsit tiến đến gần màng tế bào chất của tế bào chủ để thoát ra ngoài.

1.5.1.5. Giai đoạn phóng thích

Virut có thể được phóng thích theo một trong ba cách: (1) tế bào chủ sẽ bị vỡ và virut thoát ra ngoài. Trường hợp này thường gặp ở virut không có màng (2) virut tạo màng bao từ màng tế bào chất, màng nhân hoặc các màng khác của tế bào chủ theo phương thức nảy chồi (3) Virut có màng bao thoát ra ngoài bằng sự vận chuyển kết hợp với màng nguyên sinh chất của tế bào chủ. Một số virut sau khi lắp ráp có thể chui từ tế bào này sang tế bào khác mà không cần có sự phóng thích chúng ra ngoài môi trường. Hiện tượng này xảy ra nhờ vào sự tiếp xúc giữa các tế bào bị nhiễm và tế bào không bị nhiễm virut.

1.5.2. Đối với thể thực khuẩn (phage)

Các virut của vi khuẩn cũng có quá trình sinh sản trải qua các giai đoạn giống như ở virut động và thực vật. Các nghiên cứu phage ký sinh ở tế bào vi khuẩn *E. coli* cho thấy chúng có 2 cơ chế sinh sản là: (1) chu trình tan và (2) chu trình tiềm tan. Ở chu trình tan các thể thực khuẩn làm chết tế bào chủ nên gọi là độc. Ở chu trình tiềm tan các virut có thể sinh sản mà không làm chết tế bào chủ nên được gọi là ôn hòa.

1.5.2.1 Các giai đoạn của chu trình tan

(1) Giai đoạn hấp thụ của phage lên bề mặt tế bào vi khuẩn:

Mỗi loại phage chỉ có thể hấp thụ lên bề mặt của một vài dòng của một loài vi khuẩn nhất định (hình 1.5 a). Sự hấp thụ của phage phụ thuộc vào các thụ thể trên bề mặt tế bào vi khuẩn. Các thể thực khuẩn khác nhau có các vị trí khác nhau về điểm hấp thụ. Ví dụ thể thực khuẩn T3, T4, T7 của vi khuẩn *E.colli* có điểm hấp thụ là lipopolisaccarit. Thể thực khuẩn T2 và T6 lại có điểm hấp thụ là lipoprotein. Việc hấp thụ chịu ảnh hưởng bởi nhiều nhân tố nội ngoại cảnh như số lượng thể thực khuẩn, các ion dương, các nhân tố hỗ trợ như triptophan có thể xúc tiến sự hấp thụ của thể thực khuẩn T4, pH môi trường trung tính có lợi cho sự hấp thụ, nhiệt độ thích hợp cho sự phát triển cũng là thích hợp cho sự hấp thụ.

(2) Giai đoạn xâm nhập:

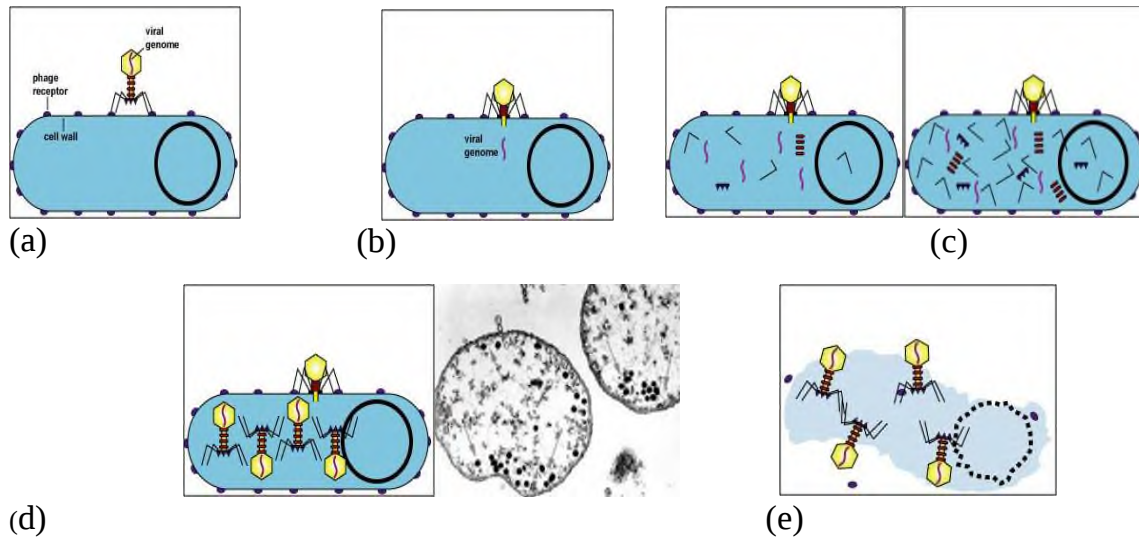
Sau khi hấp thụ, đĩa gốc và sợi đuôi sẽ nhận được một sự kích thích, làm cho các capsome của bao đuôi sẽ có những vận động phức tạp. Chúng co lại chỉ còn một nửa chiều dài và đâm ống đuôi vào qua thành tế bào và màng tế bào chất. Trong quá trình này các men lizozim ở đầu ống đuôi có tác dụng làm hòa tan peptidoglican ở một bộ phận của thành tế bào. Phage không xâm nhập vào trong tế bào mà chỉ tiêm ADN của chúng vào tế bào chất của tế bào vi khuẩn (hình 1.5b).

(3) Giai đoạn tổng hợp các thành phần của phage:

Đầu tiên phage cung cấp thông tin di truyền cho tế bào vi khuẩn và bắt tế bào này tổng hợp các enzym và các thành phần của phage dựa trên hệ thống trao đổi chất của tế bào vật chủ (hình 1.5c).

(4) Giai đoạn lắp ráp:

Sau khi đã được tổng hợp xong, các thành phần của phage sẽ lắp ráp lại thành các thể thực khuẩn hoàn chỉnh, đó là các thể thực khuẩn thế hệ “con” có kích thước như nhau (hình 1.5 d).



Hình 1.5. (a) Giai đoạn hấp phụ, (b) Giai đoạn xâm nhập, (c) Giai đoạn sinh tổng hợp vỏ và lõi, (d) Giai đoạn lắp ráp, (e) Quá trình làm tan tế bào và phóng thích phage.

Giai đoạn phóng thích: Sau khi được lắp ráp xong, phage tiết ra men lizozim làm vỡ vách tế bào vi khuẩn và phage được phóng thích ra ngoài (hình 1.5 e). Mỗi tế bào vi khuẩn bị nhiễm phage có thể phóng thích từ 50- 200 phage

1.5.2.2. Các giai đoạn của chu trình tiềm tan

Chu trình bắt đầu khi phage gắn vào bề mặt tế bào vi khuẩn và tiêm ADN vào tế bào chất chúng hoặc có thể tham gia vào chu trình tan hoặc gắn vào nhiễm sắc thể của tế bào vi khuẩn để bước vào chu trình tiềm tan (hình 1.6). Có trường hợp ADN của phage không gắn vào nhiễm sắc thể của tế bào chủ mà sao chép độc lập giống như plasmid. Các giai đoạn của chu trình như sau:

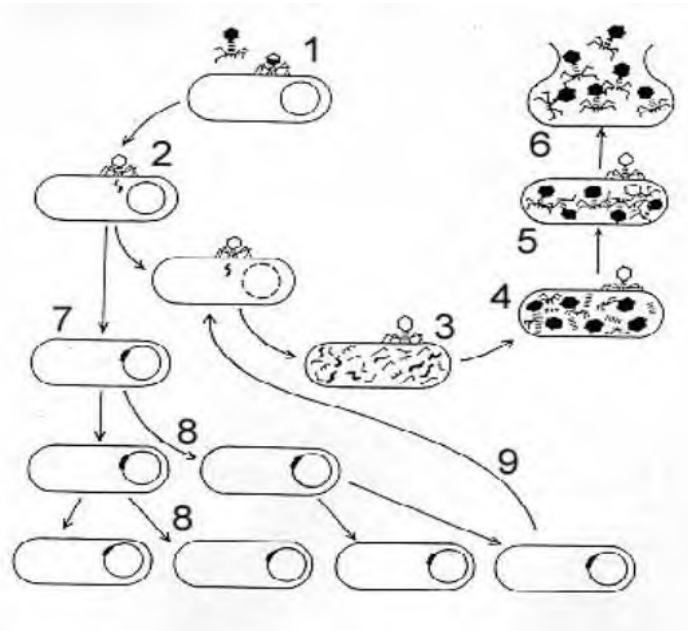
1. Hấp thụ: phage hấp thụ vào bề mặt tế bào vi khuẩn tại vị trí của thụ thể
2. Xâm nhập: phage tiêm ADN vào trong tế bào chất của vi khuẩn
3. Sao chép giai đoạn sớm: hệ gen của phage được sao chép và các thành phần của phage được tổng hợp
4. Sao chép giai đoạn sau: tiếp tục tổng hợp nên các thành phần của phage
5. Lắp ráp: các thành phần của phage được lắp ráp tạo phage hoàn chỉnh
6. Phóng thích: lysozyme của phage phá vỡ lớp peptidoglycan làm tan tế bào vi khuẩn

Hoặc

7. Phage gắn ADN vào nhiễm sắc thể của vi khuẩn. Phage lúc này được gọi là prophage

8. Khi tế bào vi khuẩn sống và sinh sản, prophage sẽ được sao chép cùng với nhiễm sắc thể của vi khuẩn.

9. Vi khuẩn chứa phage tiềm tan bị một tác động nào đó bị phá huỷ ADN, prophage sẽ tách khỏi nhiễm sắc thể chuyển sang chu trình tan sinh sản ra các phage mới và thoát ra khỏi tế bào.



Hình 1.6. Chu trình tiềm tan ở thể thực khuẩn ôn hòa

1.4. Ý NGHĨA CỦA VI RÚT

Ứng dụng trong công nghệ sinh học để sản xuất các chế phẩm sinh học như Insulin, interferon, hoặc sử dụng vi rút để làm véc tơ trong công nghệ chuyển tải gen. Trong nông nghiệp sử dụng vi rút sản xuất thuốc trừ sâu vi rút ...

2. VI KHUẨN

2.1. KHÁI NIỆM VỀ VI KHUẨN

Vi khuẩn là nhóm vi sinh vật không có màng nhân

2.2. ĐẶC ĐIỂM HÌNH THÁI, CẤU TẠO CỦA VI KHUẨN

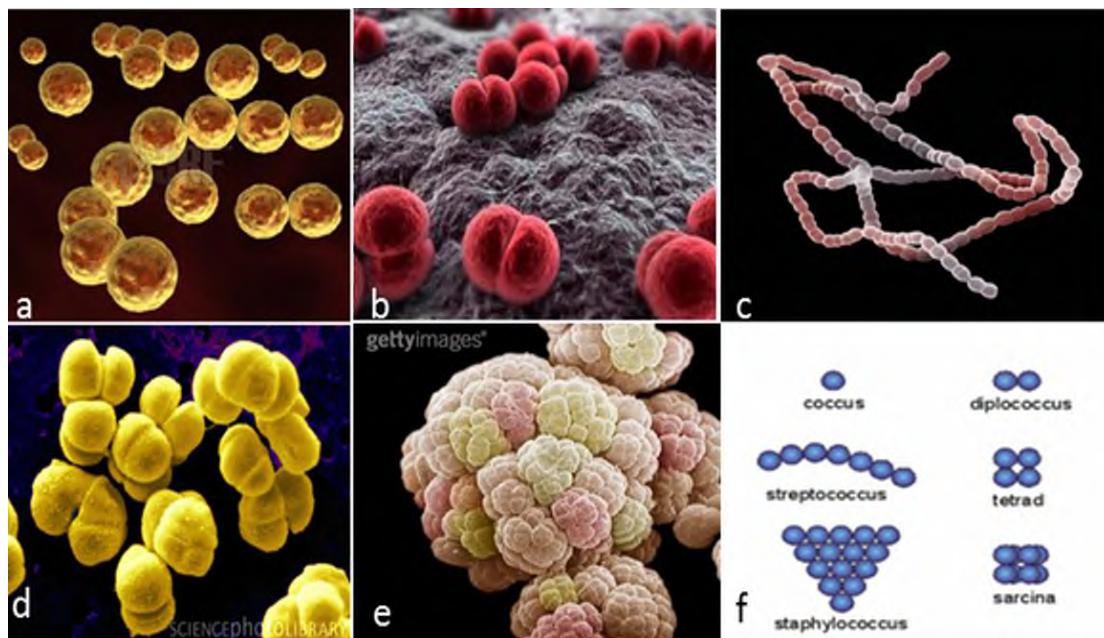
2.2.1. Hình thái

Đường kính của vi khuẩn dao động từ 0,2-2,0 μm , chiều dài cơ thể khoảng 2,0-8,0 μm . Vi khuẩn có ba hình dạng chủ yếu là hình cầu, hình que và hình xoắn.

Vi khuẩn hình cầu (cầu khuẩn): Kích thước khoảng 0,5- 1 micromet, có dạng hình cầu, hình ngọn nến, hình hạt cà phê. Tùy theo phương hướng của mặt phẳng phân cắt và cách liên kết mà ta có đơn cầu khuẩn (coccus), song cầu khuẩn (diplococcus), liên cầu khuẩn (Streptococcus), tứ cầu khuẩn (Tetracoccus) hay tụ cầu khuẩn (Sarcina) (hình 1.7)

Vi khuẩn hình que (trực khuẩn) cũng có dạng đơn, dạng đôi hay dạng chuỗi (hình 1.8).

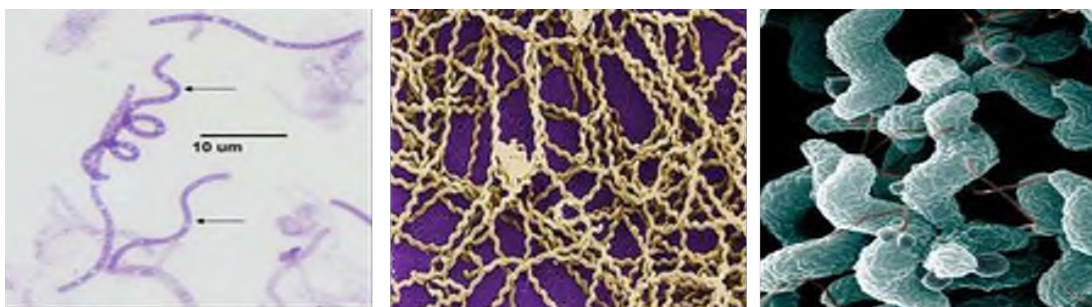
Vi khuẩn hình xoắn (còn gọi là xoắn khuẩn) có các dạng hình dấu phẩy (phẩy khuẩn), hình xoắn thưa (xoắn khuẩn), hình xoắn khít (xoắn thê) (hình 1.9). Ngoài ra còn các hình dạng khác như hình khối vuông, khối tam giác, vi khuẩn dạng sợi.



Hình 1.7. Các dạng cầu khuẩn: (a) Cầu khuẩn, (b) Song cầu khuẩn, (c) Liên cầu khuẩn, (d) Tứ cầu khuẩn, (e) Bát cầu khuẩn



Hình 1.8. Trực khuẩn

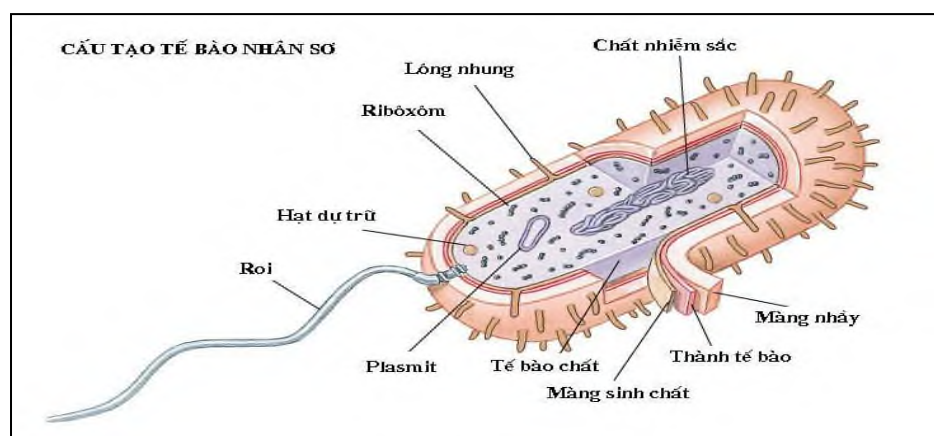


Hình 1.9. Xoắn khuẩn

2.2.2. Cấu tạo tế bào vi khuẩn

Về mặt cấu trúc, tế bào vi sinh vật nhân nguyên chia thành ba phần (hình 1.10). Phần vỏ bao gồm bao nhày, thành tế bào và màng tế bào chất. Phần tế bào chất bao gồm hệ gen của tế bào, ribosom và các thành phần khác. Phần gắn vào mặt ngoài tế bào có tiên mao và khuẩn mao.

Hình 1.10.
cấu trúc
bào vi
khuẩn.



Sơ đồ
của tế

2.2.2.1 Tiên mao (Roi)

Tiên mao (roi) là những sợi lông dài mọc ở mặt ngoài của vi khuẩn có tác dụng giúp cho chúng di chuyển trong môi trường lỏng. Đường kính khoảng 20nm nên không thể quan sát dưới kính hiển vi thường.

Tốc độ và kiểu di động của vi khuẩn khác nhau tùy theo loài và vị trí của tiên mao. Tuy nhiên kiểu di động của vi khuẩn trong môi trường lỏng còn phụ thuộc vào nhiều yếu tố khác. Có khi hoàn toàn là ngẫu nhiên nhưng có trường hợp là để tìm đến hay tránh khỏi một yếu tố nào đó. Ví dụ như vi khuẩn tìm đến nguồn thức ăn, chỗ có ánh sáng...



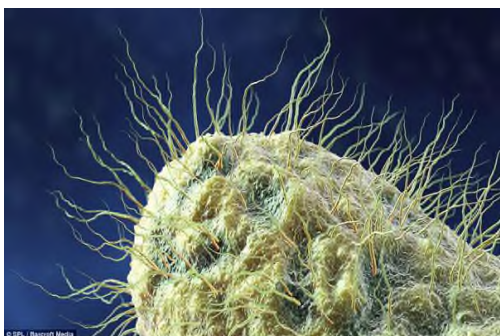
Hình 1.11. Các vị trí khác nhau của tiên mao trên tế bào vi khuẩn.

Các vị trí của tiên mao có thể là: Không có tiên mao gọi là vi khuẩn vô mao; roi mọc ở cực: (1) mọc ở một cực (một roi hoặc chùm roi); (2) mọc ở hai cực (một roi hoặc chùm roi), mọc khắp xung quanh bề mặt tế bào hay mọc từ giữa tế bào (hình 1.11)

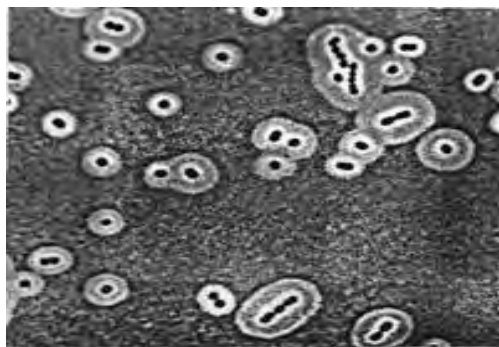
2.2.2.2 Khuẩn mao (Lông)

Khuẩn mao là những sợi lông rất ngắn (7-9nm), rỗng giữa (đường kính 2-2.5nm), số lượng rất nhiều (250-300 sợi/tế bào), bản chất protein, mọc trên bề mặt tế bào vi khuẩn. Khuẩn mao có chức năng giúp cho vi khuẩn bám giữ vào bề mặt cơ chất, giúp cho tế bào tăng bề mặt hấp thu chất dinh dưỡng.

Mỗi vi khuẩn còn có 1- 4 khuẩn mao giới tính có công dụng làm cầu nối để chuyển những đoạn ADN từ tế bào này sang tế bào khác. Khuẩn mao giới tính còn là thụ thể để cho các thể thực khuẩn.



Khuẩn mao của vi khuẩn nhày vi khuẩn Hình 1.13.



Hình 1.12.

Màng

2.2.2.3. Màng nhày

Hầu hết vi khuẩn đều có một lớp vật chất dạng keo bên ngoài thành tế bào được gọi là màng nhày (Hình 1.13). Phần lớn thành phần hoá học của bao nhày là nước (98%) và polisaccarit, ngoài ra còn có polipeptit và protein.

Màng nhày có công dụng bảo vệ vi khuẩn tránh bị thương tổn khi khô hạn, tránh khỏi hiện tượng thực bào của bạch cầu và là nơi tích lũy chất dinh dưỡng của vi khuẩn.

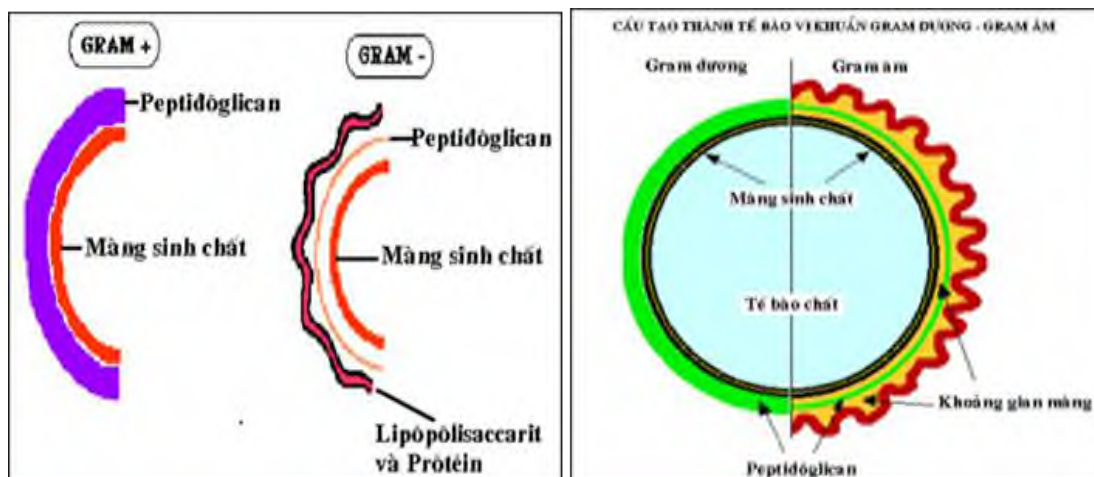
2.2.2.4 Thành tế bào

Thành tế bào vi khuẩn có chiều dày khác nhau tùy theo loài dao động từ 10-18 nm, chiếm trọng lượng từ 10-20% trọng lượng khô của vi khuẩn. Thành tế bào có độ rắn chắc nhất định để duy trì hình dạng của tế bào. Thành tế bào cho phép các chất dinh dưỡng đi qua nhưng lại có thể ngăn cản sự xâm nhập của một số chất có hại đối với tế bào như thuốc nhuộm, một số chất kháng sinh, muối mật, muối kim loại nặng, một số enzym phân giải. Thành tế bào có liên quan mật thiết đến tính tính gây bệnh cũng như tính miễn dịch với thể thực khuẩn và cũng là nơi quan trọng nhất tương tác với các chất kháng sinh.

Thành phần cấu tạo của thành tế bào của vi khuẩn rất phức tạp và cũng rất riêng biệt so với các sinh vật khác gồm hai chất dị cao phân tử là polisaccarit và peptidoglycan. Nhờ phương pháp nhuộm Gram do nhà do nhà vi khuẩn học Đan Mạch Hans Christian Gram

(1853-1938) phát minh ra từ năm 1884, vi khuẩn được phân biệt thành hai nhóm lớn là vi khuẩn Gram dương (G+) và vi khuẩn Gram âm (G-)

Thành tế bào của vi khuẩn G+ cấu tạo bởi lớp peptidoglycan dày bao bên ngoài màng tế bào chất. Axit teicoic là một thành phần đặc trưng của tế bào vi khuẩn G+. Trong khi vi khuẩn G- lại không có axit teicoic. Do tích điện âm Axit teicoic giúp cho việc vận chuyển các ion dương vào, ra tế bào và giúp tế bào dự trữ photphat. Ngoài ra axit teicoic còn liên quan đến kháng nguyên bề mặt và tính gây bệnh của một số vi khuẩn G+. Chúng còn gọi là thụ thể hấp phụ đặc biệt đối với một số thể thực khuẩn.



Hình 1.14. Sơ đồ cấu tạo thành tế bào của vi khuẩn

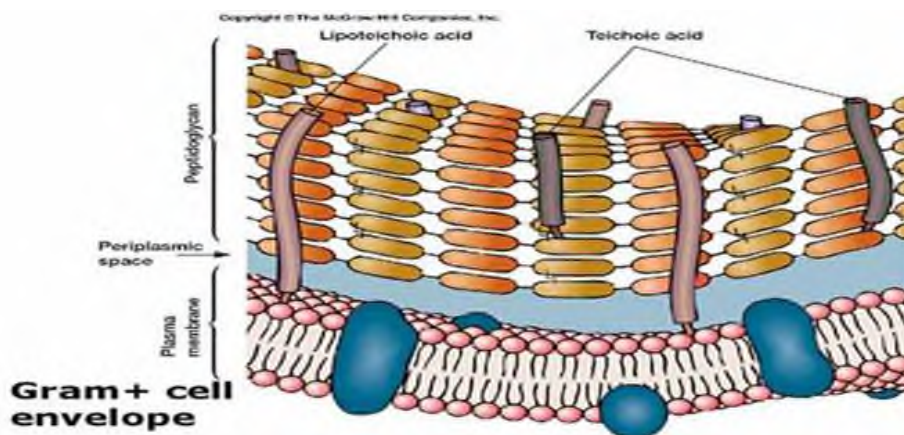
Ở vi khuẩn G- và G+ đều có lớp không gian chu chất nằm ở giữa thành tế bào và lớp màng tế bào chất. Ngoài ra, ở giữa lớp màng ngoài và lớp PG mỏng ở thành tế bào chất của cả vi khuẩn G- cũng có một lớp không gian chu chất. Trong lớp này có nhiều thành phần như proteinaza, nucleaza, protein vận chuyển qua màng, protein thụ thể làm chỗ bám của thể thực khuẩn). Thành tế bào vi khuẩn G+ có thể bị phá hủy hoàn toàn để trở thành thể nguyên sinh khi chịu tác động của lizozim (có trong lòng trắng trứng, nước mắt, nước muối, đuôi của thể thực khuẩn). Thành phần tế bào vi khuẩn G- có sức đề kháng lớn hơn với lizozim do đó bị phá hủy ít hơn.

2.2.2.5 Màng tế bào chất

Màng tế bào chất có chiều dày khoảng 5-10nm và chiếm khoảng 10-15% trọng lượng tế bào. Màng nguyên sinh chất có cấu tạo bởi 2 lớp photpholipit (PL), chiếm khoảng 30-40% khối lượng màng và các protein chiếm 60-70 % khối lượng màng. Mỗi phân tử PL chứa một đầu tích điện phân cực (đầu photphat) và một đuôi không tích điện, không phân cực (đầu hidrocarbon). Đầu phân cực tan trong nước nằm phía trong. Đầu photphat còn gọi là đầu háo nước, đầu hidrocarbon còn gọi là đầu kỵ nước. Các PL trong màng làm màng hóa lỏng và cho phép các protein di động tự do. Sự hóa lỏng động học này là

cần thiết cho các chức năng của màng. Cách sắp xếp của PL và protein như vậy gọi là mô hình khảm lỏng.

Chức năng của màng sinh chất: Không chế sự vận chuyển trao đổi ra, vào tế bào của các chất dinh dưỡng, các sản phẩm trao đổi chất. Duy trì một áp suất thẩm thấu bình thường bên trong tế bào. Là nơi sinh tổng hợp của các thành phần tế bào (peptidoglycan, LPS, axit teichoic), các polime của vỏ nhầy, nhiều loại enzym như β -galactozidaza, các enzym liên quang đến tổng hợp thành tế bào, vỏ nhầy, các protein của chuỗi hô hấp. Cung cấp năng lượng cho sự vận động của tiêm mao và là nơi tiến hành các quá trình photphoryl oxi hóa và photphoryl quang hợp.



Hình 1.15. Cấu tạo màng tế bào vi khuẩn

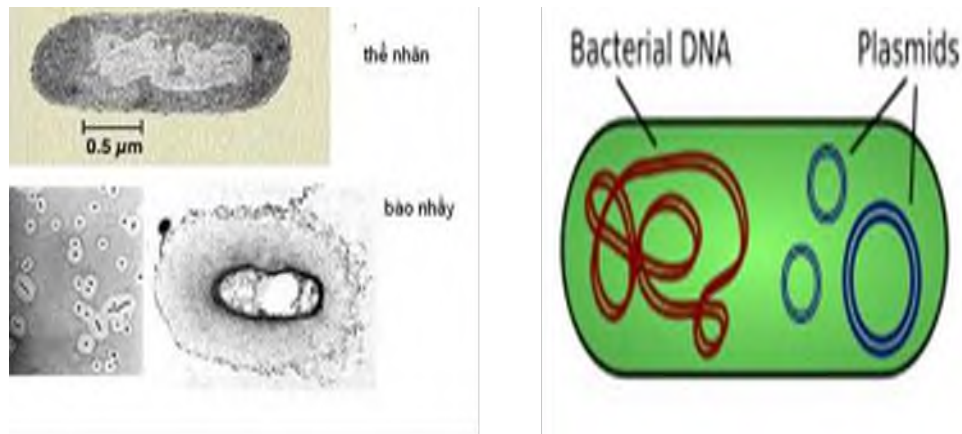
2.2.2.6. Tế bào chất

Tế bào chất (TBC-Cytoplasm) là phần vật chất dạng keo nằm bên trong màng sinh chất, chứa tới 80% là nước. Trong tế bào chất có protein, acid nucleic, hydrat carbon, lipid, các ion vô cơ và nhiều nhiều chất khác có khối lượng phân tử thấp. Bào quan đáng lưu ý trong TBC là ribosom (ribosome). Ribosom nằm tự do trong tế bào chất và chiếm tới 70% trọng lượng khô của TBC. Ribosom gồm 2 tiểu phần (50S và 30S), hai tiểu phần này kết hợp với nhau tạo thành ribosom 70S. S là đơn vị Svedberg- đại lượng đo tốc độ lắng khi ly tâm cao tốc. Trong tế bào chất của vi khuẩn còn có thể gặp các chất dự trữ như các hạt glycogen, hạt PHB (Poly- β -hydroxybutyrat), Cyanophycin, Phycocyanin, các hạt dị nhiễm sắc (metachromatic body), các giọt lưu huỳnh...

2.2.2.7 Thể nhân

Thể nhân là cơ sở vật chất chứa đựng thông tin di truyền của vi khuẩn. Thể nhân của vi sinh vật nhân nguyên chưa có màng nhân nên còn được gọi là nhân sơ hay nhân nguyên thủy. Thể nhân có hình dạng bất định và là một nhiễm sắc thể duy nhất có cấu tạo bởi một sợi ADN xoắn kép.

Ngoài ra, đa số vi khuẩn còn có chứa ADN kép dạng vòng kín nằm ngoài nhiễm sắc thể được gọi là plasmid (hình 18). Plasmid thường chứa từ 2-30 gen và có khả năng sao chép độc lập.



Hình 1.16. Nhân tế bào vi khuẩn

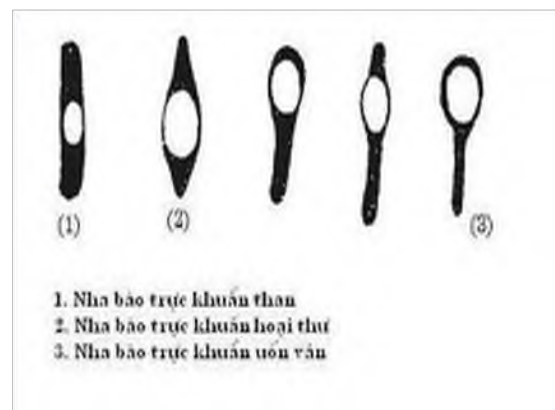
2.2.2.8 Nha bào

Nha bào là bộ phận lưu tồn đặc biệt, được hình thành ở những giai đoạn phát triển nhất định của một số loài vi khuẩn G⁺ phần lớn là vi khuẩn hình que.

Hai nhóm vi khuẩn chủ yếu có khả năng hình thành nha bào là nhóm vi khuẩn hiếu khí *Bacillus* có trong đất và nhóm vi khuẩn kỵ khí *Clostridium* có trong đất, chất mùn và trong ruột của động vật. Ngoài ra một số cầu khuẩn, phẩy khuẩn và xoắn khuẩn cũng có khả năng sinh nha bào.

Cấu tạo gồm nhiều lớp màng bao bọc. Ngoài cùng là lớp màng ngoài, kế đến là vỏ của nha bào có nhiều lớp có tác dụng ngăn chặn sự thẩm thấu của nước và các chất hoà tan. Tiếp theo là lớp màng trong và trong cùng là lớp tế bào chất chỉ chứa hệ gen và một số ít ribosom và enzym

Nha bào không có nhiệm vụ sinh sản mà có khả năng đề kháng được với những điều kiện môi trường khắc nghiệt như nhiệt độ cao, tính axit cao, bức xạ, hóa chất và các chất tẩy trùng. Nha bào có thể tồn tại rất lâu trong điều kiện bất lợi và sẽ trở về trạng thái sinh vật bình thường khi điều kiện thích hợp.



Hình 1.17 Nha bào ở vi khuẩn

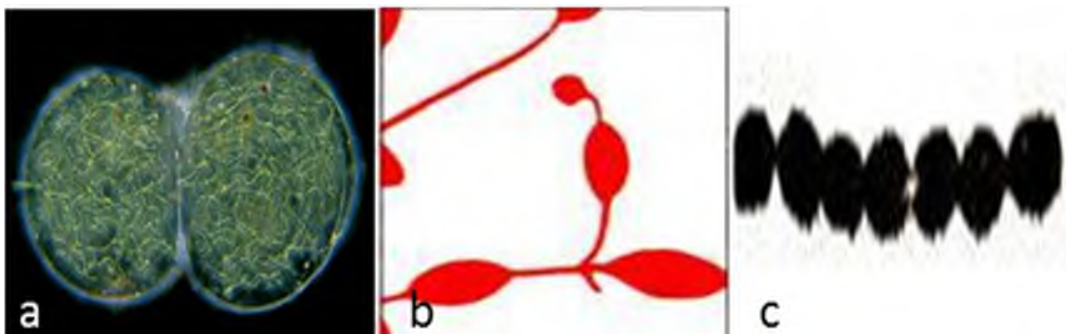
2.3. ĐẶC ĐIỂM SINH SẢN CỦA VI KHUẨN

2.3.1. Sinh sản phân đôi

Hầu hết vi khuẩn sinh sản bằng cách nhân đôi (hình 1.18). Trong quá trình này, mỗi tế bào tăng lên về kích thước, tạo nên thành và màng, tổng hợp mới các enzym và ribôxôm đồng thời nhân đôi ADN. Sau khi tế bào đạt gấp đôi chiều dài (nếu là trực khuẩn) hoặc gấp đôi đường kính (nếu là cầu khuẩn), 1 vách ngăn sẽ phát triển tách 2 ADN giống nhau và tế bào chất thành 2 phần riêng biệt. Cuối cùng thành tế bào được hoàn thiện và 2 tế bào con rời nhau ra.

2.3.2. Sinh sản nảy chồi

Một số vi khuẩn sống trong nước lại sinh sản nhờ nảy chồi, tế bào mẹ tạo thành một chồi ở cực, chồi lớn dần rồi tách ra thành một vi khuẩn mới.



Hình 1.18. Các hình thức sinh sản của vi khuẩn: (a) phân đôi, (b) nảy chồi, (c) sinh sản bằng tử.

2.3.3. Sinh sản bằng bào tử

Phần đỉnh của sợi khí sinh phân cắt tạo thành chuỗi bào tử, mỗi bào tử nảy mầm tạo thành cơ thể mới. Một số vi khuẩn sinh sản bằng ngoại bào tử (bào tử hình thành bên ngoài TB sinh dưỡng).

Các bào tử sinh sản có đặc điểm: Chỉ có các lớp màng, không có vỏ và không có hợp chất Canxiđipicolinat.

Một số loại vi khuẩn khi gặp điều kiện không thuận lợi sẽ hình thành nội bào tử.

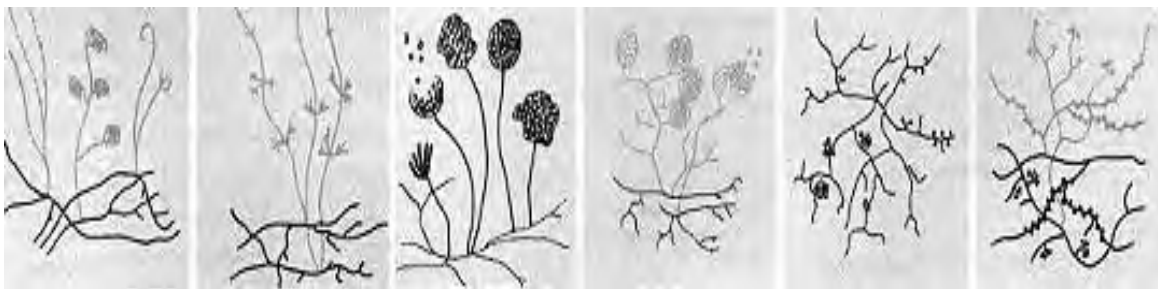
3 XẠ KHUẨN

3.1. Khái niệm về xạ khuẩn

Xạ khuẩn là nhóm lớn vi khuẩn G⁺, hiếu khí, sống hoại sinh và có cấu tạo dạng sợi phân nhánh. Xạ khuẩn phân bố rất rộng rãi trong đất, tham gia vào quá trình chuyển hoá tự nhiên của nhiều hợp chất trong đất.

3.2. Đặc điểm hình thái, cấu tạo của xạ khuẩn

Trước đây xạ khuẩn được xếp chung nhóm với nấm do chúng có hình thức phát triển dạng sợi phân nhánh (hình 1.19). Ngày nay xạ khuẩn được xếp vào nhóm vi khuẩn thật do chúng có nhiều đặc điểm giống với vi khuẩn và khác với nấm như sau: (1) có giai đoạn đa bào và đơn bào; (2) kích thước rất nhỏ; (3) thể nhân là nhân nguyên thủy; (4) vách tế bào không chứa cellulose hoặc kitin; (5) không có giới tính và (6) sống hoại sinh hoặc ký sinh.



Hình 1.19. Các hình thức phát triển hệ sợi ở xạ khuẩn.

Cấu tạo tế bào xạ khuẩn gồm: Màng nhầy, thành tế bào, màng nguyên sinh, tế bào chất, thể Xạ khuẩn sinh sản dinh dưỡng bằng đoạn sợi: mỗi đoạn sợi xạ khuẩn khi đứt ra đều có khả năng nảy chồi tạo ra hệ sợi xạ khuẩn.

3.3. Đặc điểm sinh sản của xạ khuẩn

Xạ khuẩn sinh sản dinh dưỡng bằng đoạn sợi: Mỗi đoạn sợi xạ khuẩn khi đứt ra đều có khả năng nảy chồi tạo ra hệ sợi xạ khuẩn

Bằng sự nảy chồi phân nhánh: Trên bề mặt xạ khuẩn xuất hiện những mấu lồi, những mấu lồi lớn lên thành chồi, chồi lớn lên thành nhánh mới.

Sinh sản bằng phân cắt trực tiếp tế bào

Sinh sản bằng sự hình thành bào tử: Bào tử của xạ khuẩn được hình thành trên các nhánh phân hóa của khuẩn ty khí sinh; sự hình thành bào tử của xạ khuẩn có 2 kiểu là kết đoạn hoặc theo kiểu cắt khúc.

3.4. Ý nghĩa của xạ khuẩn

Xạ khuẩn là nhóm vi sinh vật phân bố rộng rãi trong đất, chúng tham gia vào các quá trình phân giải các hợp chất hữu cơ trong đất như xenluloza, tinh bột v.v.... góp phần khép kín vòng tuần hoàn vật chất trong tự nhiên. Đặc tính này còn được ứng dụng trong quá trình chế biến phân hủy rác v.v...

Nhiều xạ khuẩn có khả năng sinh: Chất kháng sinh, dùng làm thuốc trị bệnh cho người, gia súc, cây trồng; Vitamin thuộc nhóm B (B1, B2, B6,...), một số acid amin và acid hữu cơ; enzyme (proteas, amylaza...) Đặc điểm này được sử dụng trong nghiên cứu sản xuất các chất kháng sinh dùng trong y học, nông nghiệp và bảo quản thực phẩm. Trong số 8000 chất kháng sinh hiện đã được biết đến trên thế giới thì trên 80% là do xạ khuẩn sinh ra.

4. VI NẤM

4.1. Khái niệm về vi nấm

Vi nấm là các tế bào sinh vật nhân thật, phân bố rất rộng rãi trong đất, nước và cả trong không khí.

Vi nấm sống hoại sinh và ký sinh trên các sinh vật khác nên cũng là tác nhân gây bệnh cho người và động vật. Trong số khoảng 100,000 loài nấm đã được biết đến có khoảng 100 loài có khả năng gây bệnh. Một số loài vi nấm làm hư hỏng thực phẩm hoặc tiết ra độc tố. Trong đất vi nấm có vai trò quan trọng trong việc phân hủy các chất hữu cơ thành các chất dinh dưỡng cho thực vật. Cấu trúc nên lớp mùn màu mỡ của đất, tham gia vào sự chuyển hoá các chất vô cơ trong đất. Một số loài nấm có khả năng lên men thực phẩm như men rượu (*Saccharomyces cerevisiae*), một số có khả năng sinh chất kháng sinh (*Penicillium* sp), enzym, các axit hữu cơ và nhiều chất khác.

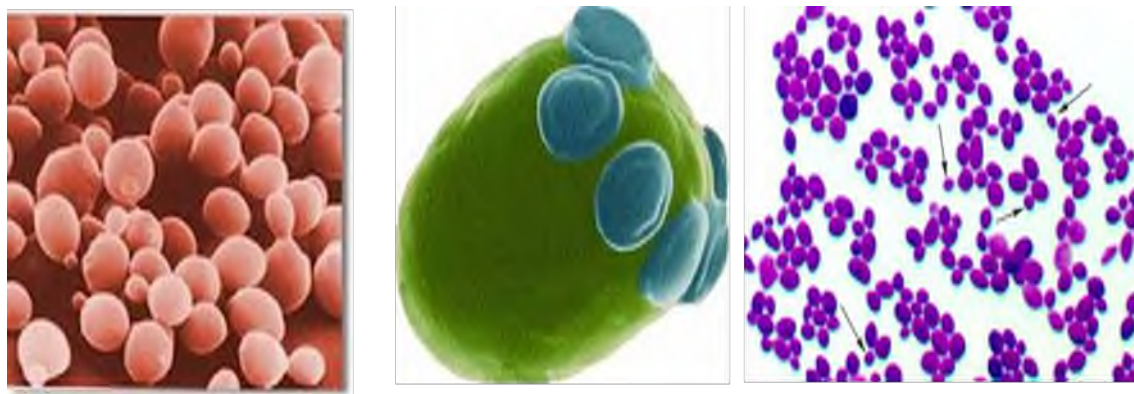
Vi nấm gồm có nấm men và các nấm sợi không sinh thể quả lớn (còn gọi là mũ nấm)

4.2. Nấm men

4.2.1. Đặc điểm hình thái, cấu tạo của Nấm men

Nấm men là nấm đơn bào, có nhân thật, thường có hình bầu dục, tuy nhiên tùy loài mà tế bào nấm men có thể có hình cầu, hình trứng, hình elip...

Kích thước tế bào nấm men lớn gấp 10 lần vi khuẩn, đường kính khoảng từ 1-5µm và dài khoảng 5-30µm. Các loài nấm men có khuẩn ti hoặc khuẩn ti giả. Sợi nấm có 2 dạng là sợi cơ chất (sợi dinh dưỡng) luôn bám chặt vào cơ chất, hấp thụ chất dinh dưỡng và sợi khí sinh phát triển trong không khí và trên bề mặt của cơ chất và trên sợi khí về sau sẽ mọc ra những cánh bào tử.



Hình 1.20. Nấm men

Thành tế bào dày khoảng 25nm, cấu tạo bởi glucan hoặc kitin, khoảng 10% protein (một phần là các enzym) và một lượng nhỏ lipid. Màng tế bào chất cấu tạo chủ yếu là protein (50% khối lượng khô), còn lại là lipid (40%) và một ít polisaccarit.

Nhân của tế bào nấm men được bao bọc bởi một màng nhân như ở các sinh vật có nhân thật khác. Màng nhân có cấu trúc hai lớp và có rất nhiều lỗ thủng.

Ti thể của nấm men cũng giống như các nấm sợi và các sinh vật có nhân khác. Các tế bào nấm men khi già sẽ xuất hiện không bào chứa các enzym thủy phân, poliphosphat, lipoit, ion kim loại... Chúng là những vi sinh vật kỵ khí bắt buộc.

4.2.2. Đặc điểm sinh sản của nấm men

4.2.2.1. Sinh sản vô tính

4.2.2.1.1. Nảy chồi

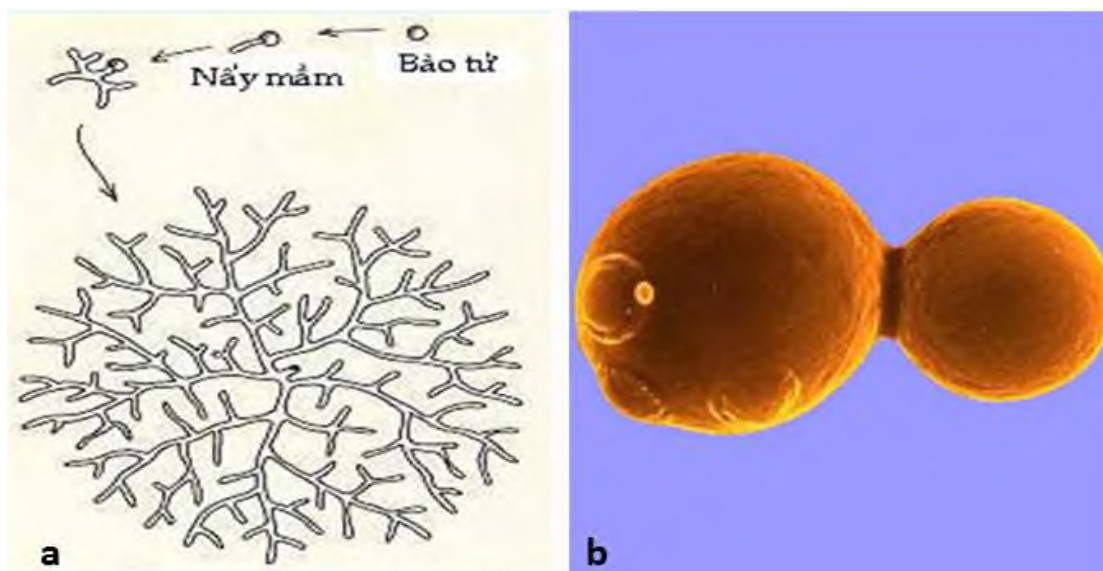
Nảy chồi là hình thức sinh sản vô tính phổ biến nhất gặp ở hầu hết nấm men. Khi một chồi xuất hiện các enzym thủy phân sẽ làm phân giải phần polisacarit của thành tế bào làm cho chồi chui ra khỏi tế bào mẹ. Vật chất mới được tổng hợp sẽ được huy động đến chồi và làm chồi phình to dần lên khi đó sẽ xuất hiện vách ngăn giữa chồi và tế bào mẹ. Thành phần của vách ngăn cũng tương tự như thành tế bào. Sau đó chồi tách khỏi tế bào mẹ.

4.2.2.1.2. Phân cắt

Lối phân cắt ở các tế bào nấm men cũng tương tự như ở vi khuẩn. Tế bào dài ra, ở giữa mọc ra vách ngăn chia tế bào ra thành hai phần tương đương nhau mỗi tế bào con có một nhân. Hình thức sinh sản này thường gặp ở nấm men *Schizosaccharomyces*. (Hình 1.21)

4.2.2.1.3. Bào tử

Bào tử áo như ở nấm men *Candida albicans* là bào tử đặc biệt hình thành từ một hoặc vài tế bào trên sợi nấm, thường mọc ở đỉnh của các khuẩn ti giả. Bào tử áo có vách dày nên có khả năng chịu đựng được điều kiện môi trường khắc nghiệt và sẽ nảy mầm cho ra sợi nấm mới khi gặp điều kiện thuận lợi.



**Hình 1.21. Sinh sản ở Nấm men (a) sinh sản bằng bào tử
(b) sinh sản nảy chồi**

4.2.2.2. Sinh sản hữu tính

Sinh sản hữu tính ở nấm men thường ít xảy ra so với sinh sản vô tính, tuy nhiên nhờ có sinh sản hữu tính mà các hiện tượng tái tổ hợp các đặc điểm di truyền xảy ra. Ở nấm men có hình thức sinh sản hữu tính bằng bào tử nang. Bào tử nang được hình thành do sự tiếp nối của hai tế bào khác giới, chỗ tiếp nối sẽ tạo một lỗ thông và qua đó nguyên sinh chất có thể đi qua để tiến hành phối chất và nhân cùng đi qua để tiến hành phối nhân. Qua phân bào giảm nhiễm sẽ tạo thành các tế bào con

4.3 Nấm sợi

Là tất cả các nấm không phải là nấm men và không sinh mũ nấm. Tuy nhiên ở tất cả các giai đoạn chưa sinh mũ nấm thì khuẩn ti thể (hệ sợi nấm) của nấm lớn vẫn được coi là nấm sợi. Nấm sợi còn được gọi là nấm mốc mọc trên thực phẩm, chiếu, quần áo, giày dép, sách vở. Nhiều nấm sợi ký sinh trên người, động vật và thực vật gây ra các bệnh nguy hiểm. Một số nấm mốc có khả năng sinh ra độc tố.

Nấm sợi phân bố rộng rãi trong tự nhiên và tham gia tích cực vào các vòng tuần hoàn vật chất, nhất là quá trình phân giải chất hữu cơ và hình thành chất mùn. Rất nhiều loại nấm sợi đã được sử dụng trong công nghiệp chế biến thực phẩm, công nghiệp enzym, công nghiệp dược phẩm, sản xuất thuốc trừ sâu sinh học, kích thích tố sinh trưởng thực vật, làm chỉ thị xác định độ phì nhiêu và định lượng các chất hoạt động sinh học, sản xuất sinh khối phục vụ chăn nuôi và dinh dưỡng cho con người, xử lý ô nhiễm môi trường.

4.3.1 Hình thái và cấu trúc của nấm sợi

Nấm sợi cấu trúc tương tự cấu trúc của tế bào nấm men, một số loài nấm, khuẩn ti không có vách ngăn bên trong và có nhiều nhân. Khuẩn ti ở các loài nấm có vách ngăn

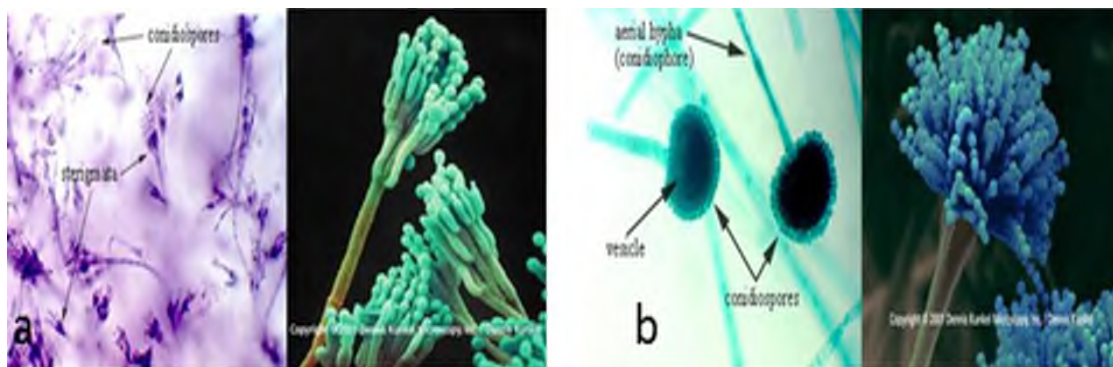
có thể chứa một, hai nhân hoặc nhiều nhân. Bên ngoài có thành tế bào thường cấu tạo bởi chitin hoặc cellulose hoặc cả hai. Tế bào chất có nhân phân hóa và có màng nhân.

4.3.2. Sinh sản của nấm sợi

4.3.2.1. Sinh sản vô tính

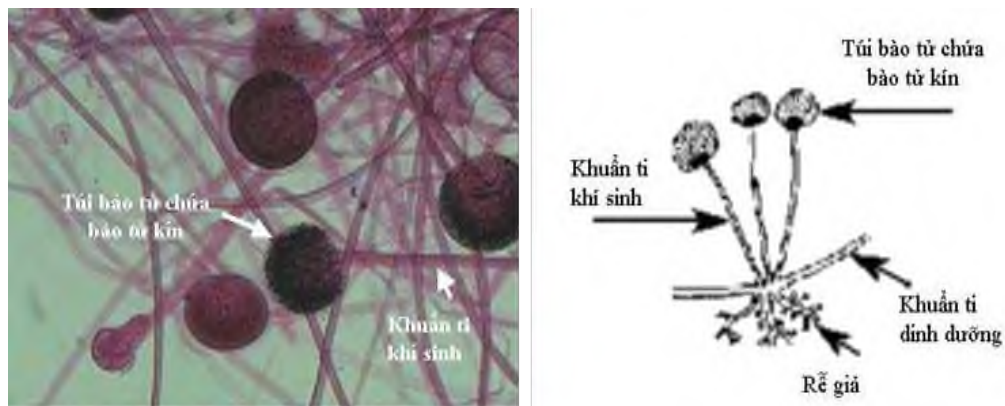
Sinh sản bằng bào tử đỉnh (bào tử cành): được sinh ra trên một sợi nấm gọi là đài/cành (hình 1.22)

Sinh sản bằng bào tử kín: bào tử được chứa trong túi (hay bọc) sinh ra trên một sợi nấm (hình 1.23). Sinh sản bằng bào tử đốt: bào tử được hình thành do sự phân đốt ở khuẩn ti dinh dưỡng (hình 1.24).



Hình 1.22.
Bào tử đỉnh

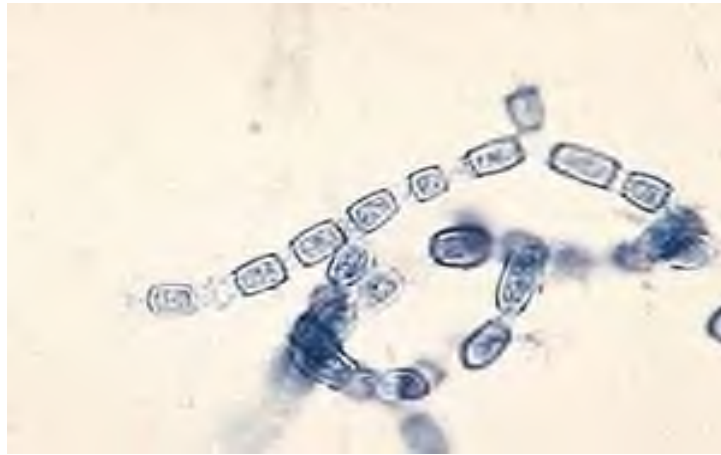
(conidiospores) (a) ở nấm *Penicillium*, (b) ở *Aspergillus*



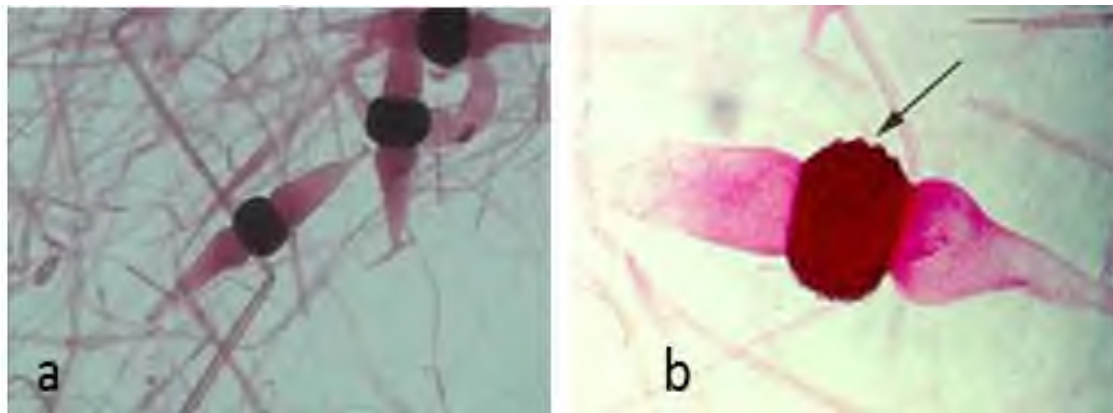
Hình 1.23. Các bào tử kín của nấm *Rhizopus* nằm trong túi bào tử

4.3.2.2. Sinh sản hữu tính

Nấm sợi cũng có hình thức sinh sản hữu tính nhưng không phổ biến. Thường gặp nhất là hình thức sinh sản bằng bào tử tiếp hợp (hình 1.25).



Hình 1.24: Bào tử đốt ở nấm *Coccidioides immitis*



**Hình
1.25.
(a)
Nấm**

Rhizopus*, (b) Bào tử tiếp hợp ở nấm *Rhizopus

5. MỘT SỐ DẠNG VI SINH VẬT KHÁC

5.1. Vi khuẩn lam

Là nhóm vi sinh vật nhân nguyên thuộc vi khuẩn thật có cấu tạo gần gũi với cấu tạo của vi khuẩn G⁻. Trước đây vi khuẩn lam được gọi là tảo lam hay tảo lam lục. Vi khuẩn lam khác biệt rất lớn với tảo ở những đặc điểm: vi khuẩn lam không có lục lạp, không có nhân thực, có riboxom 70S, thành tế bào có chứa peptidoglycan. Vi khuẩn lam có khả năng tự dưỡng quang năng nhờ chứa sắc tố quang hợp là chất diệp lục a, caroten β và các sắc tố phụ. Bộ phận thực hiện quá trình quang hợp trong tế bào vi khuẩn lam được gọi là tilacoit.

Vi khuẩn lam phân bố rất rộng rãi trong tự nhiên. Đại bộ phận vi khuẩn lam sống trong nước ngọt và tạo thành thực vật phù du của các thủy vực. Một số phân bố trong những vùng nước mặn giàu chất hữu cơ hoặc trong nước lợ. Một số sống cộng sinh. Nhiều vi khuẩn lam có khả năng cố định nitơ và có sức đề kháng cao với các điều kiện bất lợi cho nên có thể gặp vi khuẩn lam trên các bề mặt tảng đá hoặc trong vùng sa mạc, trong các suối nước nóng có nhiệt độ cao tới 87°C trong các vùng biển có nồng độ muối tới 0,7%. Một số vi khuẩn lam sống trong ao hồ thường phát triển mạnh vào mùa hè tạo ra hiện tượng “nước nở hoa”. Khi đó nước có màu xanh xín và có mùi vị khó chịu, làm giảm hiện tượng oxi trong nước, làm đổi động vật phù du, gây hại cho cá, nhiều khi ảnh hưởng tới nguồn nước cung cấp cho các đô thị, các khu công nghiệp

Một số vi khuẩn lam vì có giá trị dinh dưỡng cao, có chứa một số hoạt chất có giá trị y học, lại có tốc độ phát triển nhanh, khó nhiễm tạp khuẩn vì thích hợp được với các điều kiện môi trường khá đặc biệt (ví dụ *Spirulina* thích hợp với pH rất cao) cho nên đã được sản xuất với qui mô công nghiệp để thu nhận sinh khối. Việc nuôi *Spirulina* từ nước thải của các bể sinh học có thể phát triển rộng lớn ở các vùng nông thôn để vừa góp phần cải thiện điều kiện môi trường sống vừa tạo ra nguồn thức ăn bổ sung cho chăn nuôi hoặc cho nuôi cá tôm.

Vi khuẩn lam có hình dạng và kích thước rất khác nhau. Chúng có thể là đơn bào hoặc ở dạng sợi đa



Hình 1.26. Một số loài vi khuẩn lam phổ biến

5.2. TẢO

5.2. 1. Khái niệm

Tảo là các vi sinh vật nhân thật có khả năng quang hợp bao gồm các loài tảo nước ngọt và tảo nước mặn. Tảo là nguồn thực phẩm quan trọng. Chlorophyll *a* có ở tất cả các loài tảo cùng với những sắc tố khác, các sắc tố này qui định màu sắc của loài tảo đó.

5.2.2. Hình thái và cấu tạo tế bào của Tảo:

Tảo có hình thái cơ thể rất đa dạng. Có thể chia thành 8 kiểu hình thái như sau:

Kiểu Monad: Tảo đơn bào, sống đơn độc hay thành tập đoàn, chuyển động nhờ lông roi

Kiểu Pamella: Tảo đơn bào, không có lông roi, cùng sống chung trong bọc chất keo thành tập đoàn dạng khối có hình dạng nhất định hoặc không. Các tế bào trong tập đoàn không có liên hệ phụ thuộc nhau.

Kiểu Hạt: Tảo đơn bào, không có lông roi, sống đơn độc.

Kiểu Tập đoàn: Các tế bào sống thành tập đoàn và giữa các tế bào có liên hệ với nhau nhờ tiếp xúc trực tiếp hay thông qua các sợi sinh chất

Kiểu Sợi: Cấu tạo thành tản (thallus) đa bào do tế bào chỉ phân đôi theo cùng một mặt phẳng ngang, sợi có phân nhánh hoặc không.

Kiểu Bản: Tản đa bào hình lá do tế bào sinh trưởng ở đỉnh hay ở gốc phân đôi theo các mặt phẳng cả ngang lẫn dọc. Bản cấu tạo bởi một hay nhiều lớp tế bào.

Kiểu Ống: Tản là một ống chứa nhiều nhân, có dạng sợi phân nhánh hay dạng cây có thân, lá và rễ giả (rhizoid). các tế bào thông với nhau vì tuy phân chia nhưng không hình thành vách ngăn

Tản dạng sợi hay dạng bản phân nhánh, hoặc có dạng thân- lá- rễ giả. Thường mang cơ quan sinh sản có mức độ phân hóa cao.

Tế bào của tảo có nhiều đặc điểm chung của các sinh vật có nhân thật (Eukarya).



Hình 1.27. Một số loài tảo phổ biến

Thành tế bào của tảo cấu tạo bởi polysaccharide. Thành tế bào gồm các sợi cellulose liên kết thành bộ xương (skeleton) nhằm bảo vệ và duy trì hình dạng ổn định cho tế bào. Một số tảo có mannan hay xylan thay thế cho cellulose. Ngoài ra còn có phần vô định hình tạo nên chất nền của thành tế bào. Bên ngoài thành tế bào ở một số tảo có màng keo chứa các polysaccharide có giá trị thực tiễn như alginate, fucoidine, agar, carragenan, porphyran, furcelleran, funoran... Nhiều tảo đơn bào thành tế bào chỉ là chất nguyên sinh đậm đặc hay chu chất (periplast). Thành tế bào của tảo silic cấu tạo bởi chất silic. Một số tảo có lớp muối oxyd sắt calcium carbonat bên ngoài thành tế bào.

Tế bào của nhiều tảo vận động được là nhờ lông roi (flagella). Roi cấu tạo bởi 9 cặp vi ống bao quanh 2 vi ống ở giữa và được bao bọc bởi màng sinh chất. Hai vi ống giữa xuất phát từ đĩa gốc (dense plates) và thể gốc (basal body).

Màng sinh chất cũng giống như ở các sinh vật khác. Trong tế bào chất có nhiều bào quan khác nhau. Sắc lạp (chromoplast) của tảo có cấu tạo như ở thực vật, gồm hai lớp màng bao bọc, bên trong có chất nền (stroma) cùng với hệ thống các túi dẹt gọi là thylakoid. Các thylakoid xếp chồng lên nhau tạo thành loại cấu trúc giống như grana ở thực vật. Trên màng của thylakoid có nhiều chất diệp lục (chlorophyll) và các enzym tham gia vào quá trình quang hợp. Ngoài chất diệp lục (a,b,c,d) còn có thể có các sắc tố carotenoid, phổ biến nhất là b-caroten. Nhiều tảo chứa sắc tố xanthophyll, phycobiliprotein... Trong chất nền của sắc lạp còn có ADN dạng vòng và ribôsom. Đôi khi các lạp có một vùng đậm đặc protein liên

kết với các sản phẩm dự trữ tạo thành một cấu trúc gọi là nhân tinh bột hay nhân protein (pyranoid). Sắc lập còn có chứa các giọt lipid nhỏ nằm giữa các thylakoid. Một số tảo còn có thêm một hai lớp mạng lưới nội chất lục lập (CER- chloroplast endoplasmic reticulum). Còn có các vô sắc lập gồm leucoplast và amyloplast. Chúng làm nhiệm vụ tích lũy chất dự trữ. Ty thể của tảo cũng tương tự như ty thể của các sinh vật khác. Đó là bào quan có hai lớp màng bao bọc, màng ngoài trơn nhẵn còn màng trong ăn sâu vào phía trong chất nền và tạo thành những mào (crista) trên đó mang nhiều loại enzym hô hấp. Chất nền của ty thể có chứa ADN và ribosôm. Tế bào của tảo cũng có thể Golgi (Golgi body) như ở tế bào nhiều sinh vật khác. Đó là các túi dẹp xếp hầu như song song với nhau và có hình vòng cung, phía lõm gọi là mặt trans còn phía lồi gọi là mặt cis. Thể Golgi ở tảo làm nhiệm vụ tổng hợp và tiết ra polysaccharide. Tế bào chất (cytoplasm) của tảo có chứa ribosom 80S và các giọt lipid. Một số tảo di động có các nhóm hạt lipid màu vàng cam cấu tạo nên các điểm mắt (stigma). Chất dự trữ trong tế bào thuộc về nhiều dạng khác nhau: tinh bột ở tảo lục, floridean ở Tảo đỏ, laminarian ở Tảo nâu, leucosin ở Tảo roi Prymnesiophyta, fructosan ở Tảo lục Acetabularia... Ngoài ra còn có các chất dự trữ phân tử thấp như đường, glycoside, polyol... Tảo có không bào co rút (contractile vacuoles) giúp cho việc duy trì nước trong tế bào và loại bỏ chất thải ra khỏi tế bào.

Nhân tế bào ở tảo cũng không khác mấy so với các tế bào nhân thực khác nhưng hầu hết là nhân đơn bội. Tảo silic và các pha bào tử thể ở Tảo nâu, Tảo lục và một số Tảo đỏ có nhân lưỡng bội. Nhân có màng kép bao bọc, trong nhân có ADN.

6. THỰC HÀNH: QUAN SÁT HÌNH THÁI VI SINH VẬT

@ Mục tiêu bài thực hành: Sau khi học xong, người học có khả năng

- Thực hiện thành thạo kỹ năng sử dụng kính hiển vi
- Làm được một số tiêu bản tạm thời.
- Phân biệt được các dạng vi sinh vật dưới kính hiển vi và trong tranh vẽ, đoạn phim

@ Chuẩn bị đồ dùng và phương tiện thực hành

- Kính hiển vi, la men, lam kính
- Nước hồ
- Một số thực phẩm bị mốc: Bánh mì, cam, sữa chua

@ Đánh giá bài thực hành

Đánh giá bài thực hành dựa vào các tiêu chí sau:

- Tiêu chí 1: Cách sử dụng kính hiển vi
- Tiêu chí 2: Thực hiện các bước trong quá trình lấy giống để làm tiêu bản .
- Tiêu chí 3: Thực hiện các bước làm tiêu bản tạm thời
- Tiêu chí 4: Chỉnh kính hiển vi, quan sát được vi sinh vật dưới kính hiển vi ở vật kính x10, x40 rõ ràng, thực hiện các yêu cầu trong bài thực hành.
- Tiêu chí 5: Hình vẽ các vi sinh vật đã quan sát, phần điền thông tin còn thiếu ở bảng 1.1
- Tiêu chí 6: An toàn lao động, vệ sinh phòng học, dụng cụ, vệ sinh cá nhân trước và sau khi thực hành.

6.1. SỬ DỤNG KÍNH HIỂN VI QUANG HỌC

6.1.1. Khái niệm

Kính hiển vi quang học là một dụng cụ quang học hỗ trợ cho mắt gồm có nhiều lăng kính với các độ phóng đại khác nhau, có tác dụng làm tăng góc trông ảnh của những vật rất nhỏ mà ta không thể nhìn thấy được bằng mắt thường.

6.1.2. Cấu tạo

Hệ thống giá đỡ gồm: Bệ, thân, Revolve mang vật kính, bàn để tiêu bản, kẹp tiêu bản.

Hệ thống phóng đại : (1) Thị kính: là 1 bộ phận của kính hiển vi mà người ta để mắt và để soi kính, có 2 loại ống đôi và ống đơn. (Bản chất là một thấu kính hội tụ có tiêu cự rất ngắn, dùng để tạo ra ảnh thật của vật cần quan sát) (2) Vật kính: là 1 bộ phận của kính hiển vi quay về phía có vật mà người ta muốn quan sát, có 3 độ phóng đại chính của vật kính: x10, x40, x100. (Bản chất là một thấu kính hội tụ có tiêu cự ngắn, đóng vai trò như kính lúp để quan sát ảnh thật).



Hình 1.28. Kính hiển vi quang học

Hệ thống chiếu sáng: (1) Nguồn sáng (gương hoặc đèn), (2) Màn chắn, được đặt vào trong tụ quang dùng để điều chỉnh lượng ánh sáng đi qua tụ quang, (3) Tụ quang, dùng để tập trung những tia ánh sáng và hướng luồng ánh sáng vào tiêu bản cần quan sát. Vị trí của tụ quang nằm ở giữa gương và bàn để tiêu bản. Di chuyển tụ quang lên xuống để điều chỉnh độ chiếu sáng.

Hệ thống điều chỉnh: Ốc vĩ cấp, ốc vi cấp, ốc điều chỉnh tụ quang lên xuống, ốc điều chỉnh độ tập trung ánh sáng của tụ quang, núm điều chỉnh màn chắn, ốc di chuyển phiến kính mang tiêu bản (trước, sau, trái, phải)

6.1.3. Thực hành: Cách sử dụng kính hiển vi

Bước 1: Đặt tiêu bản lên bàn để tiêu bản, dùng kẹp để giữ tiêu bản, nhỏ 1 giọt dầu soi để soi chìm trên phiến kính khi soi vật kính x100.

Bước 2: Chọn vật kính

Tùy theo mẫu tiêu bản và mục đích quan sát để chọn vật kính thích hợp.

Bước 3: Điều chỉnh ánh sáng.

Điều chỉnh tụ quang: đối với vật kính x10 hạ tụ quang đến tận cùng, vật kính x40 để tụ quang ở đoạn giữa, vật kính x100.

Điều chỉnh cỡ màn chắn tương ứng với vật kính.

Hạ vật kính sát vào tiêu bản (mắt nhìn tiêu bản).

Bước 4: Mắt nhìn thị kính, tay vặn ốc vĩ cấp để đưa vật kính lên cho đến khi nhìn thấy hình ảnh mờ của vi trường. Điều chỉnh ốc vĩ cấp để được hình ảnh rõ nét.

6.1. 4. Bảo quản kính hiển vi

Sử dụng và bảo quản kính hiển vi một cách thận trọng.

Đặt kính ở nơi khô thoáng, vào cuối ngày làm việc đặt kính hiển vi vào hộp có gói hút ẩm silicagel để tránh bị mốc.

Lau hệ thống giá đỡ hàng ngày bằng khăn lau sạch, lau vật kính dầu bằng giấy mềm chuyên dụng có tấm xylen hoặc cồn.

Bảo dưỡng, mở kính lau hệ thống chiếu sáng phía trong định kỳ.

6.2. QUAN SÁT TẾ BÀO VI SINH VẬT

6.2.1. Làm tiêu bản, quan sát vi sinh vật dưới kính hiển vi.

6.2.1.1. Quan sát vi khuẩn bằng tiêu bản cố định

Bước 1: Quan sát một số tiêu bản vi khuẩn

Bước 2: Mô tả hình dạng ngoài, vẽ hình các vi khuẩn đã quan sát được

Bước 3: Định danh vi khuẩn theo hình thái ngoài đã quan sát.

6.2.1.2. Phương pháp làm tiêu bản tạm thời:

*** Các đặc điểm của tiêu bản tạm thời:**

Thao tác làm tiêu bản đơn giản, tiến hành nhanh.

Quan sát được trạng thái sống của tế bào như: sự chuyển động của tiên mao, sự sinh sản, sự hình thành bào tử...

Tiêu bản loại này chỉ sử dụng một lần rồi bỏ đi.

(1) Cách lấy giống để làm tiêu bản

Muốn làm bất kỳ một loại tiêu bản nào về vi sinh vật cũng phải thực hiện các thao tác lấy giống vi sinh vật để làm vết bôi trên tiêu bản. Các thao tác như sau:

Bước 1: Đốt đèn cồn, đặt ống giống có vi sinh vật vào giữa ngón cái và ngón trỏ của bàn tay trái, lòng bàn tay ngửa ra. Ống nghiệm để hơi nghiêng nhưng không được để canh trường vi sinh vật chạm vào nút bông.

- Bước 2: Tay phải dùng que cấy và vô trùng bằng cách hơ trên ngọn lửa đèn cồn. Để que cấy thẳng đứng trên ngọn lửa đèn cồn cho đến khi đầu que cấy nóng đỏ rồi từ từ đặt và di chuyển que cấy theo chiều nằm ngang trên ngọn lửa.
- Bước 3: Kẹp nút bông vào giữa ngón út và lòng bàn tay phải, xoay nhẹ nút bông 1 vòng và kéo nút ra. Giữ nguyên nút bông như vậy cho đến khi đẩy nút vào.
- Bước 4: Đốt miệng ống nghiệm trên ngọn đèn cồn. Khéo léo đưa que cấy (đã vô trùng) vào ống giống để lấy giống và nhẹ nhàng đưa que cấy ra.
Nếu ống giống là môi trường lỏng chỉ cần nhúng đầu que cấy vào canh trường rồi rút ra.
Nếu ống giống là môi trường đặc thì dùng que cấy lấy một chút sinh khối vi sinh vật trên mặt thạch và hoà đều vào giọt nước cất vô trùng trên phiến kính. Chú ý thao tác hết sức nhẹ nhàng để lấy giống mà không cấy mặt thạch lên.
- Bước 5: Đốt miệng ống nghiệm, đậy ống nghiệm nghiệm lại và để ống vào giá. Đưa giọt canh trường (hoặc sinh khối) vi sinh vật ở đầu que cấy đặt vào giữa phiến kính để làm vết bôi.
- Bước 6: Khử trùng lại que cấy trên ngọn đèn cồn rồi cất vào giá.

(2) Làm tiêu bản giọt ép

- Bước 1: Nhỏ một giọt nước cất lên phiến kính sạch. Dùng que cấy hay pipet lấy một ít tế bào (ở khuẩn lạc) hay một giọt dịch nghiên cứu đặt vào giọt nói trên. Huyền phù vi sinh vật tạo nên trong giọt nước phải không quá đục, vì nếu đục thì rất khó quan sát.
- Bước 2: Lấy một lá kính mỏng đặt lên giọt dịch đó thật cẩn thận sao cho không tạo thành bọt khí. Muốn quan sát lâu thì dùng vazolin bôi quanh mép lá kính để cho giọt dịch khỏi khô.
- Bước 3: Đưa tiêu bản lên quan sát trên kính hiển vi, vẽ hình, định danh vi sinh vật.

(3) Làm tiêu bản giọt treo:

Loại tiêu bản này dùng để theo dõi sự sinh sản, sự hình thành bào tử, khả năng di động và phản ứng của tế bào vi sinh vật với các loại kích thích. Dùng một loại phiến kính đặc biệt có một chỗ lõm hình tròn ở chính giữa.

- Bước 1: Lấy vazolin bôi quanh phần lõm của phiến kính (Vazolin giúp cho lá kính đỡ xô dịch và giữ cho giọt dịch khỏi khô)
- Bước 2: Nhỏ một giọt dịch nghiên cứu lên chính giữa lá kính rồi lật ngược nhanh xuống để cho giọt dịch nằm ở phía dưới lá kính.
- Bước 3: Đặt nhẹ nhàng lá kính lên trên chỗ lõm của phiến kính tránh không cho giọt dịch nghiên cứu chạm vào thành hoặc đáy chỗ lõm.
- Bước 4: Đưa tiêu bản lên quan sát trên kính hiển vi vẽ hình, định danh vi sinh vật.

(4) Quan sát các đặc điểm sinh học của vi khuẩn (Bacteria)

Các đặc trưng sinh học cần quan sát ở vi khuẩn: Các kiểu hình dạng của tế bào, khả năng di động, khả năng hình thành bào tử

Cách quan sát: Làm tiêu bản cố định nhuộm màu với bực rắng để quan sát vi khuẩn Vibrio, Spirochae, Spirillum.

Chú ý: dùng tăm lấy bực rắng làm vết bôi, lấy bực rắng vừa phải, dàn đều mới quan sát được, quan sát ở vật kính X40 và X100 bằng dầu soi

Yêu cầu: Vẽ hình các dạng xoắn khác nhau của vi khuẩn (xoắn từ 1 vòng đến nhiều vòng)

(5) Quan sát đặc điểm sinh học của nấm mốc (Molds)

Các đặc điểm sinh học đặc trưng cần quan sát: Đặc điểm của sợi nấm về màu sắc, có vách ngăn hay không; hình dạng, cấu tạo, cách sắp xếp của bào tử

Cách quan sát: Làm tiêu bản nấm mốc không nhuộm màu

Bước 1: Nhỏ 1 giọt lactophenol lên lame

Bước 2: Dùng que cấy lấy khuẩn lạc nấm Penicillum hoặc Aspergillus niger và dàn mỏng

Bước 3: Đặt lamelle và quan sát ở vật kính X10 và X40

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

(6) Quan sát vi sinh vật trong dung dịch nước ao hồ.

Các đặc điểm sinh học đặc trưng cần quan sát: xác định các loài vi sinh vật có trong dung dịch quan sát, hình dạng, cấu tạo, di chuyển hay không ...

Cách quan sát: Làm tiêu bản giọt treo và tiêu bản giọt ép với dung dịch nước ao, hồ...

Yêu cầu: Vẽ hình và nhận xét chung hình dạng của các loài vi sinh vật đã quan sát (động vật nguyên sinh, tảo...)

6.2.2. Nhận dạng một số vi sinh vật qua hình ảnh, đoạn phim ngắn.

Quy trình thực hiện

Stt		Tên vi sinh vật	Đặc điểm hình thái	Đặc điểm cấu tạo	Môi trường sống	Ghi chú
Hình 1 Điền tên loài	a					
	b					
	c					
	...					
Hình 2	a					
	b					
	...					
....	...					

Hình n						
Đoạn phim	1					
	2					

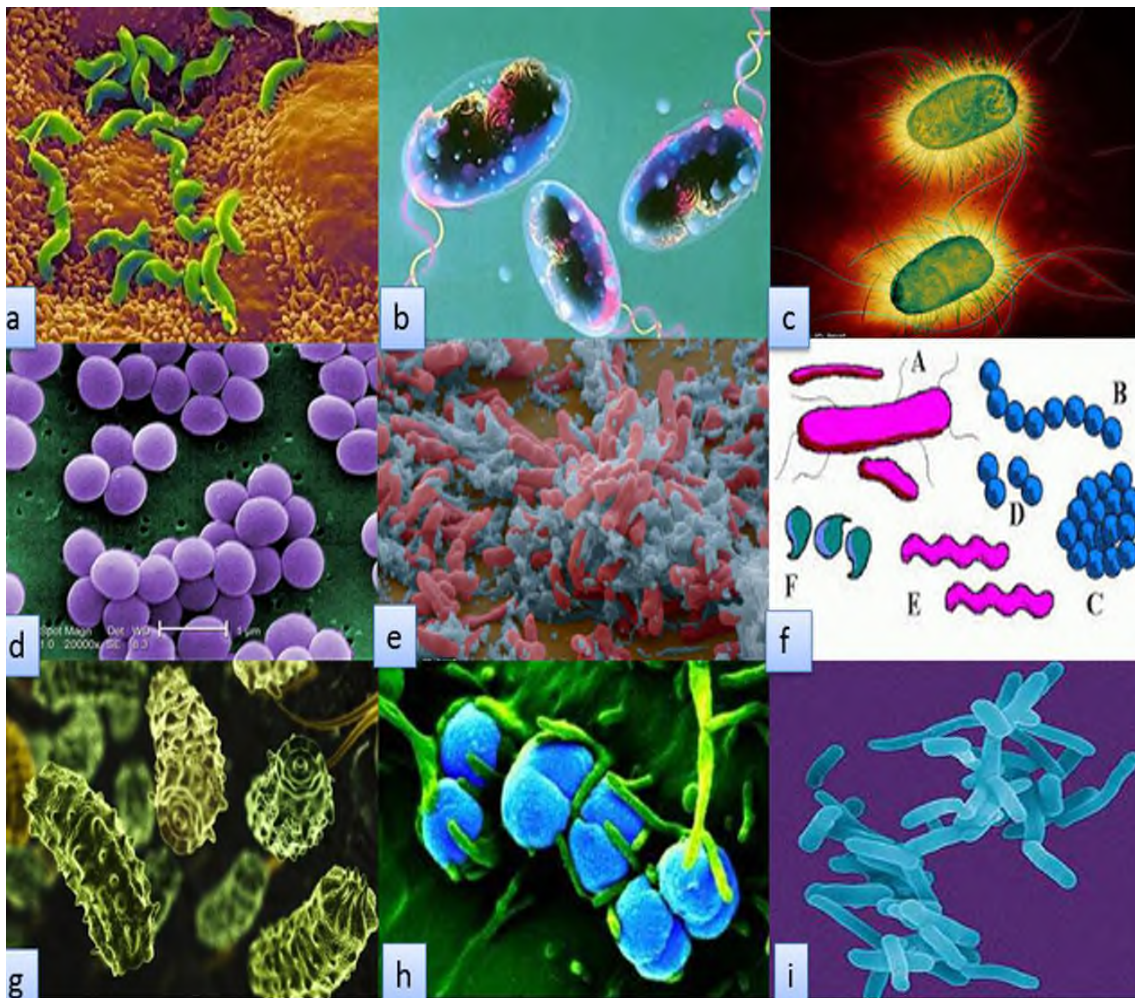
Bảng 1.1. Phiếu thực hành số 1

Bước 1: Quan sát một số hình vi sinh vật (hình 1.28, 1.29, 1.30...)

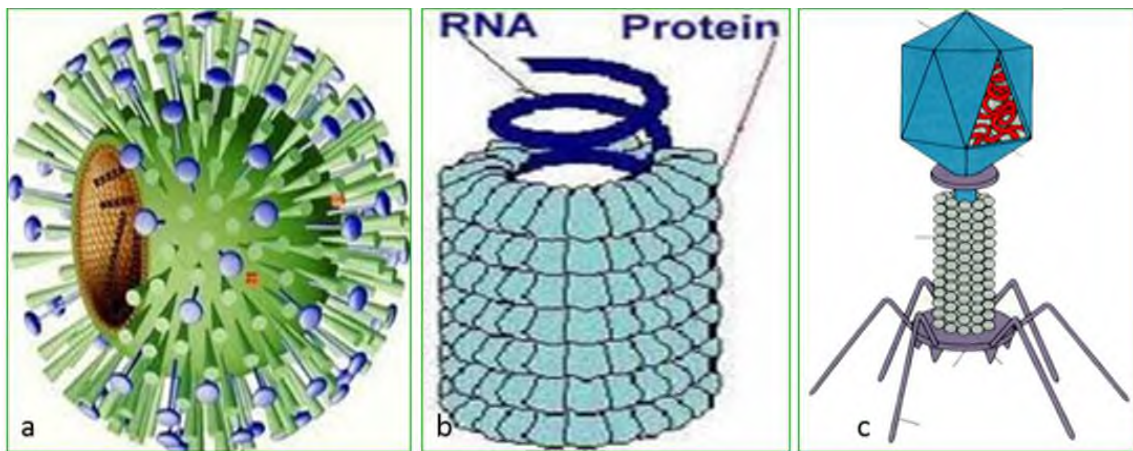
Bước 2: Phân biệt các dạng vi sinh vật vừa quan sát

- Mô tả hình dạng, cấu tạo ngoài của các vi sinh vật đã quan sát
- Nhận dạng, định danh các vi sinh vật đã quan sát

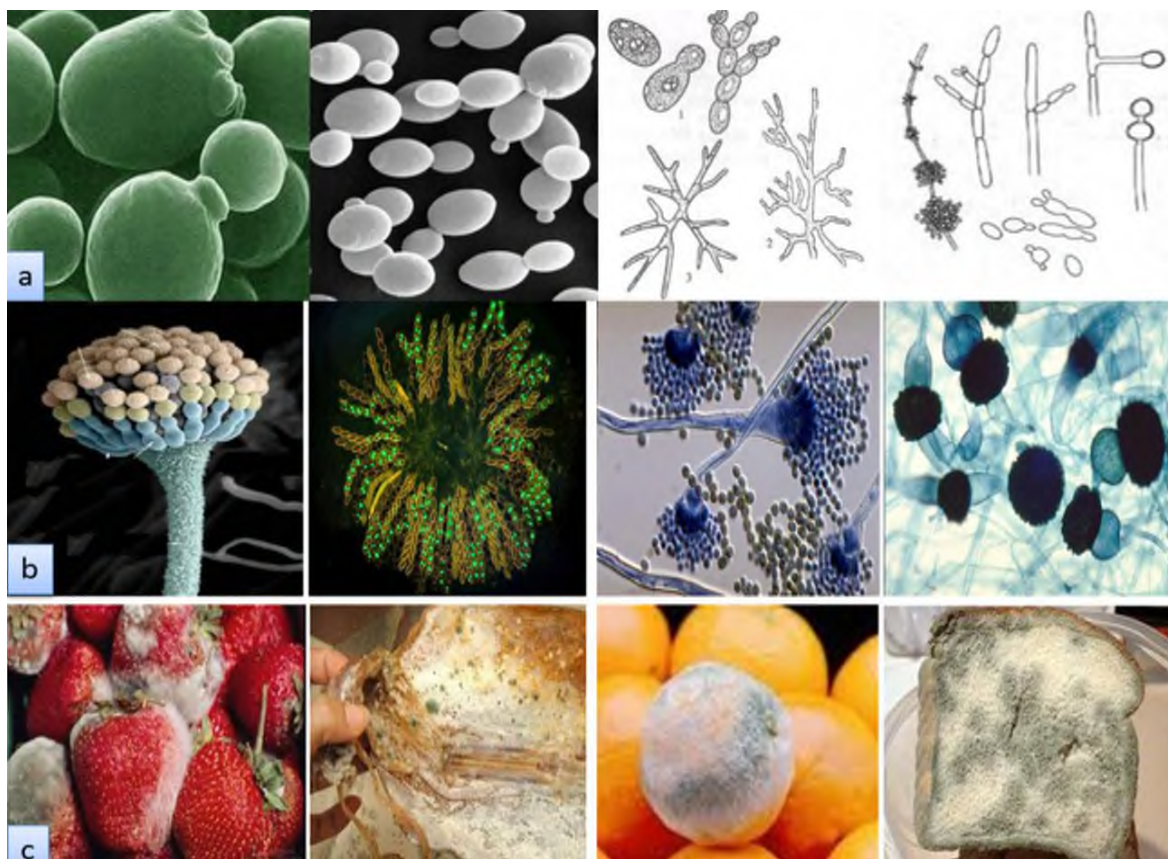
Bước 3: Điền vào thông tin còn thiếu trong bảng 1.1.



**Hình
1.29.
Hình
thực
hành
số 1**



Hình 1.30. Hình thực hành số 2



Hình 1.31. Hình thực hành số 3

TÓM TẮT CHƯƠNG 1

Virut thường được gọi là hạt virut vì chúng chưa có cấu tạo tế bào, chứa những yếu tố di truyền là ADN hay ARN nằm trong một vỏ bọc protein và có thể có các hợp chất khác bao quanh bên ngoài vỏ. Virut sống ký sinh nội bào bắt buộc, vật chủ của virut bao gồm động vật, thực vật và vi khuẩn. Vì vậy virut cũng được phân loại theo vật chủ của tế bào mà chúng ký sinh là virut động vật, virut thực vật và virut vi khuẩn. Quá trình nhân lên của vi rút trong tế bào vật chủ mà làm tan tế bào chủ gọi là chu trình sinh tan hoặc không làm tan tế bào chủ gọi chu trình tiềm tan.

Vi khuẩn là nhóm vi sinh vật nhân sơ, không có màng nhân, đường kính của vi khuẩn dao động từ 0,2-2,0 μm , chiều dài cơ thể khoảng 2,0 - 8,0 μm ; có ba hình dạng chủ yếu là hình cầu, hình que và hình xoắn.; vi khuẩn có 3 hình thức sinh sản là phân đôi, nảy chồi và sinh sản bằng bào tử.

Xạ khuẩn là nhóm lớn vi khuẩn G⁺, hiếu khí, sống hoại sinh và có cấu tạo dạng sợi phân nhánh. Xạ khuẩn phân bố rất rộng rãi trong đất, tham gia vào quá trình chuyển hoá tự nhiên của nhiều hợp chất trong đất. Xạ khuẩn sinh sản có 4 hình thức là sinh sản dinh dưỡng bằng đoạn sợi, bằng sự nảy chồi phân nhánh, bằng sự hình thành bào tử và sinh sản bằng phân cắt trực tiếp tế bào. Xạ khuẩn được ứng dụng trong công nghệ sản xuất thuốc kháng sinh.

Vi nấm là các tế bào sinh vật nhân thật, phân bố rất rộng rãi trong đất, nước và cả trong không khí; sống hoại sinh và ký sinh trên các sinh vật khác nên cũng là tác nhân gây bệnh cho người và động vật. Có 2 dạng là nấm sợi và nấm men.

Tảo là các vi sinh vật nhân thật có khả năng quang hợp bao gồm các loài tảo nước ngọt và tảo nước mặn. Tảo là nguồn thực phẩm quan trọng. Chlorophyll *a* có ở tất cả các loài tảo cùng với những sắc tố khác, các sắc tố này qui định màu sắc của loài tảo đó. Tảo có hình thái cơ thể rất đa dạng, thuộc sinh vật nhân thực.

CÂU HỎI ÔN TẬP

Câu 1: Tóm tắt đặc điểm về hình dạng, cấu tạo, phương thức sinh sản của các sinh vật sau: Vi khuẩn, vi rút, nấm, vi tảo, xạ khuẩn, vi khuẩn lam. Kể tên một số bệnh cây trồng do vi sinh vật gây ra.

Câu 2: So sánh các đặc điểm cấu tạo của vi khuẩn, vi khuẩn lam và xạ khuẩn?

Câu 3: Thực hiện các thao tác: Làm tiêu bản, quan sát, nhận dạng, vẽ hình được các loài vi sinh vật

CHƯƠNG 2. DINH DƯỠNG CỦA VI SINH VẬT

1. THÀNH PHẦN HOÁ HỌC CỦA TẾ BÀO VI SINH VẬT

Cơ sở vật chất cấu tạo nên tế bào vi sinh vật là các nguyên tố hoá học. Căn cứ vào mức độ yêu cầu của vi sinh vật đối với các nguyên tố này mà người ta chia ra thành các nguyên tố đa lượng và các nguyên tố vi lượng. Các nguyên tố chủ yếu bao gồm: C, H, O, N, P, S, K, Mg, Ca và Fe. Trong số này có 6 loại chủ yếu (chiếm đến 97% trọng lượng khô của tế bào vi sinh vật), đó là C, H, O, N, P và S. Các nguyên tố vi lượng thường là Zn, Mn, Na, Cl, Mo, Se, Co, Cu, W, Br và B. Tỷ lệ các nguyên tố hoá học tham gia cấu tạo tế bào vi sinh vật là không giống nhau ở các nhóm vi sinh vật khác nhau.

Các nguyên tố hoá học chủ yếu tồn tại trong tế bào vi sinh vật dưới dạng chất hữu cơ, chất vô cơ và nước. Chất hữu cơ thường bao gồm protein, carbon hydrat, lipid, acid nucleic, vitamin và các sản phẩm phân giải của chúng cũng như các chất trao đổi chất.

1.1. Nước

Nước chiếm đến 70 - 90% khối lượng cơ thể sinh vật. Tất cả các phản ứng xảy ra trong tế bào vi sinh vật đều đòi hỏi có sự tồn tại của nước. Ở vi khuẩn lượng chứa nước thường là 70 - 85%, ở nấm sợi thường là 85 - 90%.

Phần nước có thể tham gia vào các quá trình trao đổi chất của vi sinh vật được gọi là nước tự do. Đa phần nước trong tế bào vi sinh vật tồn tại ở dạng nước tự do. Nước kết hợp là phần nước liên kết với các hợp chất hữu cơ cao phân tử trong tế bào (protein, lipid, hidrat cacbon ...). Nước liên kết mất khả năng hoà tan và lưu động.

1.2. Các chất khoáng

Muối khoáng chiếm khoảng 2 - 5% khối lượng khô của tế bào. Chúng thường tồn tại dưới dạng các muối sunphat, photphat, cacbonat, clorua ... Trong tế bào chúng thường ở dạng các ion. Dạng cation chẳng hạn như Mg^{2+} , Ca^{2+} , K^{+} , Na^{+} ... Dạng anion như SO_4^{2-} , HCO_3^{-} , Cl^{-} ... Các ion trong tế bào vi sinh vật luôn tồn tại ở những tỷ lệ nhất định nhằm duy trì độ pH và lực thẩm thấu thích hợp cho từng loại vi sinh vật.

1.3. Chất hữu cơ

Chất hữu cơ trong tế bào vi sinh vật chủ yếu cấu tạo bởi các nguyên tố C, H, O, N, P, S ... Riêng 4 nguyên tố C, H, O, N chiếm 90 - 97% toàn bộ chất khô của tế bào, là các nguyên tố chủ chốt để cấu tạo nên protein, axit nucleic, lipid, hidrat cacbon. Trong tế bào vi khuẩn các hợp chất đại phân tử thường chiếm 96% khối lượng khô, các chất đơn phân tử chiếm 3,5% , các ion vô cơ 1% .

Protein được cấu tạo chủ yếu bởi các nguyên tố : C (50 - 55%), O (21 - 24%), N (15 - 18%), H (6,5 - 7,3%), S (0 - 0,24%), ngoài ra còn có thể có một lượng rất nhỏ các nguyên tố khác nhau P, Fe, Zn, Cu, Mn, Ca ... tùy số lượng axit amin liên kết với nhau mà có các dipeptit, tripeptit, tetrapeptit, pentapeptit ... Từ phân tử có 15 liên kết peptit trở lên ta gọi là polipeptit. Có lúc 1 protein được tạo thành do vài polipeptit liên kết lại với nhau.

Có 20 loại axit amin tham gia vào cấu trúc của protein, số gốc axit amin là rất lớn vì vậy có thể tạo ra được tới 2018 loại protein khác nhau (hiện đã biết rõ cấu trúc 3 chiều của khoảng trên 100 loại protein). Các protein này có thể được xếp loại theo hình dạng, theo cấu trúc hoặc theo chức năng.

Hydrat cacbon (cấu tạo bởi C, H, O), ở vi sinh vật có thể chia thành 3 nhóm: Monosaccarit bao gồm Pentozơ có ribozơ và deoxiribozơ; Hexozơ gồm glucozơ, fructozơ, galactozơ; Oligosaccarit gồm Disaccarit (saccarozơ, lactozơ, maltozơ ...) và Trisaccarit; Poligosaccarit bao gồm tinh bột, glixerin, dextrin, xenlulozơ, axit hialuronic ...

Lipit trong tế bào vi sinh vật thường có 2 nhóm: Lipit đơn giản và lipit phức tạp (lipoit). Lipit đơn giản (este của glixerin và axit béo) chủ yếu là triaxinglixerol. Lipit phức tạp gồm Photpholipit chủ yếu là photphoglixerit và Glicolipit bao gồm galactozylglixerit, sulfoglucozylglixerit ... Có những loại nấm men lượng lipit chứa tới 50 - 60% lipit. Photpholipit kết hợp với protein tạo thành lipoprotein tham gia vào cấu trúc của màng tế bào chất, màng ti thể ...

Vitamin: Có sự khác nhau rất lớn trong nhu cầu vitamin của vi sinh vật, vi sinh vật tự dưỡng chất sinh trưởng (auxoautotroph) có thể tự tổng hợp ra các vitamin cần thiết, nhiều loại vi sinh vật dị dưỡng chất sinh trưởng (auxoheterotroph) đòi hỏi phải cung cấp ít hoặc nhiều loại vitamin khác nhau.

2. CÁC KIỂU DINH DƯỠNG CỦA VI SINH VẬT

Dựa vào nguồn năng lượng người ta còn chia các kiểu dinh dưỡng của vi sinh vật ra các loại sau :

2.1. Dinh dưỡng quang năng (quang dưỡng)

Vi sinh vật thuộc nhóm này có khả năng sử dụng trực tiếp năng lượng của ánh sáng mặt trời. Thuộc nhóm này lại có 2 nhóm nhỏ :

2.1.1. Dinh dưỡng quang năng vô cơ (tự dưỡng quang năng).

Vi sinh vật thuộc nhóm này có khả năng dùng các chất vô cơ ngoại bào để làm nguồn cung cấp electron cho quá trình tạo năng lượng của tế bào. Thuộc nhóm này bao gồm các loại vi khuẩn lưu huỳnh. Chúng sử dụng các hợp chất lưu huỳnh làm nguồn cung cấp electron trong các phản ứng tạo thành ATP của cơ thể.

2.1.2. Dinh dưỡng quang năng hữu cơ:

Vi sinh vật thuộc nhóm này có khả năng dùng các chất hữu cơ làm nguồn cung cấp electron cho quá trình hình thành ATP của tế bào.

Vi sinh vật thuộc cả 2 nhóm trên đều có sắc tố quang hợp, chính nhờ sắc tố quang hợp mà vi sinh vật thuộc nhóm này có khả năng hấp thu năng lượng mặt trời, chuyển hoá thành năng lượng hoá học tích lũy trong phân tử ATP. Sắc tố quang hợp ở vi khuẩn không phải chlorofil như ở cây xanh mà bao gồm nhiều loại khác nhau như Bacterilchlorofil a, b, c, d ... mỗi loại có một phổ hấp thụ ánh sáng riêng.

2.2. Dinh dưỡng hoá năng (hoá dưỡng)

Vi sinh vật thuộc kiểu dinh dưỡng hoá năng có khả năng sử dụng năng lượng chứa trong các hợp chất hoá học có trong môi trường để tạo thành nguồn năng lượng của bản thân.

2.2.1. Dinh dưỡng hoá năng vô cơ

Vi sinh vật thuộc kiểu dinh dưỡng hoá năng vô cơ còn gọi là nhóm tự dưỡng hoá năng. Chúng có khả năng sử dụng năng lượng sinh ra trong quá trình ôxy hoá một chất vô cơ nào đó để đồng hóa CO_2 trong không khí tạo thành các chất hữu cơ của tế bào. Trong trường hợp này chất cho electron là chất vô cơ, chất nhận electron là oxy hoặc một chất vô cơ khác. Trong số các vi khuẩn hiếu khí thuộc nhóm này có *Nitrosomonas*, *Nitrobacter*, *Thiobacillus* ..., vi khuẩn kỵ khí gồm có : *Thiobacillus denitrificans*, *Micrococcus denitrificans* ...

2.2.2. Dinh dưỡng hoá năng hữu cơ

Vi sinh vật thuộc kiểu dinh dưỡng này còn gọi là nhóm dị dưỡng hoá năng. Chúng sử dụng hợp chất hữu cơ trong môi trường làm cơ chất oxy hoá sinh năng lượng. Trong trường hợp này, chất cho electron là chất hữu cơ. Chất nhận electron của những vi sinh vật hiếu khí là oxy, ở những vi sinh vật kỵ khí là chất hữu cơ hoặc vô cơ.

Kiểu dinh dưỡng	Nguồn năng lượng	Nguồn C chủ yếu	Ví dụ
1. Quang tự dưỡng	Ánh sáng	CO_2	Tảo, các VK quang hợp
2. Quang dị dưỡng	Ánh sáng	Chất hữu cơ	Vi khuẩn tía, vi khuẩn lục
3. Hoá tự dưỡng	- Chất vô cơ (NH_4^+ , NO_2^- , H_2 , H_2S , Fe^{2+} ...)	CO_2	Vi khuẩn nitrat hoá, vi khuẩn ôxi hoá lưu huỳnh, vi khuẩn hiđrô ...
4. Hoá dị dưỡng	Chất hữu cơ	Chất hữu cơ	Hầu hết vi sinh vật

Bảng 2.1. Các kiểu dinh dưỡng ở vi sinh vật

Ở trường hợp chất nhận electron là chất hữu cơ người ta thường gọi là quá trình lên men. Trường hợp chất nhận electron là chất vô cơ người ta mới chỉ phát hiện ở 2 loại vi khuẩn : vi khuẩn phản natri hoá, chất nhận điện tử là NO_3^- , vi khuẩn phản sunfat hoá, chất nhận điện tử là SO_4^{2-} . Hai trường hợp này còn gọi là hô hấp nitrat và hô hấp sunfat.

2.3. Dinh dưỡng cacbon của vi sinh vật

Trong tự nhiên cũng như trong phòng thí nghiệm, vi sinh vật luôn có những nhu cầu nhất định về năng lượng, nguồn cacbon, các chất dinh dưỡng và các chất cần thiết để đảm

bảo các điều kiện thích hợp về môi trường. Căn cứ vào nguồn cung cấp cacbon và năng lượng mà người ta chia vi sinh vật thành các nhóm sinh lí sau đây:

2.3.1. Vi sinh vật tự dưỡng Cacbon:

Là những vi sinh vật có khả năng tự tạo ra chất hữu cơ cho tế bào bằng cách tiết ra các enzym xúc tác tổng hợp C từ CO_2 . Lối dinh dưỡng của nhóm vi sinh vật này giống như ở cây xanh.

2.3.2. Vi sinh vật dị dưỡng Cacbon:

Là những vi sinh vật không có khả năng tổng hợp chất hữu cơ từ nguyên tử C. Chúng sử dụng C từ các hợp chất hữu cơ có sẵn. Đây là nhóm vi sinh vật chiếm đa số và có lối dinh dưỡng giống như ở động vật.

Tùy nhóm vi sinh vật mà nguồn cacbon được cung cấp có thể là chất vô cơ hoặc chất hữu cơ. Giá trị dinh dưỡng và khả năng hấp thụ các nguồn thức ăn cacbon của vi sinh vật khác nhau phụ thuộc vào 2 yếu tố: (1) thành phần hóa học và tính chất sinh lí của nguồn thức ăn, (2) đặc điểm sinh lí của từng loại vi sinh vật. Hầu như không có hợp chất cacbon hữu cơ nào mà không bị hoặc nhóm vi sinh vật này hoặc nhóm vi sinh vật khác phân giải. Vi sinh vật có khả năng tiết ra các enzym thủy phân để chuyển hóa những chất hữu cơ không tan được trong nước hoặc có khối lượng phân tử quá lớn thành hợp chất dễ hấp thụ như đường, acid amin, acid béo.

2.4. Dinh dưỡng nitơ của vi sinh vật

Một số vi sinh vật có khả năng khả năng chuyển hóa N_2 thành NH_3 nhờ hoạt động xúc tác của một hệ thống enzym có tên gọi là nitrogenaza. Người ta gọi các sinh vật này là sinh vật cố định nitơ còn quá trình này được gọi là quá trình cố định nitơ. Vi sinh vật có khả năng đồng hóa rất tốt nitơ chứa trong thức ăn hữu cơ nhưng không có khả năng hấp thụ trực tiếp các protein cao phân tử. Chỉ có các polipeptit chứa không quá 5 gốc axit amin mới có thể di chuyển trực tiếp qua màng tế bào chất của vi sinh vật. Rất nhiều vi sinh vật có khả năng sản sinh proteaza xúc tác việc phân hủy protein thành các hợp chất phân tử thấp có khả năng xâm nhập vào tế bào vi sinh vật.

Có những loại vi sinh vật không cần đòi hỏi phải được cung cấp bất kì loại axit amin nào Chúng có khả năng tổng hợp ra toàn bộ các axit amin mà chúng cần thiết từ NH_4^+ và các chất hữu cơ không chứa nitơ. Người ta gọi nhóm vi sinh vật này là nhóm tự dưỡng amin. Có những loại vi sinh vật ngược lại bắt buộc phải được cung cấp một hoặc nhiều axit amin mà chúng cần thiết. Chúng không có khả năng tự tổng hợp ra các axit amin này. Người ta gọi chúng là nhóm dị dưỡng amin. Loại thứ ba là loại các vi sinh vật không có các axit amin trong môi trường vẫn phát triển được, nhưng nếu có mặt một số axit amin nào đó thì sự phát triển của chúng sẽ được tăng cường hơn nhiều. Nhu cầu axit amin của các loại vi sinh vật rất khác nhau ngay cả các loài vi sinh vật rất giống nhau về hình thái và rất gần nhau về vị trí phân loại có thể đòi hỏi rất khác nhau về các axit amin. Các axit amin mà các cơ thể sinh vật đòi hỏi phải được cung cấp gọi là các axit amin không thay thế. Không có các axit amin không thay thế chung cho tất cả các vi sinh vật. Loại axit amin cần thiết với loài vi sinh vật này có thể là hoàn toàn không cần thiết với loài vi sinh vật khác.

Các vi khuẩn gây bệnh, vi khuẩn gây thối, vi khuẩn lactic sống trong sữa thường đòi hỏi phải được cung cấp nhiều axit amin có sẵn. Các loài vi khuẩn sống trong đất thường có khả năng tự tổng hợp tất cả các axit amin cần thiết đối với chúng. Nấm mốc, nấm men và xạ khuẩn cũng thường không đòi hỏi các axit amin có sẵn. Tuy nhiên sự có mặt của các axit amin trong môi trường sẽ làm nâng cao tốc độ phát triển của chúng. Vai trò của phân bón vi sinh vật trong phát triển nông nghiệp bền vững

4. THỰC HÀNH: PHƯƠNG PHÁP CỐ ĐỊNH TIÊU BẢN VÀ NHUỘM TÊ BÀO VI SINH VẬT

@ Mục tiêu bài

- Thực hiện được thành thạo kỹ năng cố định tiêu bản.
- Thực hiện thành thạo các phương pháp nhuộm vi sinh vật

@ Chuẩn bị đồ dùng và phương tiện thực hành

+ Thiết bị, dụng cụ

- Kính hiển vi
- Que cấy vô trùng, phiến kính sạch, kẹp gỗ, đèn cồn, chậu đựng nước rửa. pipet, giấy lọc cất nhỏ cỡ 2x3 cm, ống nghiệm.

+ Vật tư

- Thuốc nhuộm Fuchsin kiềm, xanh metylen, tím gentian, đỏ trung tính.
- Nước cất; rượu ethylic
- Các giống vi sinh vật: B.subtilis, E.Coli.
- Nấm men: Tốt nhất là dung dịch lên men, nếu không thay bằng bột bánh men tán nhỏ hoà với nước đường 10% trước 24h.
- Nấm mốc: Vỏ cam hay vỏ quýt hay bánh mì

@ Đánh giá bài thực hành

Đánh giá bài thực hành dựa vào các tiêu chí sau:

- Tiêu chí 1: Thực hiện các bước trong quá trình cố định tiêu bản .
- Tiêu chí 2: Thực hiện các bước làm tiêu bản nhuộm đơn
- Tiêu chí 3: Thực hiện các bước làm tiêu bản nhuộm gram
- Tiêu chí 4: Chỉnh kính hiển vi, quan sát được vi sinh vật dưới kính hiển vi ở vật kính x10, x40, x100 rõ ràng, thực hiện các yêu cầu trong bài thực hành.
- Tiêu chí 5: Hình vẽ các vi sinh vật đã quan sát.
- Tiêu chí 6: An toàn lao động, vệ sinh phòng học, dụng cụ, vệ sinh cá nhân trước và sau khi thực hành.

@ Nội dung thực hành

4.1. PHƯƠNG PHÁP CỐ ĐỊNH TIÊU BẢN

4.1.1. Các đặc điểm của tiêu bản cố định

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

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

4.1.2. Cách làm tiêu bản cố định

Bước 1: Làm vết bôi

Đặt một giọt nước sạch vào giữa phiến kính, sau đó dùng que cấy đã khử trùng lấy một vòng que cấy vi sinh vật cho vào giọt nước và dàn đều ra. Trường hợp nuôi cấy trên môi trường lỏng thì dùng pipet để lấy dung dịch nghiên cứu. Hơ khô phiến kính đã có vi sinh vật trên ngọn lửa đèn cồn hoặc để khô tự nhiên ta được một vết mờ trên phiến kính gọi là vết bôi.

Chú ý: Lượng vi sinh vật lấy vừa phải; vết bôi tròn, gọn, thật mỏng; các tế bào vi sinh vật được dàn đều, dễ quan sát.

Bước 2: Cố định vết bôi

Cố định vết bôi là gắn chặt vi sinh vào phiến kính để lúc nhuộm không bị rửa trôi. Có các cách cố định sau:

Cố định bằng nhiệt: Là phương pháp đơn giản và phổ biến nhất. Dùng kẹp gỗ để kẹp phiến kính, hơ mặt dưới của phiến kính qua lại trên ngọn lửa đèn cồn 2 – 3 lần (khoảng vài ba giây), tránh không để tiêu bản quá nóng.

Cố định bằng hoá chất: Cách này tuy phức tạp nhưng không gây biến dạng tế bào, không gây biến đổi cấu trúc tế bào và không làm đứt các tiên mao. Nhúng vết bôi vào rượu. Với rượu ethylic ngâm 5 – 15 phút, còn với rượu methylic ngâm 2 – 5 phút hoặc ngâm trong axeton 15 phút.

Sấy bằng hơi formol 10 – 15 giây.

4.1.3. Phương pháp nhuộm đơn

Nhuộm đơn là dùng 1 loại thuốc nhuộm để nhuộm vi sinh vật.

Các loại thuốc nhuộm thường dùng để nhuộm đơn là : Fuchsin kiềm, xanh metylen, tím gentian, đỏ trung tính.

Phương pháp nhuộm

Bước 1: Đặt tiêu bản đã cố định lên giá rồi nhỏ vài giọt thuốc nhuộm phủ kín vết bôi, để 1 – 2 phút.

Bước 2: Đổ thuốc nhuộm và rửa nhẹ bằng nước sạch tới khi nào thấy nước rửa chảy qua vết bôi không còn màu nữa là được.

Bước 3: Để tiêu bản khô dần hoặc thấm khô bằng giấy thấm. Khi tiêu bản khô hẳn đem quan sát dưới kính hiển vi.

Yêu cầu:

(1) Làm tiêu bản nhuộm đơn nấm men cấy trong môi trường xanh methylen, quan sát kính hiển vi ở vật kính x40 và x100. Vẽ hình chú thích màng tế bào chất, không bào của tế bào.

(2) Làm tiêu bản nhuộm đơn nấm mốc trong môi trường xanh methylen, vẽ hình cấu tạo sợi nấm và cơ quan sinh sản.

4.1.4. Phương pháp nhuộm Gram

Nguyên lý

Dựa trên sự khác nhau về cấu trúc của vách nên trong quá trình nhuộm Gram, vi khuẩn Gram dương sẽ giữ được phức hợp tím gentians-iod không bị tẩy màu bởi alcohol, trong khi vi khuẩn Gram âm không giữ được phức hợp này. Do vậy, kết quả sau khi nhuộm là vi khuẩn Gram dương vẫn giữ được màu tím của gentians, còn vi khuẩn Gram âm bắt màu hồng của fuchsin.

Giải thích tính bắt màu Gram của vi khuẩn

Gram dương dày từ 15 đến 50 nm, dạng lưới, cấu tạo bởi chất dày có khả năng giữ phức hợp tím gentians - iod. Trong khi đó, lớp vách tế bào peptidoglycan của các vi khuẩn Gram âm thì mỏng hơn và thường có thêm lớp màng lipopolysaccharde (LPS) bên ngoài.

Các bước tiến hành

Bước 1: Dàn tiêu bản và cố định tiêu bản

Dùng que cấy vô trùng lấy một ít vi khuẩn từ ống giống thạch nghiêng hoà vào 1 giọt nước muối sinh lý ở giữa phiến kính, để khô trong phòng thí nghiệm.

Cố định tiêu bản bằng cách hơi nhanh trên ngọn lửa đèn cồn 2-3 lần để gắn chặt vi khuẩn vào phiến kính. Việc cố định nhằm 3 mục đích: giết chết vi khuẩn, gắn chặt vi khuẩn vào phiến kính và làm vết bôi bắt màu tốt hơn vì các tế bào chết bắt màu tốt hơn các tế bào sống.

Bước 2: Nhuộm màu

(1) Nhuộm bằng dung dịch tím gentians trong 30 giây đến 1 phút, rửa nước;

(2) Nhuộm thêm dung dịch lugol và giữ trong 1 phút, rửa nước;

(3) Khử màu: Nhỏ dung dịch alcohol 90%, giữ khoảng 30 giây (cho đến khi vừa thấy mất màu), rửa nước.

(4) Nhuộm tiếp bằng dung dịch Fuchsin trong 1 phút, rửa nước, để khô.

* *Kết quả:* Quan sát ở vật kính dầu x100. Nếu nhuộm đúng vi khuẩn Gram dương bắt màu tím, Gram âm bắt màu hồng.

Yêu cầu: Làm tiêu bản nhuộm gram các giống vi sinh vật: B.subtilis, E.Coli. Vẽ hình, chú thích kết quả nhuộm gram.

TÓM TẮT CHƯƠNG 2

Các nguyên tố chủ yếu tham gia cấu tạo tế bào vi sinh vật bao gồm: C, H, O, N, P, S, K, Mg, Ca và Fe. Trong số này có 6 loại chủ yếu (chiếm đến 97% trọng lượng khô của tế bào vi sinh vật), đó là C, H, O, N, P và S. Các nguyên tố vi lượng thường là Zn, Mn, Na, Cl, Mo, Se, Co, Cu, W, Br và B. Tỷ lệ các nguyên tố hoá học tham gia cấu tạo tế bào vi sinh vật là không giống nhau ở các nhóm vi sinh vật khác nhau. Các nguyên tố hoá học chủ yếu tồn tại trong tế bào vi sinh vật dưới dạng chất hữu cơ, chất vô cơ và nước. Chất hữu cơ thường bao gồm protein, carbon hydrat, lipid, acid nucleic, vitamin và các sản phẩm phân giải của chúng cũng như các chất trao đổi chất.

Dựa vào nguồn năng lượng người ta còn chia các kiểu dinh dưỡng của vi sinh vật ra các loại: Dinh dưỡng quang năng (quang dưỡng) gồm dinh dưỡng quang năng vô cơ và dinh dưỡng quang năng hữu cơ; dinh dưỡng hoá năng (hoá dưỡng) gồm dinh dưỡng hoá

năng vô cơ và dinh dưỡng hoá năng hữu cơ; Dinh dưỡng cacbon của vi sinh vật gồm vi sinh vật tự dưỡng cacbon và vi sinh vật dị dưỡng cacbon và dinh dưỡng nitơ của vi sinh vật

CÂU HỎI ÔN TẬP

Câu 1. Trình bày các thành phần cơ bản cấu tạo nên cơ thể vi sinh vật .

Câu 2. Phân biệt các kiểu dinh dưỡng của vi sinh vật .

Câu 3. Thực hiện các thao tác cố định tiêu bản, các phương pháp nhuộm vi sinh vật: Nhuộm đơn, nhuộm gram. Vẽ hình, chú thích kết quả nhuộm.

CHƯƠNG 3. ẢNH HƯỞNG CỦA CÁC ĐIỀU KIỆN NGOẠI ĐỐI VỚI VI SINH VẬT VÀ SỰ PHÂN BỐ CỦA VI SINH VẬT TRONG TỰ NHIÊN

1. ẢNH HƯỞNG CỦA ĐIỀU KIỆN NGOẠI CẢNH ĐỐI VỚI VI SINH VẬT

1.1. ẢNH HƯỞNG CỦA CÁC NHÂN TỐ VẬT LÝ

1.1.1 Ảnh hưởng của độ ẩm

Hầu hết các quá trình sống của vi khuẩn có liên quan đến nước do đó độ ẩm là một yếu tố quan trọng của môi trường. Đa số vi khuẩn thuộc nhóm sinh vật ưa nước nghĩa là chúng cần nước ở dạng tự do, dễ hấp thụ. Khi thiếu nước sẽ xảy ra hiện tượng loại nước khỏi tế bào vi khuẩn, trao đổi chất bị giảm và tế bào chết. Một số khuẩn cầu G- rất mẫn cảm với sự khô hạn, bị chết trong môi trường thiếu nước sau vài giờ.

1.1.2 Ảnh hưởng của nhiệt độ

Hoạt động trao đổi chất của vi khuẩn có thể coi là kết quả của các phản ứng hóa học. Vì các phản ứng này phụ thuộc chặt chẽ vào nhiệt độ nên yếu tố nhiệt độ ảnh hưởng sâu sắc đến quá trình sống của tế bào. Tế bào thu được nhiệt chủ yếu từ môi trường bên ngoài, một phần cũng do cơ thể thải ra do kết quả của trao đổi chất. Hầu hết tế bào sinh dưỡng của vi sinh vật bị chết ở nhiệt độ cao protein bị biến tính, một hoặc hàng loạt enzym bị bất hoạt. Sự chết của vi khuẩn ở nhiệt độ cao cũng có thể còn là hậu quả của sự bất hoạt hóa ARN và sự phá hoại màng tế bào chất. Nhiệt độ thấp có thể làm bất hoạt quá trình vận chuyển các chất hòa tan qua màng tế bào chất.

Vi khuẩn thường chịu được nhiệt độ thấp. Ở nhiệt độ dưới điểm băng hoặc thấp hơn chúng không thể hiện hoạt động trao đổi chất rõ rệt. Nhiệt độ thấp có thể coi là yếu tố ức khuẩn nếu làm lạnh khá nhanh. Trong trường hợp làm lạnh dần xuống dưới điểm băng cấu trúc của tế bào bị tổn thương do các tinh thể được tạo thành nhưng kích thước nhỏ, do tế bào không bị phân hủy. Nếu làm lạnh trong chân không các tinh thể băng sẽ thăng hoa. Đó là phương pháp đông khô để bảo quản vi sinh vật.

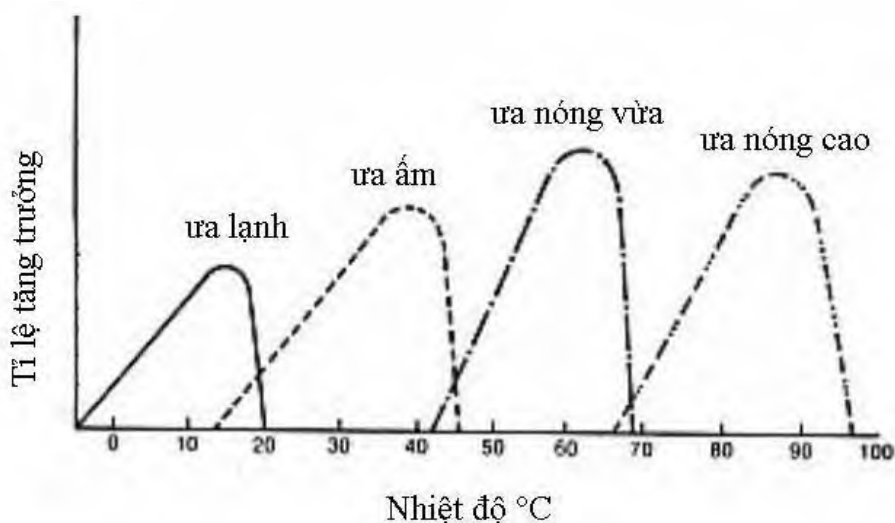
Giới hạn giữa nhiệt độ cực đại và nhiệt độ cực tiểu là vùng nhiệt sinh trưởng của vi sinh vật. Giới hạn này rất khác nhau giữa các loài vi khuẩn: tương đối rộng rãi ở các sinh vật hoại sinh, nhưng rất hẹp ở các vi khuẩn gây bệnh. Tùy theo quan hệ với vùng nhiệt có thể chia vi khuẩn thành một số nhóm.

Vi khuẩn ưa lạnh: Sinh trưởng tốt nhất ở nhiệt độ dưới 20°C, thường gặp trong nước biển, các hồ sâu và suối nước lạnh, chẳng hạn vi khuẩn phát quang, vi khuẩn sắt, hoạt tính trao đổi chất của các vi khuẩn này thấp. Trong điều kiện phòng thí nghiệm nhiều vi khuẩn ưa lạnh dễ dàng thích ứng với nhiệt độ cao hơn.

Vi khuẩn ưa ấm: Chúng chiếm đa số, cần nhiệt độ trong khoảng 20°C đến 40°C. Ngoài các dạng hoại sinh ta còn gặp các loài kí sinh, gây bệnh cho người và động vật, chúng sinh trưởng tốt nhất ở 37°C ứng với nhiệt độ của cơ thể người và động vật. Vi khuẩn

ưa ấm ra thành hai nhóm: nhóm ưa nhiệt độ phòng (khoảng 25°C) và nhóm ưa thân nhiệt (khoảng 37°C).

Vi khuẩn ưa nóng: Nhóm sinh trưởng tốt nhất ở 55°C . Một số không sinh trưởng ở nhiệt độ dưới 30°C . Nhiệt độ sinh trưởng cực đại của các vi khuẩn ưa nóng dao động giữa $75-80^{\circ}\text{C}$ (hình 3.1). Các vi sinh vật ưa nóng gồm chủ yếu là các xạ khuẩn, các vi khuẩn sinh bào tử, thanh tảo và nấm mốc. Thường gặp chúng trong suối nước nóng, trong phân ủ.



Hình 3.1. Nhiệt độ sinh trưởng của các nhóm vi khuẩn ưa ấm và ưa nóng

1.1.3. Ảnh hưởng của ánh sáng

Ánh sáng có thể gây ra những tổn thương sinh học cho tế bào vi sinh vật. Ngoại lệ có các vi khuẩn quang hợp sử dụng ánh mặt trời làm nguồn năng lượng. Mức độ gây hại của ánh sáng phụ thuộc vào mức năng lượng trong lượng tử ánh sáng được hấp thụ. Mức năng lượng trong lượng tử lại phụ thuộc gián tiếp vào chiều dài sóng của tia chiếu. Các tia vũ trụ, tia gamma và tia X có năng lượng rất lớn.

So với các tia sáng khác thì tia tử ngoại có năng lượng nhỏ hơn. Tác dụng mạnh nhất của tia tử ngoại là ở vùng có chiều dài sóng khoảng 260 nm nghĩa là vùng hấp thụ cực đại của các axit nucleic và nucleoprotein. Dưới ảnh hưởng của tia tử ngoại vi khuẩn bị chết hoặc bị đột biến tùy theo loài vi khuẩn và liều lượng tia tử ngoại chiếu vào. Ngoại trừ bào tử của mốc có sức đề kháng cao. Dưới tác dụng của tia tử ngoại các nhánh timin của chuỗi ADN xuất hiện các liên kết cộng hóa trị. Quá trình dime-hóa timin như vậy một phần hoặc hoàn toàn ức chế sự nhân đôi của ADN. Tia ánh sáng mặt trời tuy có chứa một phần tia tử ngoại nhưng phần lớn tia này bị khí quyển giữ lại. Vì vậy ánh sáng có tác dụng diệt khuẩn nhỏ hơn so với tia tử ngoại dùng trong phòng thí nghiệm.

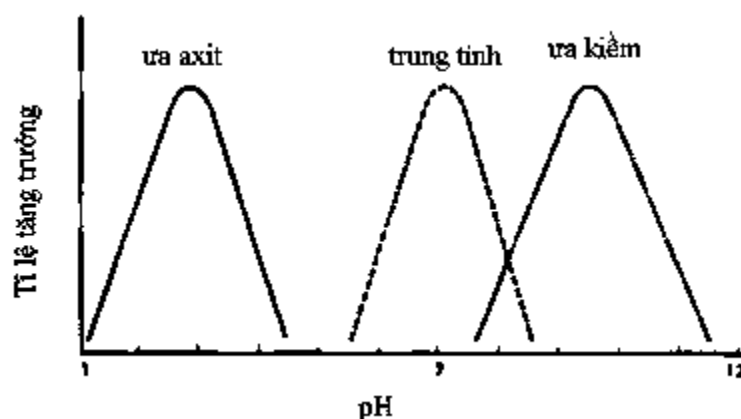
1.1.4. Ảnh hưởng của nồng độ chất tan trong môi trường

Nồng độ chất tan trong môi trường nuôi cấy ảnh hưởng lớn đến sinh trưởng phát triển của vi sinh vật. Đa số vi khuẩn sinh trưởng tốt trong môi trường chứa ít hơn 2% muối, nồng độ cao hơn có hại cho tế bào. Nhưng cũng có một số vi khuẩn lại sinh trưởng tốt nhất trong môi trường chứa tới 30% muối gọi là các vi khuẩn ưa muối.

1.2. ẢNH HƯỞNG CỦA CÁC NHÂN TỐ HÓA HỌC

1.2.1 Ảnh hưởng của pH môi trường

có ý
sự
sinh
là hai
trong
biên
chúng
hưởng
Cho
thích



pH của môi trường
nghĩa quyết định đối với
sinh trưởng của nhiều vi
vật. Các ion H^+ và OH^-
ion hoạt động lớn nhất
tất cả các ion. Những
đổi về nồng độ của
dù nhỏ cũng có ảnh
mạnh mẽ đến vi sinh vật.
nên việc xác định pH
hợp và việc duy

Hình 3.2 Các giá trị pH thích hợp cho các nhóm vi sinh vật

pH cần thiết trong thời gian sinh trưởng của tế bào là rất quan trọng. Các giá trị pH cực tiểu, tối thích và cực đại cần cho sự sinh trưởng và sinh sản của vi khuẩn tương ứng với các giá trị pH cần cho hoạt động của nhiều enzym. Giới hạn pH hoạt động đối với vi sinh vật ở trong khoảng 4-10. Đa số vi khuẩn sinh trưởng tốt ở pH 7 ví dụ như nhiều vi khuẩn gây bệnh do môi trường tự nhiên là máu và bạch huyết của cơ thể động vật phát triển tốt ở pH khoảng 7,4 (hình 3.2). Các vi khuẩn nitrat hoá, vi khuẩn nốt sần, xạ khuẩn, vi khuẩn phân giải urê ưa môi trường hơi kiềm. Một số vi khuẩn chịu axit như vi khuẩn lactic hay

acetobacter, một số khác ưa axit như *Acetobacter acidophilus*, *Thiobacillus thiooxydans* có thể oxy hóa lưu huỳnh thành H_2SO_4 . Chúng có thể sinh trưởng ở $pH < 1$. Nấm sợi và nấm men lại ưa axit ($pH\ 4-6$).

pH của môi trường không những ảnh hưởng mạnh đến sinh trưởng mà còn tác động sâu sắc đến các quá trình trao đổi chất. Màng tế bào chất của vi sinh vật tương đối ít thấm đối với các ion H^+ và OH^- . Vậy mặc dù pH của môi trường bên ngoài dao động trong giới hạn rộng, nồng độ của hai ion nói trên trong tế bào chất nói chung vẫn ổn định. Ảnh hưởng của pH môi trường lên hoạt động của vi sinh vật có thể là do tác động qua lại giữa ion H^+ và enzym chứa trong màng tế bào chất và thành tế bào.

1.2.2 Ảnh hưởng của các chất độc hóa học

Các chất diệt khuẩn thường dùng nhất là phenol và các hợp chất của phenol, các ancol, halogen, kim loại nặng, H_2O_2 , các thuốc nhuộm, xà phòng và các chất tẩy rửa tổng hợp của các muối amon bậc bốn.

Phenol được dùng ở dạng dung dịch nước để sát trùng các dụng cụ bị nhiễm khuẩn. Tùy theo nồng độ mà phenol có tác dụng diệt khuẩn hay ức khuẩn. Hoạt tính của phenol bị giảm trong môi trường kiềm và có mặt chất hữu cơ. Trái lại tăng lên khi có mặt muối. Bào tử của vi sinh vật kháng với tác dụng của phenol. Một số dẫn xuất của phenol như crezol và các hợp chất của phenol và hexachlorephen có hoạt tính mạnh hơn phenol. Hexachlorephen được dùng phối hợp với xà phòng để sát trùng da. Phenol và crezol tác dụng chủ yếu lên các lớp màng tế bào, phá hoại tính bán thấm của tế bào chất và làm biến tính protein.

Etanol thường được dùng để sát trùng da. Etanol không có tác dụng với bào tử. Metanol có tác dụng diệt khuẩn kém hơn etanol. Tác dụng diệt khuẩn của ancol tăng theo sự tăng sinh khối phân tử. Các ancol có khối lượng phân tử cao hơn thường khó tạo hỗn hợp trong nước nên không thể dùng để sát trùng. Propilancol và izopopanl ở nồng độ 40-80% được dùng để sát trùng da. Ancol tác dụng bằng cách gây đông tụ protein. Nhưng ancol dưới nồng độ cao khử nước mạnh, do đó rút nước khỏi tế bào, cản trở sự xâm nhập của ancol vào trong tế bào vì vậy chỉ có tác dụng ức khuẩn (etanol 70% có tác dụng sát trùng mạnh hơn etanol 90%).

Các halogen tác dụng độc đối với vi khuẩn. Khí clo dùng để sát trùng nước. Các hợp chất của clo như cloramin cũng có tác dụng diệt khuẩn. Tác dụng diệt khuẩn của clo và các hợp chất của clo là do việc hình thành axit clohidric và oxi. Oxi ở trạng thái vừa sinh ra là một chất oxy hóa mạnh do tác dụng của oxi các thành phần của tế bào bị phá hủy.

1.3. ẢNH HƯỞNG CỦA CÁC NHÂN TỐ SINH HỌC

Giữa các cá thể trong cùng một cộng đồng vi sinh vật sống cũng tồn tại những quan hệ tương hỗ về nhiều mặt có thể kích thích (trợ giúp) hoặc kiềm hãm (đối kháng) lẫn nhau. Có ý nghĩa rất quan trọng là sự cạnh tranh dinh dưỡng của sinh vật, kể cả giữa chúng với nhau cũng như với các sinh vật khác. Bản thân vi sinh vật cũng bị các động vật bậc thấp sử dụng làm thức ăn. Bản thân vi sinh vật cũng bị virus, vi khuẩn và nấm tấn công ví dụ như trong trường hợp thể thực khuẩn tấn công vào tế bào vi khuẩn và phá hủy chúng.

1.3.1. Quan hệ cộng sinh

Quan hệ cộng sinh là quan hệ hai bên cùng có lợi, bên này không thể thiếu bên kia trong quá trình sống. Ở vi sinh vật người ta ít quan sát thấy quan hệ cộng sinh. Có một số giả thiết cho rằng: Ty thể - cơ quan hô hấp của tế bào vi nấm chính là một vi khuẩn cộng sinh với vi nấm. Giả thiết đó dựa trên cấu tạo của ty thể có cả bộ máy ADN riêng biệt, có thể tự sao chép như một cơ thể độc lập. Giả thiết này còn chưa được công nhận hoàn toàn. Lại có giả thiết cho rằng: Các plasmid có trong vi nấm và vi khuẩn chính là sự cộng sinh giữa virus và vi nấm hay vi khuẩn đó. Ví dụ như các plasmid mang gen kháng thuốc đã mang lại mối lợi cho vi khuẩn chủ là kháng được thuốc kháng sinh. Vì thế mà hai bên cùng có

lợi và gọi là quan hệ cộng sinh.

1.3.2. Quan hệ hỗ sinh

Quan hệ hỗ sinh là quan hệ hai bên cùng có lợi nhưng không nhất thiết phải có nhau mới sống được như quan hệ cộng sinh. Quan hệ này thường thấy trong sự sống của vi sinh vật vùng rễ. Ví dụ như mối quan hệ giữa nấm mốc phân huỷ tinh bột thành đường và nhóm vi khuẩn phân giải loại đường đó. Mối quan hệ giữa nhóm vi khuẩn phân giải photpho và nhóm vi khuẩn phân giải protein cũng là quan hệ hỗ sinh, trong đó nhóm thứ nhất cung cấp P cho nhóm thứ hai và nhóm thứ hai cung cấp N cho nhóm thứ nhất.

1.3.3. Quan hệ kháng sinh

Quan hệ kháng sinh là mối quan hệ đối kháng lẫn nhau giữa hai nhóm vi sinh vật. Loại này thường tiêu diệt loại kia hoặc hạn chế quá trình sống của nó. Ví dụ điển hình là xạ khuẩn kháng sinh và nhóm vi khuẩn mẫn cảm với chất kháng sinh do xạ khuẩn sinh ra. Khi nuôi cấy 2 nhóm này trên môi trường thạch đĩa, ta có thể thấy rõ hiện tượng kháng sinh: xung quang nơi xạ khuẩn có một vòng vô khuẩn, tại đó vi khuẩn không mọc được. Người ta căn cứ vào đường kính của vòng vô khuẩn đó mà đánh giá khả năng sinh kháng sinh của xạ khuẩn.

1.3.4 Quan hệ ký sinh

Quan hệ ký sinh là hiện tượng vi sinh vật này sống ký sinh trên vi sinh vật, hoàn toàn ăn bám và gây hại cho vật chủ. Ví dụ như các loại virus sống ký sinh trong tế bào vi khuẩn hoặc một vài loài vi khuẩn sống ký sinh trên vi nấm. Các loại vi khuẩn cố định nitơ cộng sinh thường hay bị một loại thực khuẩn thể ký sinh và tiêu diệt. Khi nuôi cấy vi khuẩn *Rhizobium* trên môi trường dịch thể thường có hiện tượng môi trường đang đục trở nên trong. Nguyên nhân là do thực khuẩn thể xâm nhập và làm tan tất cả các tế bào vi khuẩn - gọi là hiện tượng sinh tan. Khi nuôi cấy vi khuẩn trên môi trường đặc cũng có hiện tượng như vậy. Các thực khuẩn thể này tồn tại ở trong đất trồng cây họ Đậu làm ảnh hưởng rất lớn đến quá trình hình thành nốt sần ở cây Đậu.

2. SỰ PHÂN BỐ CỦA VI SINH VẬT TRONG TỰ NHIÊN

2.1. Sự phân bố của vi sinh vật trong đất

2.1.1. Đất là môi trường sống tốt nhất đối với vi sinh vật

Vi sinh vật là những cơ thể nhỏ bé dễ dàng phát tán nhờ gió, nước và các sinh vật khác. Bởi vậy nó có thể di chuyển một cách dễ dàng đến mọi nơi trong thiên nhiên. Nhất là những vi sinh vật có bào tử, bào tử của chúng có khả năng sống tiềm sinh trong các điều kiện khó khăn. Khi gặp điều kiện thuận lợi, chúng lại phát triển, sinh sôi. Bởi vậy trên trái đất này, nếu có một loại sinh vật nào phân bố rộng rãi nhất, phong phú nhất thì đó chính là vi sinh vật. Nó phân bố ở khắp mọi nơi. Tuy nhiên, đất là nơi vi sinh vật cư trú nhiều nhất so với các môi trường khác.

2.1.2. Khu hệ vi sinh vật đất

Sự phân bố của vi sinh vật đất còn gọi là khu hệ vi sinh vật đất. Chúng bao gồm các nhóm có đặc tính hình thái, sinh lý và sinh hoá rất khác nhau. Các nhóm vi sinh vật chính cư trú trong đất bao gồm: Vi khuẩn, Vi nấm, Xạ khuẩn, Virus, Tảo, Nguyên sinh động vật. Trong đó vi khuẩn là nhóm chiếm nhiều nhất về số lượng. Chúng bao gồm vi khuẩn hiếu khí, vi khuẩn kỵ khí, vi khuẩn tự dưỡng, vi khuẩn dị dưỡng ... Nếu chia theo các nguồn dinh dưỡng thì lại có nhóm tự dưỡng cacbon, tự dưỡng amin, dị dưỡng amin, vi khuẩn cố định nitơ v.v...

Số lượng và thành phần vi sinh vật trong đất thay đổi khá nhiều. Trước hết số lượng và thành phần vi sinh vật trên bề mặt đất rất ít do ngay trên bề mặt đất độ ẩm không phải là thích hợp cho vi sinh vật phát triển, hai nữa bề mặt đất bị mặt trời chiếu rọi nên vi sinh vật bị tiêu diệt.

2.1.3 . Sự phân bố của vi sinh vật theo độ sâu tầng đất trong phần diện đất

Số lượng và thành phần vi sinh vật thấy nhiều hơn khi chiều sâu đất 10 - 20 cm so với bề mặt, ở tầng lớp này độ ẩm vừa thích hợp, các chất dinh dưỡng tích lũy nhiều, không bị tác dụng của ánh sáng mặt trời nên vi sinh vật phát triển nhanh, các quá trình chuyển hoá quan trọng trong đất chủ yếu xảy ra trong tầng đất này. Số lượng và thành phần vi sinh vật sẽ giảm đi khi độ sâu của đất hơn 30 cm và sâu 4 - 5m hầu như rất ít (trừ trường hợp đất có mạch nước ngầm). Rõ ràng là vi sinh vật ở tầng đất này phải là loài yếm khí đồng thời phải chịu được áp suất lớn mới phát triển được. Hai nữa ở lớp đất này hầu như các chất hữu cơ rất hiếm.

Chiều sâu đất (cm)	Vi khuẩn (tế bào)	Xạ khuẩn (tế bào)	Nấm mốc (tế bào)	Rong tảo (tế bào)
3 - 8	9.750.000	2.080.000	119.000	25.000
20 - 25	2.179.000	245.000	50.000	5.000
35 - 40	570.000	49.000	14.000	500
65 - 75	11.000	5.000	6.000	100

135- 145	1.400		3.000	
----------	-------	--	-------	--

Bảng 3.1. Lượng vi khuẩn trong đất xác định theo chiều sâu đất

Trung bình trong đất vi khuẩn chiếm khoảng 90% tổng số. Xạ khuẩn chiếm khoảng 8%, vi nấm 1%, còn lại 1% là tảo, nguyên sinh động vật. Tỷ lệ này thay đổi tùy theo các loại đất khác nhau cũng như khu vực địa lý, tầng đất, thời vụ, chế độ canh tác v.v... Ở những đất có đầy đủ chất dinh dưỡng, độ thoáng khí tốt, nhiệt độ, độ ẩm và pH thích hợp thì vi sinh vật phát triển nhiều về số lượng và thành phần. Sự phát triển của vi sinh vật lại chính là nhân tố làm cho đất thêm phì nhiêu, màu mỡ. Bởi vậy, khi đánh giá độ phì nhiêu của đất phải tính đến thành phần và số lượng vi sinh vật. Nếu chỉ tính đến hàm lượng chất hữu cơ thì khó giải thích được tại sao ở một vùng đất chiêm trũng hàm lượng chất hữu cơ, chất mùn, đạm, lân đều cao mà cây trồng phát triển lại kém. Đó là do điều kiện yếm khí của đất hạn chế các loại vi sinh vật hiếu khí phát triển làm cho các chất hữu cơ không được phân giải. Các dạng chất khó tiêu đối với cây trồng không được chuyển thành dạng dễ tiêu. Các chất độc tích lũy trong đất trong quá trình trao đổi chất của cây cũng không được phân giải nhờ vi sinh vật, gây ảnh hưởng xấu đến cây trồng.

Quần thể vi sinh vật thường tập trung nhiều nhất ở tầng canh tác. Đó là nơi tập trung rễ cây, chất dinh dưỡng, có cường độ chiếu sáng, nhiệt độ, độ ẩm thích hợp nhất. Số lượng vi sinh vật giảm dần theo tầng đất, càng xuống sâu càng ít vi sinh vật. Theo số liệu của Hoàng Lương Việt: ở tầng đất 9 - 20 cm của đất đồi Mộc Châu - Sơn La có tới 70,3 triệu vi sinh vật trong 1 gram đất. Tầng từ 20 - 40 cm có chứa 48,6 triệu, tầng 40 - 80cm có 45,8 triệu, tầng 80 - 120cm có chứa 40,7 triệu.

Riêng đối với đất bạc màu, do hiện tượng rửa trôi, tầng 0 - 20 cm ít chất hữu cơ hơn tầng 20 - 40cm. Bởi vậy ở tầng này số lượng vi sinh vật nhiều hơn tầng trên. Sau đó giảm dần ở các tầng dưới.

Thành phần vi sinh vật cũng thay đổi theo tầng đất: vi khuẩn hiếu khí, vi nấm, xạ khuẩn thường tập trung ở tầng mặt vì tầng này có nhiều oxy. Càng xuống sâu, các nhóm vi sinh vật hiếu khí càng giảm mạnh. Ngược lại, các nhóm vi khuẩn kỵ khí như vi khuẩn phản nitrat hoá phát triển mạnh ở độ sâu 20 - 40cm. Ở vùng khí hậu nhiệt đới nóng ẩm thường có quá trình rửa trôi, xói mòn nên tầng 0 - 20cm dễ biến động, tầng 20 - 40cm ổn định hơn.

2.2. Sự phân bố của vi sinh vật trong nước

Nguồn vi sinh vật trong nước là từ đất, không khí và chất thải. Nước tự nhiên là môi trường thích hợp cho nhiều loại vi sinh vật sinh trưởng và phát triển do trong nước có chứa đầy đủ các chất hữu cơ, các muối khoáng cần thiết cho sinh trưởng, phát triển của vi sinh vật. Hơn nữa nhiệt độ, không khí của nước cũng ở trong giới hạn thích hợp cho nhiều loại vi sinh vật. Tất cả các nguồn nước đều có vi sinh vật, nhưng số lượng và thành phần của chúng biến đổi tùy theo nguồn nước, độ sâu cột nước, thời tiết khí hậu. Phần lớn vi sinh vật trong nước là do cảm nhiễm từ các nguồn khác nhau. Sau khi xâm nhập, một số khá lớn không có khả năng tồn tại và phát triển ở đó do chúng không có khả năng hình thành

bào tử. Theo nhiều nghiên cứu cho thấy hầu hết các vi khuẩn trong nước là không có bào tử, còn ở trong bùn là các vi khuẩn có bào tử. Sự tồn tại của vi sinh vật có quan hệ rất lớn đến độ sâu của cột nước:

Nước trên bề mặt có nhiều chất hữu cơ, nhiệt độ và độ thoáng khá tốt do đó vi sinh vật phát triển thuận lợi, số lượng và loại hình khá phong phú. Nhiều vi khuẩn, tảo, động vật nguyên sinh và nấm mốc khi được đưa vào nước bề mặt có khả năng trở thành quần thể tự nhiên trong nước. Trong nước bề mặt có các loại cầu khuẩn, trực khuẩn không bào tử, xoắn khuẩn, xạ khuẩn, vi khuẩn có bào tử, vi khuẩn quang hợp và các loại tảo.

Nước dưới sâu do ít chất hữu cơ, nhiệt độ thấp nên quần thể vi sinh vật đây không đa dạng, chỉ tồn tại một số nhóm với số lượng nhỏ. Sự tồn tại của vi sinh vật còn phụ thuộc vào nguồn nước, thời tiết khí hậu, loại hình vi sinh vật cảm nhiễm.

Nguồn nước gần thành phố, khu vực dân cư đông đúc có hệ vi sinh vật phong phú hơn, số lượng lớn hơn ở nguồn nước vùng hẻo lánh, ít dân. Vào mùa nắng ấm, mưa nhiều vi sinh vật trong nước cũng tăng hơn trong mùa lạnh, ít mưa. Khi trời nắng nhiều không mưa số lượng vi sinh vật cũng giảm. Vi sinh vật có bào tử tồn tại lâu hơn. Các vi sinh vật gây bệnh nhiễm vào nước từ chất thải không có khả năng phát triển, thường bị chết trong một thời gian ngắn, chỉ tồn tại các bào tử. Vi sinh vật gây bệnh sống sót được lâu hơn trong nước lạnh và sạch so với nước nóng và giàu chất hữu cơ.

3. THỰC HÀNH: PHA CHẾ MÔI TRƯỜNG NUÔI CẤY VI SINH VẬT . ĐO KÍCH THƯỚC VÀ ĐẾM SỐ LƯỢNG TẾ BÀO VI SINH VẬT

@ Mục tiêu bài thực hành

- Thực hiện thành thạo các thao tác bao gói, khử trùng dụng cụ
- Thành thạo kỹ năng pha chế môi trường nuôi cấy vi sinh vật
- Rèn luyện kỹ năng đổ môi trường vào ống nghiệm và đĩa petri
- Đo được kích thước và đếm được số lượng tế bào vi sinh vật

@ Chuẩn bị đồ dùng và phương tiện thực hành

+ Dụng cụ, thiết bị

- Ống nghiệm, đĩa petri, bình tam giác, que cấy
- Đèn cồn, tủ sấy, kéo, hộp quét ga, nồi hấp, máy đo pH, thớt, dao, panh

+ Vật tư

- Giấy báo, bông gòn không thấm nước
- Dây thép nhỏ, dây dù
- Thịt bò, thịt lợn hoặc thịt trâu : 500 g; nước cất.
- HCl, NaOH 20%, Pepton bột ; NaCl tinh khiết; Thạch sợi

@ Đánh giá bài thực hành

Đánh giá bài thực hành dựa vào các tiêu chí sau:

- Tiêu chí 1: Bao gói các dụng cụ đúng thao tác, nhanh, gọn, đẹp.

- Tiêu chí 2: Nút bông phải đảm bảo các yêu cầu nêu ra trong nội dung thực hành
- Tiêu chí 3: Thực hiện các phương pháp khử trùng dụng cụ, cách sử dụng tủ sấy, nồi hấp.
- Tiêu chí 4: Thực hiện các bước pha chế môi trường dinh dưỡng
- Tiêu chí 5: Thao tác đổ môi trường.

@ Nội dung bài thực hành

3.1. PHA CHẾ MÔI TRƯỜNG NUÔI CẤY VI SINH VẬT

3.1.1 Bao gói, khử trùng dụng cụ

*** Nguyên tắc**

Dụng cụ được bao gói phải đảm bảo sạch và khô.

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

*** Phương pháp bao gói dụng cụ**

Việc bao gói dụng cụ gồm 2 khâu:

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

3.1.1.1 Cách làm nút bông

+ Với các ống nghiệm:

Bước 1: Lấy một ít bông không thấm nước cuộn lại, dùng que tre ấn vào giữa cuộn bông

Bước 2: Đẩy cuộn bông này gấp đôi và từ từ vào miệng ống nghiệm

Yêu cầu:

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

+ **Với các chai, lọ, bình tam giác có kích thước lớn:** cách làm tương tự nhưng sử dụng lượng bông nhiều hơn

+ **Với các pipet:** Dùng một sợi dây thép nhỏ nhét một ít bông vào đầu lớn của pipet để hạn chế không khí từ miệng người hút vào pipet

3.1.1.2. Cách bao gói dụng cụ

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

Bước 1: Cắt các đoạn băng giấy hình chữ nhật với kích thước tùy theo dụng cụ cần bao gói.

Bước 2: Quấn quanh phần đầu có nút bông, cột lại thật chặt

Yêu cầu:

- Phần giấy bao bên ngoài phải chặt và kín
- Bao bằng giấy dầu với dụng cụ hấp ướt
- Bao bằng giấy báo với dụng cụ sấy khô khi khử trùng ướt.
- Với các dụng cụ như pipet, que trang phải dùng giấy bao kín toàn bộ. Có thể dùng hộp nhôm để đựng các dụng cụ trên để khử trùng.

3.1.1.3. Khử trùng dụng cụ

*** Nguyên tắc:** Sau khi khử trùng cần đảm bảo:

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

*** Các phương pháp khử trùng bằng nhiệt**

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

Khả năng chịu nhiệt của vi sinh vật phụ thuộc vào: Tính chất môi trường, số lượng tế bào, độ pH của vật cần khử trùng.

Bước 1: Đặt các dụng cụ đã được bao gói vào tủ sấy

Bước 2: Bật công tắc tủ hoạt động

Bước 3: Điều chỉnh thời gian và nhiệt độ thích hợp (160⁰C trong 2h hoặc 180⁰C trong 30 phút)

Bước 4: Tắt tủ sấy, để nguội tới 60⁰C rồi mở tủ lấy dụng cụ ra. Tránh mở tủ lấy dụng cụ khi nhiệt độ tủ còn cao sẽ làm dụng cụ thủy tinh dễ vỡ

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

3.1.2. Pha chế môi trường nuôi cấy vi sinh vật

*** Khái niệm môi trường dinh dưỡng**

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

*** Các yêu cầu cơ bản của môi trường dinh dưỡng**

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

- Tuyệt đối vô trùng

*** Nguyên tắc pha môi trường (Môi trường cơ bản)**

Dựa trên cơ sở nhu cầu về các chất dinh dưỡng và khả năng đồng hóa các chất dinh dưỡng của từng loài vi sinh vật.

Để đảm bảo sự cân bằng về áp suất thẩm thấu giữa môi trường và vi sinh vật nên cần điều chỉnh tỷ lệ và nồng độ các chất trong thành phần môi trường dinh dưỡng.

Đảm bảo các điều kiện hóa, lý cần thiết cho các hoạt động trao đổi chất của vi sinh vật.

*** Các bước pha môi trường dinh dưỡng:**

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

3.1.2.1. Làm nước thịt

Công thức:

Thịt bò, thịt lợn hoặc thịt trâu : 500 g; nước cất: 1000 ml

Cách pha chế

Bước 1: Thịt lọc hết gân, mỡ , xay hoặc băm nhỏ, cân 500 g, ngâm thịt vào 1000 ml nước cất, để tủ lạnh qua đêm.

Bước 2: Đun từ từ nước thịt cho tới sôi, vớt bọt khuấy đều. Duy trì sôi âm ỉ trong 1 giờ, thỉnh thoảng khuấy đều.

Bước 3: Lọc qua giấy lọc để loại trừ mỡ và bã thịt.

Bước 4: Thêm nước cất cho đủ 1000 ml, dùng để pha chế môi trường. Nếu chưa dùng ngay thì đóng chai hấp 1100C trong 30 phút rồi bảo quản ở tủ lạnh

Yêu cầu: Nước thịt phải trong, không lắng cặn

3.1.2.2. Pha chế môi trường

*** Môi trường canh thang thường**

Công thức

- Nước thịt: 1000 ml.
- Pepton bột: 10 g.
- NaCl tinh khiết: 5 g.

Nếu không có nước thịt thì thay bằng 5g cao thịt.

Pha chế

Bước 1: Cân, đóng đủ các thành phần của môi trường vào bình cầu hoặc bình tam giác. Đun sôi, lắc đều cho tan hết các thành phần.

Bước 2: Điều chỉnh pH 7,4 – 7,6 bằng dung dịch NaOH 20% hoặc HCl, lọc qua giấy lọc.

Bước 3: Hấp 110 °C trong 30 phút,

Yêu cầu: Môi trường phải trong, màu vàng nhạt hoặc vàng sẫm, ống môi trường không quá nhiều hoặc quá ít

*** Môi trường thạch thường**

Công thức:

- Nước thịt: 1000 ml (có thể thay bằng 5 g cao thịt).
- Pepton bột: 10 g.
- NaCl tinh khiết: 5 g.
- Thạch sợi: 20 g.

Pha chế:

Bước 1: Cân, đóng đủ nước thịt và các thành phần của môi trường vào nồi, đun nóng cho tan. Điều chỉnh pH 7,8- 8 bằng dung dịch kiềm hoặc acid.

Bước 2: Lọc qua giấy lọc hoặc bông vào bình cầu khi môi trường còn nóng.

Bước 3: Hấp 110 °C trong 30 phút.

Yêu cầu: Thạch tan đều, môi trường không cứng hoặc quá mềm, đĩa thạch không dày quá hoặc mỏng quá. Ống thạch phải có phần chân và lưỡi.

3.1.2.3. Phân phối môi trường vào dụng cụ (môi trườngở trạng thái hóa lỏng): Phân phối môi trường vào đĩa petri, ống nghiệm, bình tam giác. Trình tự phân phối như sau:

Bước 1: Lau chùi hột vô trùng, vệ sinh tay.

Bước 2: Một tay giữ dụng cụ chứa môi trường, tay còn lại kẹp nút bông và kéo ra.

Bước 3: Nhanh tay đổ môi trường vào dụng cụ và đậy nút bông lại.

Đối với ống nghiệm:

Nếu môi trường làm thạch nghiêng thì lượng môi trường cần được phân phối chiếm 1/4 thể tích ống nghiệm. Đặt ống nghiệm có môi trường lên giá đặt nghiêng và không được để môi trường chạm vào nút bông. Để yên cho đến khi môi trường đông đặc. Yêu cầu mặt thạch phải thẳng, nhẵn và liên tục

Nếu làm thạch đứng thì lượng môi trường được phân phối chiếm 1/2 - 1/3 thể tích ống nghiệm. Đặt các ống nghiệm có môi trường là thạch đứng vào giá, để yên cho môi trường đông đặc

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

Bước 1: Mở bao giấy gói các đĩa petri, một tay cầm dụng cụ chứa môi trường.

Bước 2: Tay còn lại mở nút bông và hơi miệng bình trên ngọn lửa đèn cồn.

Bước 3: Mở hé nắp đĩa petri. Nghiêng bình và rót môi trường vào đĩa petri, dày khoảng 2mm.

Bước 4: Đẩy nắp đĩa lại, xoay tròn đĩa để môi trường được phân phối đều bên trong đĩa. Để yên cho môi trường đông đặc.

Bước 5: Lật ngược đĩa lại, ghi chú môi trường (tên môi trường, ngày khử trùng, hạn sử dụng) và bảo quản.

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

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

3.2. ĐO KÍCH THƯỚC TẾ BÀO VI SINH VẬT

Muốn đo kích thước của tế bào vi sinh vật, người ta sử dụng thước đo đặc biệt. Hiện nay có nhiều loại thước đo nhưng thông dụng hơn cả là thước đo thị kính và thước đo vật kính của hãng OLYMPUS Nhật Bản.

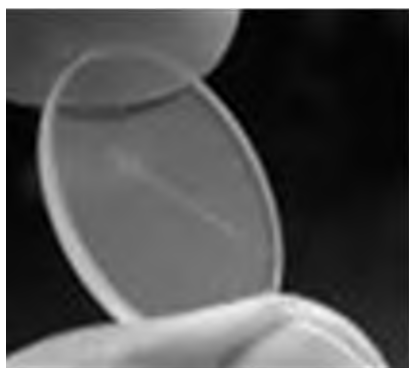
3.2.1. Dụng cụ, thiết bị hoá chất.

Chuẩn bị trước các tiêu bản “giọt ép” từ canh trường nuôi vi khuẩn hoặc nấm men trước 24 giờ.

Để đo kích thước (tế bào nấm men, vi khuẩn, xạ khuẩn, nấm mốc...) ta phải làm tiêu bản “giọt ép”, ít khi làm tiêu bản nhuộm màu. Dùng thước đo thị kính để đo kích thước tế bào vi sinh vật (biểu thị bằng đơn vị micromet μm ; $1\ \mu\text{m} = 1 \times 10^{-6}\ \text{m} = 1 \times 10^{-3}\ \text{mm} = 10.000\ \text{\AA}$ (angstrom), kính hiển vi quang học.

Thước đo thị kính (Hình 3.3) là một miếng thủy tinh tròn, ở chính giữa có một thước nhỏ 5 mm được chia thành 100 phần bằng nhau và được đánh số từ 0 -> 100.

Thước đo vật kính (Hình 3.4) là một tấm thủy tinh, ở giữa có một thước nhỏ 1mm được chia thành 100 khoảng đều nhau, vì vậy mỗi khoảng chia là 0,01mm hay 10 μm .



Hình 3.3. Thước đo thị kính



Hình 3.4. Thước đo vật kính

3.2.2. Xác định giá trị mỗi khoảng của thước đo thị kính

Để xác định giá trị mỗi khoảng của thước đo thị kính đối với một độ phóng đại ta làm như sau:

Bước 1: Tháo thấu kính trên của thị kính ra, lắp thước đo thị kính vào màn chắn của thị kính sao cho vạch chia nằm ở phía dưới. Giá trị của mỗi khoảng chia của thước đo thị kính đối với từng độ phóng đại của thị kính cần phải được xác định trước nhờ dùng thước đo vật kính. Đặt thước đo vật kính OLYMPUS lên bàn kính, nơi vẫn thường để tiêu bản.

Bước 2: Dùng vật kính có bội giác nhỏ lấy tiêu cự và dịch thước đo vào giữa thị trường. Thay vật kính có bội giác lớn mà ta định dùng để đo kích thước tế bào vi sinh vật.

Bước 3: Điều chỉnh bàn kính sao cho một vạch của 2 thước này trùng khít lên nhau và tìm chỗ trùng khít của vạch thứ 2 (Hình 3.5), rồi xác định khoảng cách giữa 2 vạch của thước đo thị kính bằng μm .

* Ví dụ: Khi ta sử dụng kính hiển vi có thị kính x10, vật kính x40. Quan sát vào kính hiển vi ta thấy có 5 khoảng chia của thước đo vật kính (tức 50 μm) nằm gọn vào 20 khoảng chia của thước đo thị kính, vậy mỗi khoảng chia của thước đo thị kính với độ phóng đại đang dùng là 2,5 μm .

3.2.3. Đo kích thước

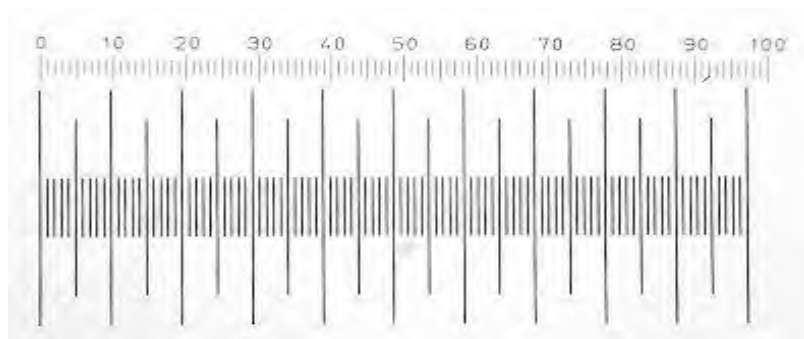
Tiến hành đo kích thước theo trình tự sau:

Bước 1: Đặt tiêu bản có vi sinh vật cần đo lên bàn kính. Điều chỉnh bàn kính sao cho thấy rõ tế bào vi sinh vật và thước đo thị kính.

Bước 2: Điều chỉnh bàn kính sao cho tế bào vi sinh vật nằm gọn và dọc theo thước đo thị kính.

Bước 3: Đếm số khoảng mà tế bào vi sinh vật chiếm chỗ. Xoay ống thị kính để đo bề khác.

Thước đo thị kính



Thước đo vật kính
(1mm ÷ 100 khoảng = 0,01mm)

Hình

kính (trên) và vật kính (dưới) nhìn dưới kính hiển vi quang học.

3.5: Thước đo thị

3.2.4. Tính kết quả

Ví dụ: đường kính tế bào nấm men nằm đúng vào hai khoảng của thước đo thị kính, tức là $(2,5 \times 2 = 5,0 \mu\text{m})$.

3.2.5. Những điểm cần lưu ý

Kích thước tế bào có thể thay đổi tùy theo thành phần môi trường dinh dưỡng của canh trường nuôi cấy vi sinh vật. Muốn đo kích thước của vi khuẩn hình cầu ta đo đường kính, của trực khuẩn - đo bề ngang và chiều dài, xạ khuẩn và nấm mốc - đo bề ngang của sợi.

Nếu tế bào vi khuẩn chuyển động thì ta hơi nóng một chút hay thêm vào huyền phù một giọt dung dịch 0,1% thạch (agar) nóng chảy. Nếu làm tiêu bản cố định nhuộm màu sẽ làm cho kích thước tế bào bị thay đổi ít nhiều

3.3.3. Xác định trực tiếp số lượng tế bào vi sinh vật bằng phòng đếm hồng cầu

Phương pháp này thường dùng để đếm số lượng vi sinh vật có kích thước tương đối lớn như nấm men, bào tử nấm mốc, các loại tảo.

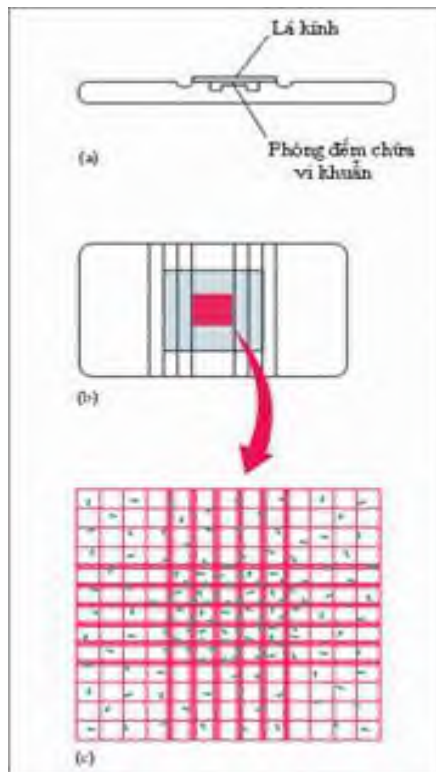
Nguyên tắc cấu tạo của phòng đếm là một phiến kính dày hình chữ nhật, chia thành 3 khoảng, khoảng giữa chia thành 2 khoảng nhỏ. Trên mỗi khoảng này có kẻ một lưới đếm, gồm rất nhiều ô vuông. Mỗi ô vuông lại được chia ra thành 16 ô vuông nhỏ, mỗi ô nhỏ có diện tích là $1/400 \text{ mm}^2$, và chiều dày là $1/10 \text{ mm}$, như vậy thể tích 1 ô vuông nhỏ là $1/4000 \text{ mm}^3$ hay $1/4000.000 \text{ ml}$. Phòng đếm có 1 lá kính dày để đẩy.

Cách đếm:

Bước 1: Lắc đều ống nghiệm pha loãng mẫu.

Bước 2: Nhỏ 1 giọt dung dịch mẫu vào giữa phòng đếm và đẩy lại bằng lá kính, chú ý không để tạo bọt khí. Di chuyển nhẹ nhàng phòng đếm để dung dịch mẫu tràn đầy các khoang.

Bước 3: Đặt phòng đếm lên bàn kính hiển vi, để yên 3 – 5 phút, sau đó tiến hành đếm số lượng tế bào trong 5 ô lớn chéo nhau (chọn 4 ô ở 4 góc và một ô ở chính giữa). Cách đếm số tế bào trong mỗi ô lớn như sau: mỗi ô nhỏ có 4 cạnh giới hạn, đếm số lượng tế bào nằm trọn trong ô và những tế bào nằm trên 2 cạnh liên tiếp cùng chiều, ví dụ: đếm cạnh bên dưới và cạnh bên phải. Đếm các ô từ trái sang phải, từ hàng trên xuống hàng dưới rồi đổi chiều. Cứ đếm như vậy cho đến ô cuối cùng của 16 ô con.



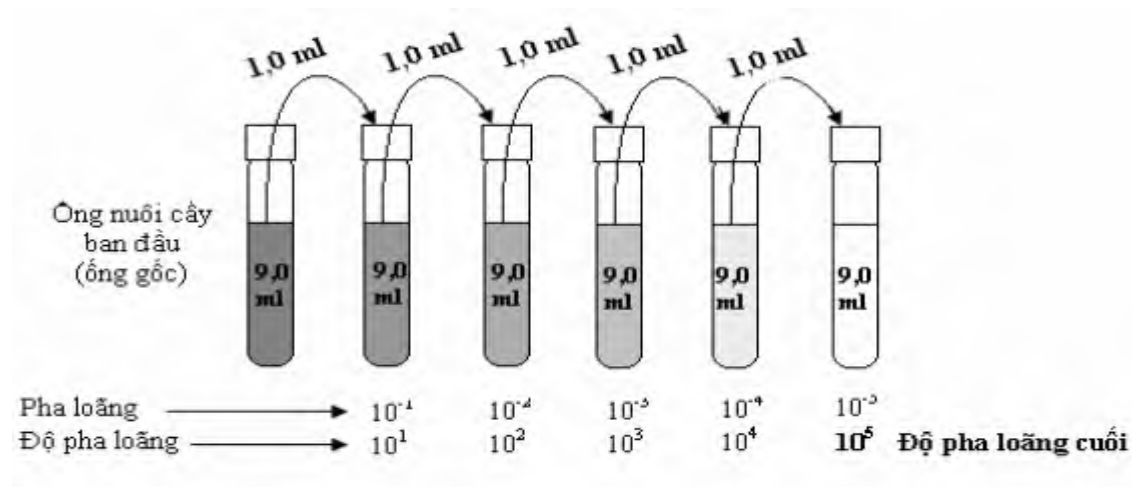
Hình 3.6. Phòng đếm hồng cầu

3.3.4. Phương pháp đếm khuẩn lạc vi sinh vật

Bước 1. Chuẩn bị dịch pha loãng mẫu

Hòa tan hỗn hợp NaCl: 1g, Peptone: 8,5g, Nước cất: 1 lít

Bước 2. Chuẩn bị các chuỗi pha loãng mẫu



Hình 3.7. Pha loãng mẫu lỏng vi sinh vật

Đối với mẫu chất lỏng: dùng pipet hút 1 ml mẫu cho vào ống nghiệm chứa 9 ml dung dịch pha loãng, khi đó ta sẽ được nồng độ pha loãng là 10^{-1} . Tiếp tục từ ống nghiệm 10^{-1} hút tiếp 1ml và cho vào ống nghiệm chứa 9 ml dung dịch pha loãng -> độ pha loãng 10^{-2} . Tiếp tục như vậy đến nồng độ cần thiết

Đối với mẫu rắn: cân chính xác 10 g mẫu, sau đó cho vào 90 ml dung dịch pha loãng nồng độ pha loãng 10^{-1} . Và tiếp tục pha loãng tương tự như mẫu nước.

Bước 3. Cấy mẫu trên đĩa petri

Đề đĩa petri lên bàn, hút 0,1 ml dịch cần nghiên cứu đã pha loãng cho vào đĩa petri có môi trường đặc. Dùng que trang trải đều khắp mặt đĩa, ủ ở nhiệt độ và thời gian thích hợp.

Bước 4. Đếm số khuẩn lạc hình thành

TÓM TẮT CHƯƠNG 3

Quá trình sinh trưởng của quần thể vi sinh vật luôn chịu ảnh hưởng của điều kiện ngoại cảnh bao gồm các nhân tố vật lý, các nhân tố hóa học và nhân tố sinh học

Các nhân tố vật lý tác động đến vi sinh vật bao gồm các yếu tố như nhiệt độ, độ ẩm, ánh sáng ... mỗi loài vi sinh vật chịu tác động của một ngưỡng về nhiệt độ, ánh sáng và độ ẩm nhất định.

Các nhân tố hóa học bao gồm độ pH và các chất hóa học như Cl, F, I, phenol ...

Các nhân tố sinh học bao gồm các cá thể trong cùng một cộng đồng vi sinh vật sống có những quan hệ tương hỗ về nhiều mặt có thể kích thích (trợ giúp) hoặc kiềm hãm (đối kháng) lẫn nhau, trong đó có mối quan hệ cộng sinh hai bên cùng có lợi; quan hệ hỗ sinh là quan hệ hai bên cùng có lợi nhưng không nhất thiết phải có nhau mới sống được như quan hệ cộng sinh; quan hệ kháng sinh là mối quan hệ đối kháng lẫn nhau giữa hai nhóm vi sinh vật. Loài này thường tiêu diệt loại kia hoặc hạn chế quá trình sống của nó; Quan hệ ký sinh là hiện tượng vi sinh vật này sống ký sinh trên vi sinh vật, hoàn toàn ăn bám và gây hại cho vật chủ.

Trong tự nhiên, vi sinh vật phân bố nhiều trong môi trường đất và môi trường nước. Sự phân bố của vi sinh vật đất còn gọi là khu hệ vi sinh vật đất. Chúng bao gồm các nhóm có đặc tính hình thái, sinh lý và sinh hoá rất khác nhau như vi khuẩn, vi nấm, xạ khuẩn, vi rút, tảo, nguyên sinh động vật.

Nguồn vi sinh vật trong nước là từ đất, không khí và chất thải. Nước tự nhiên là môi trường thích hợp cho nhiều loại vi sinh vật sinh trưởng và phát triển do trong nước có chứa đầy đủ các chất hữu cơ, các muối khoáng cần thiết cho sinh trưởng, phát triển của vi sinh vật. Tất cả các nguồn nước đều có vi sinh vật, nhưng số lượng và thành phần của chúng biến đổi tùy theo nguồn nước, độ sâu cột nước, thời tiết khí hậu. Phần lớn vi sinh vật trong nước là do cảm nhiễm từ các nguồn khác nhau.

CÂU HỎI ÔN TẬP

Câu 1. Trình bày sự ảnh hưởng của các yếu tố vật lý đến hoạt động sống của vi sinh vật. Nêu ứng dụng trong thực tiễn ?

Câu 2. Trình bày sự ảnh hưởng của các yếu tố hóa học đến hoạt động sống của vi sinh vật. Nêu ứng dụng trong thực tiễn ?

Câu 3. Phân các mối quan hệ giữa các cá thể trong cùng một cộng đồng vi sinh vật Câu 4. Thực hành - Thực hiện các kỹ năng

- Bao gói, khử trùng dụng cụ
- Pha chế môi trường nuôi cấy vi sinh vật
- Đổ môi trường vào ống nghiệm và đĩa petri
- Đo kích thước và đếm được số lượng tế bào vi sinh vật

Chương IV. VI SINH VẬT VỚI CÁC BIỆN PHÁP KỸ THUẬT CANH TÁC VÀ QUÁ TRÌNH BẢO QUẢN NÔNG SẢN

1. MỐI QUAN HỆ GIỮA VI SINH VẬT ĐẤT VỚI CÁC BIỆN PHÁP KỸ THUẬT CANH TÁC

Vi sinh vật đóng vai trò gián tiếp trong sự liên kết các hạt đất với nhau. Hoạt động của vi sinh vật, nhất là nhóm háo khí đã hình thành nên một thành phần của mùn là axit humic. Các muối của axit humic tác dụng với ion Canxi tạo thành một chất dẻo gắn kết những hạt đất với nhau. Sau này người ta đã tìm

Vi sinh vật có vai trò trực tiếp trong việc tạo thành kết cấu đất: Trong quá trình phân giải chất hữu cơ, nấm mốc và xạ khuẩn phát triển một hệ khuẩn ti khá lớn trong đất. Khi nấm mốc và xạ khuẩn chết đi, vi khuẩn phân giải chúng tạo thành các chất dẻo có khả năng kết dính các hạt đất với nhau. Bản thân vi khuẩn chết đi và tự phân huỷ cũng tạo thành các chất kết dính. Ngoài ra lớp dịch nhầy bao quanh các vi khuẩn có vỏ nhầy cũng có khả năng kết dính các hạt đất với nhau. Mùn không những là nơi tích lũy chất hữu cơ làm nên độ phì nhiêu của đất mà còn là nhân tố tạo nên kết cấu đất. Sự hình thành và phân giải mùn đều do vi sinh vật đóng vai trò tích cực. Vì vậy các điều kiện ngoại cảnh ảnh hưởng đến vi sinh vật cũng ảnh hưởng đến hàm lượng mùn trong đất. Đặc biệt ở trong vùng nhiệt đới nóng ẩm, sự hoạt động của vi sinh vật rất mạnh ảnh hưởng rất lớn đến sự tích lũy và phân giải mùn. Các biện pháp canh tác như cày bừa, xới xáo, bón phân ... đều ảnh hưởng trực tiếp đến vi sinh vật và qua đó ảnh hưởng đến hàm lượng mùn trong đất.

1.1. Ảnh hưởng của việc làm đất đối với vi sinh vật đất

Cày xới, đảo trộn có tác dụng điều hoà chất dinh dưỡng, làm đất thoáng khí tạo điều kiện cho vi sinh vật phát triển mạnh. Theo thí nghiệm của Mitxustin và Nhiacôp, các phương pháp cày xới khác nhau có ảnh hưởng rõ rệt đến số lượng và thành phần vi sinh vật. Từ đó cường độ các quá trình sinh học trong đất cũng khác nhau. Khi xới lớp đất canh tác nhưng không lật mặt, số lượng vi sinh vật cũng như cường độ hoạt động có tăng lên nhưng không nhiều bằng xới đất có lật mặt hoặc cày sâu. Tuy nhiên không phải đất nào cũng theo quy luật đó, đối với đất úng ngập, quy luật trên thể hiện rõ hơn trong khi đó ở đất cát nhẹ khô hạn thì việc xới xáo không hợp lý lại làm giảm lượng vi sinh vật.

1.2. Tác động đến chế độ luân canh tới vi sinh vật

Mỗi loại cây trồng đều có một khu hệ vi sinh vật đặc trưng sống trong vùng rễ của nó. Bởi vậy luân canh cây trồng làm cho khu hệ vi sinh vật đất cân đối và phong phú hơn. Người ta thường luân canh các loại cây trồng khác với cây họ đậu để tăng cường hàm lượng đạm cho đất.

1.3. Tác động của phân bón đến vi sinh vật đất

Khi bón các loại phân hữu cơ và vô cơ vào đất, phân tác dụng nhanh hay chậm đến cây trồng là nhờ hoạt động của vi sinh vật. Vi sinh vật phân giải hữu cơ thành dạng vô cơ cho cây trồng hấp thụ, biến dạng vô cơ khó tan thành dễ tan ... Ngược lại các loại phân bón cũng ảnh hưởng đến sinh trưởng và phát triển của vi sinh vật trong đất. Phân hữu cơ như phân chuồng, phân xanh, bùn ao ... đặc biệt làm tăng số lượng vi sinh vật vì bản thân trong đó đã có một số lượng lớn vi sinh vật.

Chất hữu cơ vào đất lại làm tăng số lượng vi sinh vật sẵn có trong đất, đặc biệt là vi sinh vật phân giải xenluloza, phân giải protein và nguyên sinh động vật. Tuy vậy, các loại phân hữu cơ khác nhau tác động đến sự phát triển của vi sinh vật đất ở các mức độ khác nhau tùy thuộc vào tỷ lệ C/N của phân bón.

Phân vô cơ cũng có tác dụng thúc đẩy sự sinh trưởng và phát triển của vi sinh vật đất vì nó có các nguyên tố N, P, K, Ca, vi lượng rất cần thiết cho vi sinh vật. Đặc biệt là khi bón phối hợp các loại phân vô cơ với phân hữu cơ sẽ làm tăng số lượng vi sinh vật lên từ 3 - 4 lần so với bón phân khoáng đơn thuần, đặc biệt là các vi khuẩn Azotobacter, vi khuẩn amôn hoá, nitrat hoá, phân giải xenluloza. Khi trong đất có nhiều phân hữu cơ thì việc bón các loại phân vô cơ có tác dụng kích thích hoạt động phân giải chất hữu cơ của vi sinh vật. Bón vôi có tác dụng cải thiện tính chất lý hoá của đất, làm tăng cường hoạt động của vi sinh vật, nhất là đối với đất chua, mặn, bạc màu.

1.4. Ảnh hưởng của việc sử dụng các loại hóa chất tới vi sinh vật

Các loại thuốc hoá học trừ sâu, diệt cỏ gây tác động có hại tới vi sinh vật cũng như hệ sinh thái đất nói chung. Việc dùng các loại thuốc hoá học làm ô nhiễm môi trường đất, tiêu diệt phần lớn các loại vi sinh vật và động vật nguyên sinh trong đất.

1.5. Ảnh hưởng của việc tưới tiêu tới vi sinh vật:

Đại đa số các loại vi khuẩn có ích đều phát triển mạnh mẽ ở độ ẩm 60 - 80%. Độ ẩm quá thấp hoặc quá cao đều ức chế vi sinh vật. Chỉ có nấm mốc và xạ khuẩn là có thể phát triển được ở điều kiện khô. Ở các ruộng lúa nước các loại vi khuẩn đã thích hợp với độ ẩm cao, tuy nhiên ở những ruộng có tính thấm nước cao được làm ải, sự phát triển vi sinh vật cũng tốt hơn. Đặc biệt là cân đối được tỷ lệ giữa hai loại háo khí và yếm khí.

2. VAI TRÒ CỦA VI SINH VẬT TRONG CÔNG TÁC BẢO VỆ THỰC VẬT

2.1. Vai trò của vi sinh vật trong công tác sản xuất các chế phẩm vi sinh

Chế phẩm vi sinh vật là sản phẩm chứa vi sinh vật (VSV) sống bao gồm: Vi khuẩn, nấm, xạ khuẩn được sử dụng để làm phân bón, làm thuốc bảo vệ thực vật ...

Vai trò của chế phẩm sinh vi sinh vật trong sản xuất nông nghiệp có các ưu điểm sau đây:

Không gây ảnh hưởng tiêu cực đến sức khỏe con người, vật nuôi, cây trồng. Không gây ô nhiễm môi trường sinh thái

Có tác dụng cân bằng hệ sinh thái (vi sinh vật, dinh dưỡng ...) trong môi trường đất nói riêng và môi trường nói chung.

Các chế phẩm vi sinh không làm hại kết cấu đất, không làm chai đất, thoái hóa đất mà còn góp phần tăng độ phì nhiêu của đất, có tác dụng đồng hóa các chất dinh dưỡng, góp phần tăng năng suất và chất lượng nông sản phẩm.

Tiêu diệt côn trùng gây hại, giảm thiểu bệnh hại, tăng khả năng đề kháng bệnh của cây trồng mà không làm ảnh hưởng đến môi trường như các loại thuốc BVTV có nguồn gốc hóa học khác.

Có khả năng phân hủy, chuyển hóa các chất hữu cơ bền vững, các phế thải sinh học, phế thải nông nghiệp, công nghiệp, góp phần làm sạch môi trường.

Các chế phẩm vi sinh ứng dụng cho cây trồng hiện nay cơ bản được chia làm 3 nhóm sản phẩm với các tính năng khác nhau:

- Nhóm chế phẩm sinh học ứng dụng cho việc phòng trừ sâu bệnh hại cây trồng.
- Nhóm chế phẩm sinh học dùng cho sản xuất phân bón hữu cơ sinh học, phân hữu cơ vi sinh, chất kích thích tăng trưởng bón cho cây trồng.
- Nhóm chế phẩm sinh học dùng cho cải tạo đất, xử lý phế thải nông nghiệp.

2.2. Chế phẩm vi sinh ứng dụng cho phòng trừ sâu bệnh

Đây là nhóm sản phẩm được ứng dụng khá rộng rãi và được ứng dụng sớm nhất trong lĩnh vực cây trồng. Theo Bộ Nông nghiệp và PTNT, trong danh mục các loại thuốc BVTV có nguồn gốc sinh học, từ năm 2000 chỉ có 2 sản phẩm trừ sâu sinh học được công nhận cho đăng ký. Đến năm 2005 đã có 57 sản phẩm các loại, đến 6 tháng đầu năm 2007 có 193 sản phẩm được cấp giấy phép đăng ký. Nâng tổng số có 479 sản phẩm sinh học được phép lưu hành, trong đó có 300 loại thuốc trừ sâu và 98 sản phẩm thuốc trừ bệnh. Các sản phẩm này đã góp phần không nhỏ vào công tác phòng trừ dịch hại, góp phần thay thế và hạn chế dần nguy cơ độc hại do sử dụng thuốc BVTV nguồn gốc hóa học ảnh hưởng đến sức khỏe con người và gây ô nhiễm môi trường. Một số sản phẩm tiêu biểu:

Thuốc trừ sâu vi sinh BT (*Bacillus Thuringiensis* var.) thuộc nhóm trừ sâu sinh học, có nguồn gốc vi khuẩn, phổ diệt sâu rộng và hữu hiệu đối với các loại sâu như sâu cuốn lá, sâu tơ, sâu xanh, sâu khoang, sâu ăn tạp... Sâu khi ăn phải thuốc sẽ ngừng ăn sau vài giờ và chết sau 1 – 3 ngày. Ở Việt Nam, chế phẩm Bt (*Bacillus thuringiensis*) đã được nghiên cứu từ năm 1971. Hơn 20 chế phẩm Bt nhập khẩu và nội địa đã cho kết quả tốt trong phòng thí nghiệm và ngoài đồng đối với một số sâu hại chính trên đồng ruộng như sâu xanh bướm trắng, sâu xám, sâu tơ, sâu hại bông, sâu đo. Các loại sản phẩm thương mại có trên thị trường khá nhiều như Vi-BT 32000WP, 16000WP; BT Xentary 35WDG, Firibiotox P dạng bột; Firibiotox C dạng dịch cô đặc ...

Khoa Nông nghiệp và sinh học ứng dụng (Đại học Cần Thơ) cũng đã nghiên cứu và đưa ra 2 chế phẩm sinh học Biobac và Biosar có khả năng phòng trừ 2 bệnh thường gặp trên lúa là đốm vằn và cháy lá. Chế phẩm Biobac được sản xuất từ một chủng vi khuẩn có sẵn ở địa phương, có khả năng tiêu diệt và ức chế sự phát triển của sợi nấm gây bệnh đốm vằn. Còn chế phẩm Biosar là sản phẩm được chiết xuất từ một số loài thực vật, có khả năng kích thích tính kháng bệnh cháy lá lúa (đạo ôn) do nấm *Pyricularia* gây ra.

Điều chế từ nấm có sản phẩm thuốc trừ sâu sinh học VIBAMEC với hoạt chất Abamectin được phân lập từ quá trình lên men nấm *Streptomyces avermitilis*. Diệt trừ được các loại sâu như sâu vẽ bùa, nhện, sâu tơ, sâu xanh, bọ trĩ, bọ phấn; Ngoài ra cũng trong nhóm này Vivadamy, Vanicide, Vali... có hoạt chất là Validamycin A, được chiết xuất từ nấm men *Streptomyces hygroscopicus* var. *jingangensis*. Đây là nhóm thuốc trừ bệnh có nguồn gốc kháng sinh đặc trị các bệnh đốm vằn trên lúa, bệnh nấm hồng trên cao su, bệnh chết rạp cây con trên cà chua, khoai tây, thuốc lá, bông vải....

Các chế phẩm từ nhóm nấm còn có nấm đối kháng *Trichoderma* vừa có tác dụng đề kháng một số nấm bệnh gây hại trên bộ rễ cây trồng như: bệnh vàng lá chết nhanh, còn gọi

là bệnh thối rễ do nấm *Phytophthora palmivora* gây ra. Hay bệnh vàng héo rũ hay còn gọi là bệnh héo chậm do một số nấm bệnh gây ra: *Fusarium solari*, *Pythium* sp, *Sclerotium rolfsii*.

Nhóm sản phẩm chiết xuất từ virus Nucleopolyhedrovirus (NPV). Đây là loại virus có tính rất chuyên biệt, chỉ lây nhiễm và tiêu diệt sâu xanh da láng (*Spodoptera exigua*) rất hiệu quả trên một số cây trồng như bông, đậu đỗ, ngô, hành, nho ...

2.3. Chế phẩm vi sinh ứng dụng cho sản xuất phân bón

Trong sản xuất chế phẩm phân bón vi sinh, các nhóm vi sinh vật đóng vai trò quan trọng là nhóm vi sinh vật cố định đạm, hoà tan lân, phân giải chất hữu cơ, kích thích sinh trưởng cây trồng, v.v..., đã được tuyển chọn có mật độ phù hợp với tiêu chuẩn ban hành, thông qua các hoạt động sống của chúng tạo nên các chất dinh dưỡng mà cây trồng có thể sử dụng được (N, P, K, S, Fe...), hay các hoạt chất sinh học, góp phần nâng cao năng suất, chất lượng nông sản. Phân bón vi sinh vật phải đảm bảo không gây ảnh hưởng xấu đến người, động, thực vật, môi trường sinh thái và chất lượng nông sản.

Hiệu quả của vi sinh vật trong việc làm tăng khả năng sinh trưởng phát triển cây trồng, tiết kiệm phân bón hoá học cũng như tăng năng suất, chất lượng nông sản, đã được khẳng định trong nhiều công trình nghiên cứu của nhiều nước trên thế giới. Các sản phẩm vi sinh như phân bón vi sinh vật cố định nitơ, phân giải photphat khó tan, chế phẩm vi sinh vật kích thích sinh trưởng thực vật, chế phẩm vi sinh vật phòng trừ bệnh cây trồng đã được nghiên cứu từ nhiều năm nay có ý nghĩa quan trọng trong việc bảo vệ môi trường và xây dựng nền nông nghiệp bền vững.

Vi sinh vật tác động đến cây trồng trực tiếp hoặc gián tiếp. Sự tác động trực tiếp của vi sinh vật, đến cây trồng thể hiện qua sự tổng hợp, khoáng hoá hoặc chuyển hoá các chất dinh dưỡng xảy ra trong quá trình chuyển hoá vật chất của vi sinh vật như quá trình cố định nitơ, phân giải lân, sinh tổng hợp auxin, gibberellin, etylen .v.v. Những vi khuẩn này có khả năng giúp cây trồng tăng khả năng huy động và dễ dàng sử dụng các nguồn dinh dưỡng từ môi trường. Tác động gián tiếp đến sinh trưởng của cây trồng xảy ra khi các chủng vi sinh vật có khả năng làm giảm bớt hoặc ngăn chặn các ảnh hưởng có hại từ môi trường hoặc từ các vi sinh vật bất lợi đối với thực vật, trong đó vi sinh vật có thể cạnh tranh dinh dưỡng với vi sinh vật bất lợi, hoặc sinh tổng hợp các chất có tác dụng trung hoà, phân huỷ, chuyển hoá các tác nhân có hại hoặc tiêu diệt, ức chế các vi sinh vật bất lợi. Mỗi loại vi sinh vật trong tự nhiên có thể có 1 hoặc cả 2 tác động nêu trên đối với cây trồng.

Phân hữu cơ vi sinh làm tăng năng suất cây trồng, chất lượng sản phẩm tốt hơn, giảm ô nhiễm của NO_3 . Điều này cũng có nghĩa phân hữu cơ vi sinh đã góp phần quan trọng trong việc cải tạo đất, đáp ứng cho một nền nông nghiệp hữu cơ bền vững, xanh sạch và an toàn.

3. VI SINH VẬT TRONG BẢO QUẢN NÔNG SẢN

3.1. Nguồn gốc vi sinh vật trong nông sản

Vi sinh vật được đưa vào kho cùng lúc với sự cất giữ nông sản, vì chúng thường xuyên có mặt trong không khí. Vi sinh vật phân bố trên bề mặt thực vật được gọi là vi sinh vật biểu sinh. Chúng phát triển chủ yếu dựa vào các sản phẩm bài tiết của cây và các chất

bụi bám trên cây. Do môi trường nghèo dinh dưỡng và các điều kiện sống khác không thích hợp nên quần thể vi sinh vật biểu sinh có thành phần và số lượng kém phong phú như trong vùng rễ.

Vi sinh vật biểu sinh trên hạt phần lớn là các loài hoại sinh chúng có thể bám vào bất cứ phần nào trên vỏ hạt, hoặc nằm giữa vỏ trấu và vỏ gạo.

Một số loài vi sinh vật biểu sinh có thể quan sát được bằng mắt thường, một số loài khác chỉ có thể quan sát được bằng kính hiển vi, bằng cách cấy lên môi trường nhân tạo. Nhiều công trình còn cho thấy trong thời gian nông sản còn trên cây đang phát triển, có nhiều loài vi sinh vật biểu sinh nhưng không gây hại. Tuy nhiên khi thu hoạch nông sản được đưa vào kho, ở đây chúng tiết ra nhiệt trong quá trình sống và hô hấp làm cho đồng hạt nóng lên, tạo điều kiện cho nhiều loài vi sinh vật khác phát triển và thúc đẩy các quá trình sinh hoá trong hạt hoạt động mạnh.

Trong hạt thường có nhiều nấm mốc nấm men và đặc biệt là rất nhiều các loài vi khuẩn. Trong quá trình xây xát hạt cũng có thể nhiễm thêm các loài khác trong không khí.

Ngoài ra vi sinh vật biểu sinh cũng có thể là kí sinh một phần sống trên các bề mặt và một phần sống trong các mô bào của hạt.

3.2. Các nhóm vi sinh vật trong nông sản

Chủ yếu là các nấm, vi khuẩn, xạ khuẩn.

3.2.1. Nấm.

Nấm mốc thường tìm thấy trên lá cũng như trên hạt các loại cây hòa bản, thường gặp là: *Penicillium* sp, *aspergillus* spp, *alternaria* spp, *Cephalothecium* spp. Nấm men thường gặp là *Torula* sp, *Monilia* spp, *Oospora* sp, *Chromosporium maydis*, *Fusarium griseum*. Ngoài ra còn tìm thấy *Candida albicans* và một số loài *Candida* khác.

3.2.2. Vi khuẩn

Vi khuẩn trên vỏ hạt thường gặp nhiều vi khuẩn hơn là nấm mốc ở bất kì một loại hạt nào. Số lượng vi khuẩn thay đổi tùy thuộc vào từng loại hạt thời gian cất giữ, thời kì thu hoạch tình trạng hạt và điều kiện bên ngoài. Số lượng vi khuẩn trên hạt thường dao động trong khoảng 10.000-300.000 tế bào/hạt.

Trên vỏ hạt thường gặp là vi khuẩn hoại sinh, đa dạng gồm những loài có bào tử cũng như không bào tử, hiếu khí, yếm khí, ưa nhiệt chịu rét. Người ta tìm thấy khoảng 100 loài vi khuẩn khác nhau thuộc các họ: *Pseudomonadaceae*, *Micrococcaceae*...

3.2.3. Xạ khuẩn

Số lượng xạ khuẩn trên hạt ngũ cốc khi cất giữ thay đổi từ hàng chục ngàn đến hàng triệu tế bào trên 1 gam hạt, số lượng tăng trong quá trình cất giữ. Chủ yếu thuộc về *Streptomyces*. Các loài thường gặp là *Strept.albus*. Ngoài ra còn gặp: *Act. globisporum*, *Act. grminus*, *Act. griseus*,.....

3.3. Tác hại của vi sinh vật trên nông sản

Trong quá trình bảo quản nông sản, vi sinh vật giữ vai trò quan trọng vì khi chúng sống và phát triển được trên nông sản thì chúng phân hủy chất hữu cơ nên làm giảm giá trị nông sản.

Vi sinh vật phát triển trong hạt sẽ làm giảm trọng lượng khô, giảm hoặc mất hoàn toàn khả năng nảy mầm. Trong hạt, vi sinh vật sẽ phân hủy các chất hữu cơ để tạo các loại rượu, acid hữu cơ và các sản phẩm phân hủy khác làm cho hạt có vị đắng và mùi khó chịu.

Trong quá trình sinh sống, nấm và vi khuẩn tiết ra các chất đầu độc mô bào của nông sản làm rối loạn hoạt động của các loại men oxy hoá trong mô. Các sản phẩm trung gian của quá trình trao đổi chất như các loại acid hữu cơ, rượu aldehyde, acetone, các sản phẩm phân hủy protide và một số chất độc do vi sinh vật tiết ra sẽ phân hủy vách tế bào, xâm nhập các mô bào, đầu độc chất nguyên sinh.

Trong quá trình sinh sống và hô hấp của vi sinh vật, nhiệt tỏa ra làm cho hạt hoặc rau quả nóng lên dễ bị hư là do nhiệt độ làm tăng hoạt động sinh sống và hủy hoại của chúng. Đối với rau quả khi cất giữ, các quá trình xảy ra tùy thuộc vào hoạt tính và số lượng các loại men có trong rau quả cũng như men của các loài vi sinh vật sống trong mô bào của chúng. Vì vậy khi rau quả bị nhiễm nấm và vi khuẩn thì các quá trình phân hủy chất dự trữ tăng nhiều. Như cà rốt bị nhiễm nấm *Sclerotinia libertiana* hàm lượng đường giảm từ 4-5% còn 1-2%. Trong một số trường hợp chất dinh dưỡng bị giảm đến “0”.

Tác động của vi sinh vật đến quá trình trao đổi chất của các bộ phận dự trữ rất phức tạp, không ổn định. Tác động đó phụ thuộc và điều kiện ngoại cảnh như nhiệt độ, độ ẩm, thành phần các chất trong không khí.

4. THỰC HÀNH: PHƯƠNG PHÁP LẤY MẪU VÀ PHÂN TÍCH VI SINH VẬT & KIỂM TRA KẾT QUẢ THÍ NGHIỆM PHÂN TÍCH VI SINH VẬT TRÊN CƠ CHẤT:

@ Mục tiêu bài thực hành

- Thực hiện thành thạo kỹ năng thu thập mẫu vi sinh vật, mẫu nước.
- Phân biệt được các dạng vi sinh vật khác nhau ở các mẫu bệnh khác nhau
- Phân lập được vi khuẩn gây bệnh.
- Cấy vi khuẩn lên môi trường thạch
- Quan sát, nhận dạng vi sinh vật dưới kính hiển vi
- Thực hiện các bước phân tích mẫu nước
- Thực hiện được các bước kiểm tra kết quả thí nghiệm phân tích vi sinh vật trên cơ chất

@ Đồ dùng và phương tiện

- Kính hiển vi, la men, lam kính
- Cối, chày, giấy lọc, đĩa petri, pipet, ống nghiệm, cốc đong.
- Mẫu bệnh cây do vi khuẩn
- Mẫu nước

- Thuốc nhuộm Gram vi khuẩn

@ Tiêu chí đánh giá

- Tiêu chí 1: Mẫu bệnh cây, mẫu nước
- Tiêu chí 2: Cách rửa phần cây bị bệnh dưới vòi nước
- Tiêu chí 3: Cách lấy dịch chứa vi khuẩn
- Tiêu chí 4: Cây vi khuẩn lên môi trường thạch
- Tiêu chí 5: Các bước phân tích mẫu nước
- Tiêu chí 6: Kiểm tra kết quả thí nghiệm phân tích vi sinh vật trên cơ chất

@ Nội dung thực hành

4.1. Phương pháp lấy mẫu và phân tích vi khuẩn trên lá cây bị bệnh

4.1.1. Thu mẫu bệnh cây

Thời điểm thu mẫu cây bệnh thích hợp nhất là ở giai đoạn đầu hoặc giữa của bệnh, khi vi sinh vật hại vẫn đang ở trạng thái hoạt động. Những mẫu bệnh bị nhiễm quá nặng thường không sử dụng được vì ở giai đoạn này vi sinh vật hại có thể không hoạt động nữa, thay vào đó là các vi sinh vật hoại sinh xâm nhập vào các mô bệnh đã chết hoại. Vì vậy, phân lập vi sinh vật hại từ các mẫu bệnh ở giai đoạn này thường rất khó. Việc lựa chọn vị trí lấy mẫu trên cây bệnh cũng rất quan trọng. Người thu thập mẫu bệnh cần phải có kiến thức cơ bản về triệu chứng bệnh và nguyên nhân gây bệnh để bảo đảm rằng mẫu lấy được có vi sinh vật hại. Trong một số trường hợp, triệu chứng có thể xuất hiện ở vị trí này của cây nhưng vi sinh vật hại thì có thể được tìm thấy ở vị trí khác. Ví dụ như bệnh héo: triệu chứng thường xuất hiện đầu tiên trên lá trong khi vi sinh vật gây bệnh lại ký sinh trong hệ thống mạch dẫn của rễ và thân.

Mô bệnh vi khuẩn thường bị phân rã rất nhanh, vì vậy khó thu thập và vận chuyển mẫu bệnh tới phòng thí nghiệm ở xa. Đặt mẫu bệnh vào túi giấy và dùng giấy báo ẩm bọc lại để tránh cho mẫu khỏi bị khô. Nên giữ mẫu ở nơi mát mẻ, tránh ánh nắng mặt trời. Đối với mẫu đóm lá và tàn lụi do vi khuẩn, nên dùng giấy báo ép lại cho khô để lưu giữ. Nhiều vi khuẩn gây bệnh có thể sống sót hàng tháng, thậm chí hàng năm trong các mẫu khô ở nhiệt độ phòng.

4.1.2. Phân lập vi khuẩn

Nếu bệnh do vi khuẩn gây ra, một lượng lớn các tế bào vi khuẩn thường dễ dàng được tìm thấy khi vết bệnh trên lá hoặc trong các bó mạch bị vỡ. Phương pháp phát hiện và phân lập vi khuẩn từ mô cây bệnh như sau:

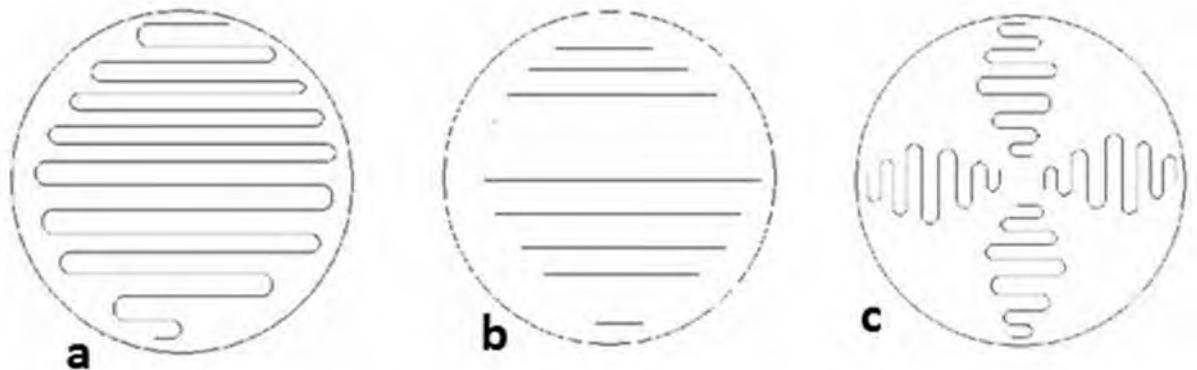
Bước 1: Rửa phần cây bị bệnh dưới vòi nước chảy để loại bỏ đất, bụi và các sinh vật lẫn tạp.

- Nếu mẫu bệnh ban đầu được giữ gìn cẩn thận, không bị cọ xát nhiều thì không cần thiết phải khử trùng bề mặt. Nói chung, càng hạn chế khử trùng bề mặt càng tốt, nhất là đối với các mẫu bệnh khô hoặc gần khô. Các chất có tác dụng khử trùng thường xâm nhập rất nhanh và dễ dàng diệt vi khuẩn.

- Nếu cần thiết phải khử trùng, chỉ nên nhúng mẫu bệnh thật nhanh vào dung dịch natri hypochlorite 10%, sau đó rửa lại bằng nước vô trùng. Nếu mẫu bệnh dày ví dụ như nụ, quả, cành hoặc nốt sừng thì có thể nhúng qua cồn ethanol 70% và hơ qua lửa đèn cồn trước khi phân lập.

Bước 2

- Cắt vết bệnh thành từng mẫu nhỏ ở phần giữa mô bệnh và mô khỏe
- Đặt mẫu lên lam kính tiệt trùng đã nhỏ sẵn một giọt nước vô trùng, quan sát kính hiển vi x 400 nhìn thấy một đám vi khuẩn chuyển động từ vết cắt.
- Lấy dịch trên giọt nước trong lam kính để cấy vi khuẩn (có thể ngâm mô bệnh trong nước vô trùng khoảng vài giờ để có đủ lượng vi khuẩn)



Hình 4.1. a - Cấy theo hình chữ chi; b - cấy theo những đường song song; c – cấy theo 4 hình chữ chi 4 góc



Hình 4.2. Kết quả sau khi cấy

Bước 3: Cấy vi khuẩn lên môi trường thạch

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

Bước 4: Đặt đĩa Petri đã phân lập trong điều kiện nhiệt độ phòng 4-5 ngày hay 10 –14 ngày để kiểm tra khuẩn lạc

4.2. Phương pháp lấy mẫu nước và phân tích vi sinh vật trong nước

4.2.1. Lấy mẫu nước

** Lấy mẫu từ các nguồn là sông, suối, hồ chứa :*

Cầm chai lấy mẫu trong tay, gần vị trí đáy chai, đưa cổ chai hướng xuống dưới và đưa sâu vào dưới mặt nước. Xoay nhẹ để cổ chai hơi nghiêng lên bề mặt nước và miệng chai hướng về phía dòng chảy.

Trong trường hợp không có dòng chảy như nước trong hồ hay trong các bồn chứa phải tạo ra một dòng chảy nhân tạo bằng cách xoay chai theo hướng nằm ngang và đẩy chai di chuyển về phía theo hướng miệng chai.

Trong trường hợp lấy mẫu khi đi trên thuyền, mẫu phải được lấy ở phía trước mũi thuyền. Nếu không thể lấy bằng cách thức này, có thể buộc một vật nặng vào bên dưới đáy chai rồi đưa từ từ vào trong nước. Trong mọi trường hợp đều tránh chai lấy mẫu tiếp xúc với bờ hay đáy của suối hay bồn chứa.

** Lấy mẫu nước sinh hoạt:*

Nếu lấy mẫu nước từ các vòi của hệ thống cấp nước dịch vụ, chọn những vòi cấp nước trực tiếp từ các đường ống chính, không nên lấy từ các thùng hay bồn chứa. Mở vòi nước thật lớn và để chảy ra ngoài từ 2-3 phút, trong thời gian này nhằm để rửa sạch hệ thống vòi nước trước khi lấy mẫu, giảm vòi nước để lấy mẫu vào trong các bình chứa. Trong một số trường hợp cần phải làm sạch vòi trước khi lấy mẫu, dung dịch sodium hypochlorite được cho chảy qua vòi trước khi lấy mẫu, sau khi khử trùng, phải mở nước vòi cho chảy khoảng 2-3 phút trước khi lấy mẫu vào chai. Không lấy mẫu từ các dòng nước chảy tràn bên ngoài vòi. Để ngăn ngừa các dòng nước chảy tràn từ bên ngoài vòi vào trong mẫu, có thể dùng dụng cụ phễu lọc để ngăn ngừa các dòng nước tràn từ bên ngoài vào trong bình chứa mẫu. Cũng có thể loại bỏ sự nhiễm từ bên ngoài do các dòng nước chảy tràn, cho nước nóng chảy qua vòi khoảng hai phút, làm lạnh từ 2-3 phút sau đó lấy mẫu vào bình.

Nếu lấy mẫu nước từ các giếng bơm tay, bơm nước để rửa vòi giếng khoảng 5 phút trước khi lấy mẫu. Nếu giếng đào được trang bị máy bơm, cũng thực hiện tương tự như trên sau khi khởi động máy. Trong trường hợp các giếng đào không có trang bị máy bơm, mẫu

được lấy trực tiếp từ giếng bằng cách buộc chai lấy mẫu vào một vật nặng ở bên dưới đáy. Phải thật cẩn thận để tránh sự nhiễm bẩn từ vật nặng hay nước trên bề mặt giếng.

Trong trường hợp lấy mẫu nước uống, phải lấy mẫu ở giai đoạn cuối của quá trình sản xuất, các vị trí phân phối mẫu nước uống phải được chọn lọc để đảm bảo sự tích lũy có hệ thống trong suốt mỗi tháng. Phải xem xét thật kỹ càng vị trí của hệ thống phân bố mẫu, ngay cả tại các điểm chiết để đảm bảo chất lượng vi sinh vật thông qua toàn bộ hệ thống để đảm bảo rằng không có các vị trí nhiễm vi sinh vật hay nhiễm chéo do quá trình tiên tục của hệ thống như hiện tượng bề ống hay giảm áp lực trong quá trình khử trùng hay một nguyên nhân nào đó khác. Vị trí lấy mẫu có thể là vòi nước công cộng, các nơi kinh doanh ngành thực phẩm, nhà hàng hay giếng nước các nhân ... Nhưng đặc biệt quan trọng khi lấy mẫu tại các mạng lưới cung cấp nước cho cộng đồng. Sự lấy mẫu, kế hoạch cũng như tần suất và vị trí lấy mẫu phải được lên chương trình có sự tham vấn của các chuyên gia vệ sinh y tế công cộng, và ngành cấp nước.

** Lấy mẫu tại các nguồn cấp nước:*

Mẫu được lấy trực tiếp từ các từ sông, suối, lạch, ao, các giếng hay các hồ chứa sao cho chúng đại diện cho nguồn nước cung cấp cho con người sử dụng. Mẫu không nên lấy quá gần bờ hay quá xa nơi đặt ống bơm nước, cũng không nên lấy mẫu quá sâu hay quá cạn so với vòi ống bơm. Mẫu được lấy càng gần miệng ống bơm, càng đại diện cho nguồn chất lượng của nguồn cấp nước.

** Kích cỡ mẫu:*

Thể tích mẫu phải đủ để đáp ứng các yêu cầu phân tích tại phòng thí nghiệm. Thể tích mẫu phải lấy không được nhỏ hơn 100ml.

Mẫu sau khi lấy phải ghi đầy đủ và chính xác về ký hiệu, tên và các dữ liệu được mô tả. Không tiến hành phân tích các mẫu không đầy đủ các dữ liệu yêu cầu.

4.2.2. Phân tích mẫu

Bước 1: Chuẩn bị mẫu

- Cân chính xác 10g (10ml) mẫu
- Thêm vào lượng mẫu này 90 ml dung dịch pha loãng Saline Pepton Water. Sau khi đồng nhất nhận được dung dịch mẫu có độ pha loãng 10⁻¹.
- Pha loãng mẫu ở độ loãng 10⁻², 10⁻³, 10⁻³, 10⁻⁴ ...

Bước 2. Cấy vi sinh vào đĩa Petri vô trùng

Bước 3. Ủ đĩa Petri trong tủ ấm

4.3. Kiểm tra kết quả thí nghiệm phân tích vi sinh vật trên cơ chất

Bước 1. Đếm số lượng khuẩn lạc mọc trên đĩa Petri

Bước 2. Nhuộm màu vi sinh vật trên đĩa Petri: Nhuộm Gram

Bước 3. Quan sát vi sinh vật đã nhuộm dưới kính hiển vi

Bước 4. Vẽ hình

Bước 5. Bảo quản và lưu giữ mẫu bệnh

TÓM TẮT CHƯƠNG IV

Vi sinh vật đóng vai trò gián tiếp trong sự liên kết các hạt đất với nhau và có vai trò trực tiếp trong việc tạo thành kết cấu đất. Vì vậy giữa vi sinh vật đất với các biện pháp kỹ thuật canh tác có mối quan hệ chặt chẽ với nhau. Việc cày xới, đảo trộn đất có tác dụng điều hoà chất dinh dưỡng, làm đất thoáng khí tạo điều kiện cho vi sinh vật phát triển mạnh. Mỗi loại cây trồng đều có một khu hệ vi sinh vật đặc trưng sống trong vùng rễ của nó. Bởi vậy luân canh cây trồng làm cho khu hệ vi sinh vật đất cân đối và phong phú hơn. Khi bón các loại phân hữu cơ và vô cơ vào đất, phân tác dụng nhanh hay chậm đến cây trồng là nhờ hoạt động của vi sinh vật; phân vô cơ cũng có tác dụng thúc đẩy sự sinh trưởng và phát triển của vi sinh vật đất vì nó có các nguyên tố N, P, K, Ca, vi lượng rất cần thiết cho vi sinh vật. Ngoài ra các loại thuốc hoá học trừ sâu, diệt cỏ gây tác động có hại tới vi sinh vật cũng như hệ sinh thái đất nói chung.

Trong công tác bảo vệ thực vật, vi sinh vật có vai trò quan trọng trong sản xuất các chế phẩm vi sinh. Bao gồm 3 nhóm: Nhóm chế phẩm sinh học ứng dụng cho việc phòng trừ sâu bệnh hại cây trồng, nhóm chế phẩm sinh học dùng cho sản xuất phân bón hữu cơ sinh học, phân hữu cơ vi sinh, chất kích thích tăng trưởng bón cho cây trồng và nhóm chế phẩm sinh học dùng cho cải tạo đất, xử lý phế thải nông nghiệp.

Trong công tác bảo quản nông sản cần chú ý đến sự hoạt động của các vi sinh vật chủ yếu là các nấm, vi khuẩn, xạ khuẩn. Các vi sinh vật này được đưa vào kho cùng lúc với sự cất giữ nông sản, vì chúng thường xuyên có mặt trong không khí.

CÂU HỎI ÔN TẬP

Câu 1. Trình bày mối quan hệ giữa vi sinh vật đất với các biện pháp kỹ thuật canh tác?

Câu 2. Trình bày vai trò của vi sinh vật trong công tác bảo vệ thực vật ? Nêu các ứng dụng trong thực tiễn.

Câu 3. Trình bày sự ảnh hưởng của vi sinh vật trong công tác bảo quản nông sản ? Nêu các ứng dụng trong thực tiễn.

Câu 4. Thực hành - Thực hiện thành thạo kỹ năng:

- Thu thập và xử lý mẫu: Mẫu nước và mẫu bệnh cây do vi sinh vật gây ra
- Các bước phân tích mẫu bệnh cây
- Các bước phân tích mẫu nước
- Kiểm tra kết quả thí nghiệm phân tích vi sinh vật trên cơ chất

Bài 1 CÁC QUY TẮC AN TOÀN TRONG PHÒNG THÍ NGHIỆM VI SINH

I. NHỮNG QUY ĐỊNH CHUNG

Thao tác an toàn là yêu cầu cực kỳ quan trọng đối với thí nghiệm vi sinh vật. Vi sinh vật có kích thước nhỏ bé mà mắt thường không nhìn thấy được. Trong quá trình làm thí nghiệm, chúng ta thường thao tác với số lượng rất lớn và đậm đặc tế bào vi sinh vật. Bên cạnh những giống, loài vi sinh vật có ích là những giống, loài có khả năng gây bệnh và có hại đối với sức khỏe con người. Mặt khác, trong quá trình thí nghiệm chúng ta cũng phải sử dụng nhiều loại hóa chất, trong đó có những hóa chất có độc tính, chính vì thế, người làm thí nghiệm trong phòng thí nghiệm vi sinh vật cần tuân thủ các qui tắc cơ bản sau đây:

- Những người không có nhiệm vụ không được vào phòng thí nghiệm.
- Khi vào phòng thí nghiệm phải mặc áo Blouse (cài khuy kín), cột tóc gọn gàng.
- Không nói chuyện ồn ào, giữ gìn trật tự.
- Không ăn uống, hút thuốc trong phòng thí nghiệm.
- Mang khẩu trang, găng tay khi thao tác với vi sinh vật và hóa chất.
- Trên bàn thí nghiệm chỉ để vật dụng thí nghiệm, sổ ghi chép, giấy ghi chép. Tất cả các vật dụng cá nhân, áo khoác, túi xách, sách vở,... phải để đúng nơi qui định.
- Trước và sau khi kết thúc thí nghiệm, phải sát trùng mặt bàn bằng các hóa chất sát trùng đã chuẩn bị sẵn và lau khô.
- Cần ghi chú tên chủng, ngày tháng thí nghiệm, người làm thí nghiệm lên tất cả các đĩa petri, ống nghiệm,...
- Tuyệt đối không để môi trường hay vật phẩm có vi sinh vật dấy lên quần áo, sách vở và dụng cụ cá nhân. Đồng thời cũng phải chú ý bảo vệ da và quần áo khỏi bị dính hóa chất và thuốc nhuộm.
- Cần thận khi thao tác với đèn cồn hoặc đèn Bunsen. Tắt ngọn lửa khi chưa có nhu cầu sử dụng hoặc ngay sau khi thực hiện xong mỗi thao tác. Tuyệt đối không dùng đèn cồn để môi lửa đèn cồn.
- Sử dụng quả bóp cao su khi thao tác ống hút định lượng (pipette). Tuyệt đối không hút hóa chất, môi trường bằng miệng.
- Không tự ý sử dụng trang thiết bị, dụng cụ trong phòng thí nghiệm khi chưa được hướng dẫn cụ thể. Sử dụng theo hướng dẫn, hết sức thận trọng, tránh làm đổ vỡ và hư hỏng.
- Tất cả các vật liệu bị nhiễm bẩn cần phải được khử trùng trước khi vứt bỏ hoặc sử dụng lại.
- Kết thúc thí nghiệm phải vệ sinh các thiết bị, dụng cụ đã sử dụng theo đúng quy trình và sắp xếp vào đúng nơi qui định.
- Rửa tay sạch sẽ trước khi rời phòng thí nghiệm.

- Tất cả các trường hợp tai nạn phải báo cáo cho cán bộ hướng dẫn thí nghiệm để kịp thời và xử lý.

II. MỘT SỐ LƯU Ý VỚI SINH VIÊN

Trước khi thực hành:

- Cần đọc bài trước nội dung toàn bài để hình dung được khối lượng công việc sẽ làm.
- Hiểu rõ nguyên tắc, mục đích của các thí nghiệm.
- Đọc cẩn thận cách tiến hành thí nghiệm.

Trong giờ thực hành:

- Ghi chú cẩn thận những căn dặn của giảng viên về các thao tác và qui trình thực hành.
- Thực hiện thí nghiệm theo đúng hướng dẫn của giảng viên.
- Trong quá trình thí nghiệm có những thao tác, công đoạn không rõ cần hỏi lại giảng viên hướng dẫn.
- Ghi chép cẩn thận các chú ý quan trọng của thí nghiệm và kết quả của mỗi thí nghiệm.

Kết thúc thực hành:

- Làm báo cáo thực hành theo yêu cầu của giảng viên.

Bài 2 THIẾT BỊ - DỤNG CỤ PHÒNG THÍ NGHIỆM VI SINH

I. TRANG THIẾT BỊ

1. **Tủ sấy (vacuum oven):** nhiệt độ từ 60°C – 200°C , dùng để sấy khô, khử trùng các loại dụng cụ chịu được sức nóng khô, chủ yếu là dụng cụ thủy tinh, kim loại.



Hình 2.1 Tủ sấy

2. **Tủ ấm (incubator or etuve):** nhiệt độ từ 20°C – 60°C , có chế độ ổn định nhiệt độ, được sử dụng để nuôi cấy vi sinh vật tại nhiệt độ thích hợp cho sự sinh trưởng và phát triển của chúng.

3. **Tủ lạnh hay tủ mát (freezer):** dùng bảo quản môi trường đã pha chế, giống vi khuẩn, các chế phẩm sinh học (vaccin, huyết thanh, đĩa giấy kháng sinh,...), hóa chất, thuốc thử để phân hủy ở nhiệt độ thường.

4. **Nồi hấp ướ́t (Autoclave):** thiết bị này cấp nhiệt bằng hơi nước ở áp suất cao (hơi nước bão hòa ở áp suất cao), được sử dụng để hấp khử trùng môi trường, một số nguyên liệu và dụng cụ thí nghiệm.



A



B

Hình 2.2 Nồi hấp áp lực hơi nước
(A) Autoclave, (B) Nồi hấp bán tự động

5. Cân phân tích điện tử (analytical balance): trọng lượng từ $100\mu\text{g}$ – 200g . Độ chính xác 10^{-4} g. Cân kỹ thuật (technical balance): độ chính xác 10^{-2} g. Dùng cân hóa chất, môi trường.



Hình 2.3 A- cân phân tích, B- cân kỹ thuật

6. Tủ cấy vô trùng có đèn cực tím (UV) (flux laminar): tạo không gian vô trùng được sử dụng để thao tác với vi sinh vật nhờ hệ thống đèn tử ngoại và bộ phận thổi khí vô trùng.



Hình 2.4 Tủ cấy

7. Máy ly tâm (centrifuge): Dùng tách các chất ở các pha rắn - lỏng ra khỏi nhau như tách sinh khối tế bào ra khỏi môi trường nuôi cấy, tách hồng cầu, enzyme,...



Hình 2.5 Máy ly tâm

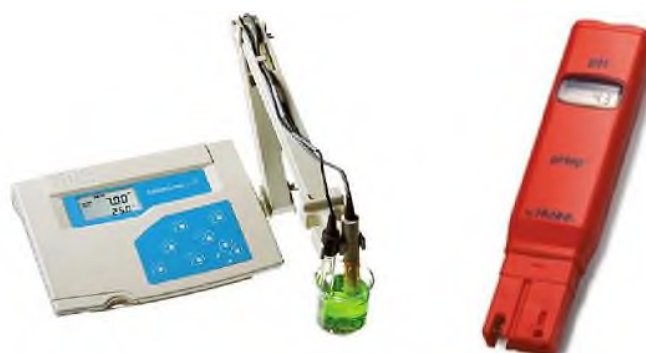
8. Máy lắc (shaker): Thiết bị dùng để nuôi cấy, nhân giống vi sinh vật bằng cách lắc các bình nuôi cấy theo các chiều khác nhau (lắc vòng và lắc ngang) một cách đều đặn để tăng lượng oxy hòa tan trong môi trường.



Hình 2.6 Máy lắc

9. Kính hiển vi (microscope): có vai trò rất quan trọng nghiên cứu vi sinh vật. Dùng nghiên cứu, quan sát tế bào vi sinh vật về đặc điểm hình thái, sinh lý nhờ vào khả năng phóng đại của kính (sẽ giới thiệu chi tiết ở mục III).

10. Máy đo pH (pH meter): đo pH dung dịch, môi trường nuôi cấy,...



Hình 2.7 A- máy đo pH để bàn, B- máy đo pH cầm tay

11. Máy cất nước (single/ double water stills): dùng để cất nước.



Hình 2.8 Máy cất nước 1 lần

12. Bể ổn nhiệt (water bath): chứa nước và được cài đặt ở nhiệt độ nhất định để ổn định nhiệt độ cho những thí nghiệm cần sự ổn định về nhiệt độ.



Hình 2.9 Bể ổn nhiệt

13. Nồi lên men (fermenter): thiết bị lên men nuôi cấy vi sinh vật



Hình 2.10 Nồi lên men

14. Các thiết bị khác như: máy đếm vi sinh vật, máy quang phổ, sấy đông khô,...

II. DỤNG CỤ

1. Dụng cụ thủy tinh: có nhiều loại với nhiều kích cỡ khác nhau như bình tam giác, ống nghiệm, đĩa petri, lam kính, đĩa thủy tinh, que trang, ống đong, cốc đong, bình định mức,... yêu cầu phải sạch, trong, trung tính. Trước khi dùng để đựng môi trường, dụng cụ thủy tinh phải được sấy khô, làm nút bông và khử trùng bằng nồi hấp hoặc trong tủ sấy khô.

- Đối với dụng cụ mới: cần ngâm nước hoặc dung dịch H_2SO_4 loãng trong 24 giờ. Sau đó mới rửa lại bằng nước hoặc xà phòng nhiều lần cho đến khi pH trung tính.
- Đối với dụng cụ đã qua sử dụng còn chứa môi trường và vi sinh vật, cần khử trùng rồi mới rửa sạch bằng xà phòng, phơi và sấy khô.
- Đối với dụng cụ bị bám bẩn, cần ngâm thêm với dung dịch sulfocromic vài giờ, sau đó rửa lại bằng nước sạch.

Dụng cụ sạch khi đưa lên ánh sáng không có vết mờ và vết bọt.

2. Các dụng cụ khác: như đèn cồn, giá ống nghiệm, que cấy, kẹp, kéo, bơm tiêm nhựa, đầu tít, bếp điện,...

III. GIỚI THIỆU CÁC LOẠI KÍNH HIỂN VI

1. Kính hiển vi nền đen

* Nguyên tắc: ánh sáng thường chiếu từ dưới lên, qua rìa của tụ quang nền đen, chiếu hắt vào xung quanh tiêu bản, những tia sáng này bị tiêu bản làm khúc xạ rồi đưa vào vật kính. Tiêu bản được soi sáng rực trên nền đen, giống như trong phòng tối có một tia sáng mạnh chiếu vào, giúp thấy rõ từng hạt bụi trong không khí bị tia sáng chiếu vào.

* Chức năng: quan sát hình thái và đặc tính của một số vi khuẩn mà kính hiển vi thường khó quan sát.

2. Kính hiển vi đối pha

* Nguyên tắc: ánh sáng thường bị đối pha và biên độ dao động bởi cấu trúc đặc biệt của tụ quang kính, vật kính và thị kính.

* Chức năng: dùng quan sát rõ nét các cấu trúc nhỏ như tiên mao, các lớp màng.

3. Kính hiển vi huỳnh quang

* Nguyên tắc: chùm tia tử ngoại chiếu vào tiêu bản đã nhuộm màu bằng các chất huỳnh quang. Trong tế bào, các cấu trúc khác nhau sẽ phát quang với màu sắc khác nhau.

* Chức năng: quan sát và phân biệt được các cấu trúc khác nhau trong tế bào vi sinh vật.

4. Kính hiển vi điện tử

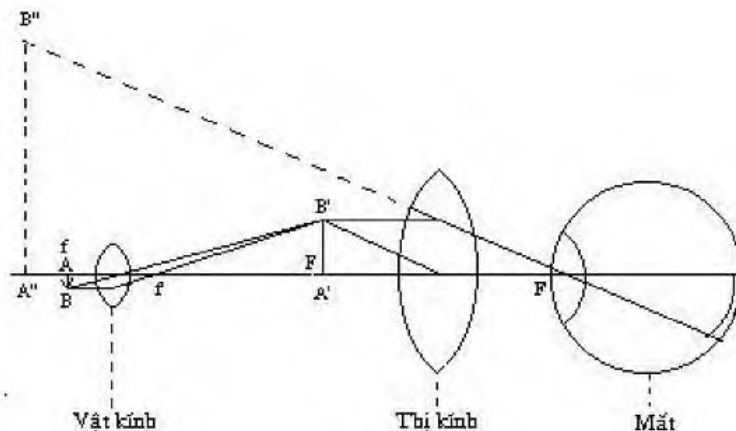
* Nguyên tắc: chùm tia điện tử bước sóng rất ngắn, năng suất phân li rất lớn nên độ phân giải cao, giúp phân biệt 2 điểm rất gần nhau.

* Chức năng: dùng quan sát virus, cấu trúc phân tử của tế bào.

5. Kính hiển vi quang học

* Nguyên tắc: dùng ánh sáng có bước sóng từ 500 nm – 560 nm trong chùm ánh sáng thường để tạo năng suất phân ly lớn giúp phân biệt 2 điểm cách nhau khoảng 0,2 μm trở lên.

Hệ thống phóng to của kính hiển vi quang học gồm hai bộ phận: vật kính (quay về phía vật quan sát) và thị kính (quay về phía mắt nhìn). Mỗi bộ phận này là một hệ thống thấu kính hội tụ phức tạp, mẫu vật cần quan sát AB được đặt trước vật kính một khoảng cách lớn hơn tiêu cự của vật kính một chút. Ảnh thật đảo ngược A'B' của vật sẽ thu được ở bên kia vật kính, nằm trong khoảng tiêu cự của thị kính. Thị kính hoạt động như một kính lúp. Qua thị kính, người ta sẽ thấy ảnh ảo A''B'' được phóng to lên của ảnh thật A'B'



Hình Nguyên tắc quang học của kính hiển vi.

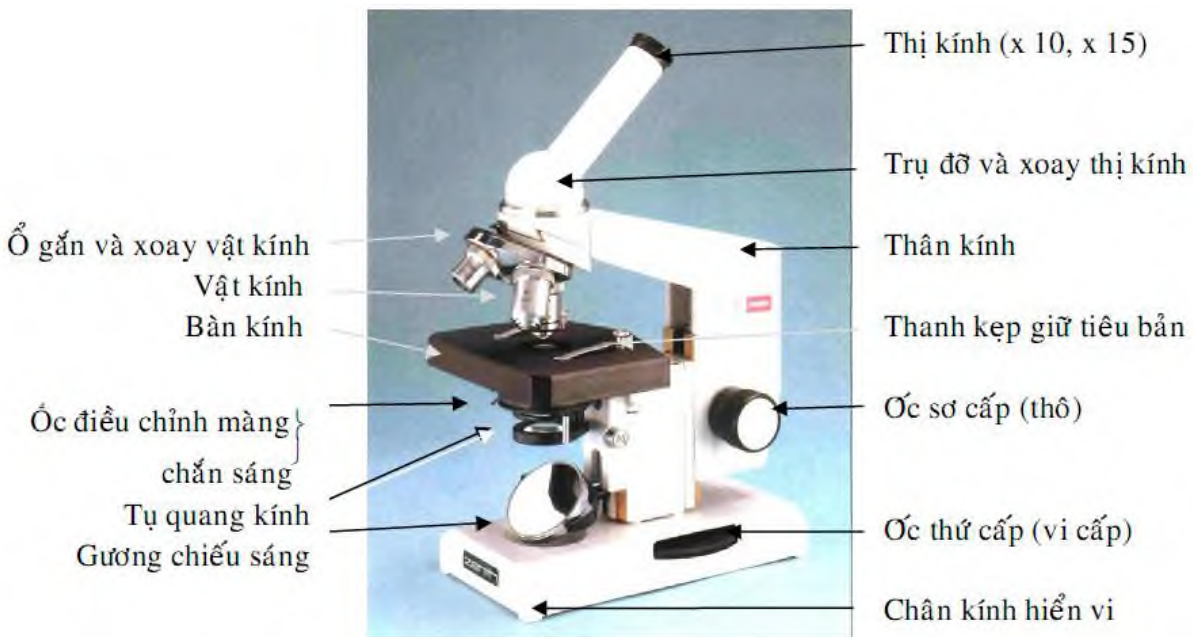
* Chức năng: quan sát tế bào vi sinh vật, ký sinh trùng, tế bào động vật, thực vật.

* Cấu tạo: gồm 2 phần

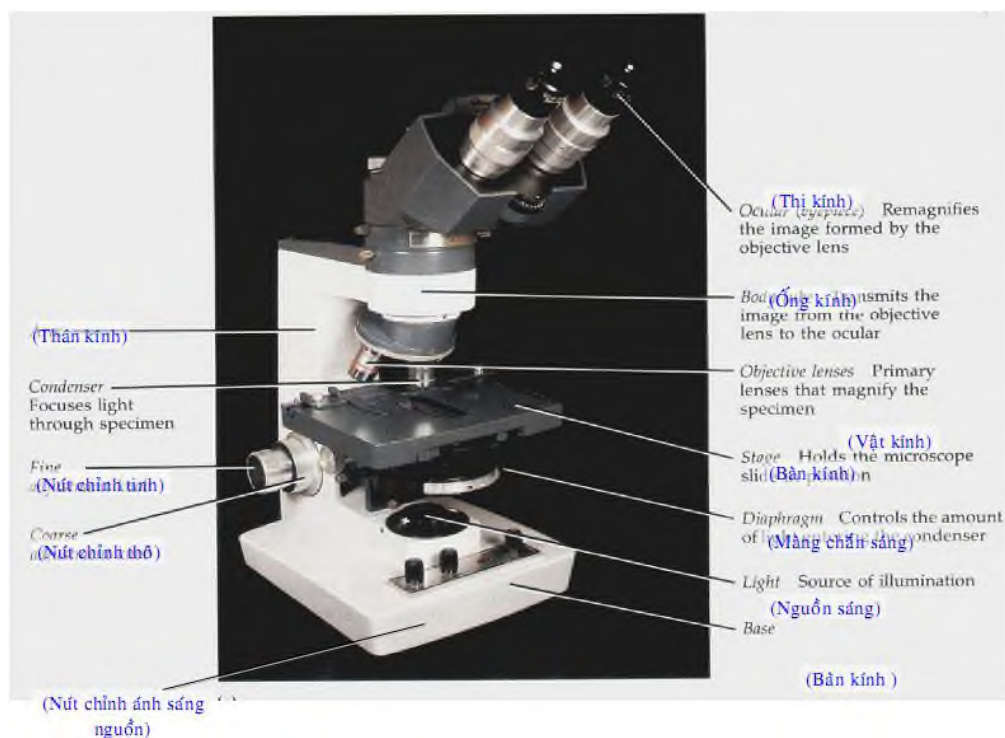
- Hệ thống cơ học: giá kính gồm chân kính, thân kính, trụ đỡ và xoay thị kính, ổ gắn và xoay vật kính, bàn kính, thanh trượt di chuyển tiêu bản, ốc di chuyển thanh trượt, kẹp giữ tiêu bản, ốc di chuyển tụ quang kính, ốc điều chỉnh sơ thô cấp, ốc điều chỉnh thứ cấp (vi cấp).

- Hệ thống quang học gồm: thị kính, vật kính, tụ quang kính, màn chắn sáng, nguồn chiếu sáng (đèn điện chiếu sáng và/ hoặc kính chiếu sáng).

Ngoài ra, ở kính dùng nguồn chiếu sáng là đèn điện thì có thêm bộ phận cung cấp điện như phích cắm, dây điện, cầu chì, mạch điện (trong chân kính) và nút điều chỉnh cường độ chiếu sáng.



Hình Các bộ phận KHV quang học – dùng gương.



Hình Các bộ phận KHV quang học – dùng đèn.

* Nguyên tắc hoạt động: vật kính là hệ thống quang học phức tạp gồm một số thấu kính trực tiếp phóng đại mẫu vật. Các thấu kính sắp xếp theo thứ tự, thấu kính nhỏ ngoài cùng hướng vào tiêu bản có độ phóng đại lớn nhất. Độ phóng đại của kính phụ thuộc tiêu cự, tức bán kính cong của thấu kính. Thấu kính càng cong, tiêu cự càng ngắn thì khả năng phóng đại càng lớn.

Có 2 loại vật kính:

- Vật kính khô độ phóng đại nhỏ như x8, x10, x15, x40, x45.
- Vật kính dầu có độ phóng đại lớn như x90, x100.

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

Độ phóng đại của kính = độ phóng đại của vật kính x độ phóng đại của thị kính.

Ví dụ: Độ phóng đại của vật kính: x100

Độ phóng đại của thị kính: x10

Độ phóng đại của kính: $100 \times 10 = 1.000$ lần.

Năng suất phân ly (độ phân giải) của kính hiển vi là đại lượng cho biết khả năng phân biệt hai điểm của vật quan sát nằm sát nhau. Năng suất phân ly của kính quan trọng hơn độ phóng đại, và là tiêu chuẩn chính để chọn kính hiển vi. Nếu khoảng cách giữa 2 điểm nằm càng sát nhau mà vẫn có thể phân biệt được thì năng suất phân ly của kính càng cao.

Khoảng cách này phụ thuộc chiều dài sóng ánh sáng sử dụng và số lượng tia sáng đi vào vật kính, được biểu hiện bằng công thức:

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

Trong đó: λ : Độ dài bước sóng phát ra từ mẫu vật
 n : Chỉ số chiết quang của môi trường giữa mẫu vật và vật kính
 α : Nửa góc mở của vật kính
 $2n \sin \alpha$: Trị số mở của vật kính

Như vậy, muốn có độ phân ly cao phải dùng ánh sáng có bước sóng thật ngắn, hoặc dùng vật kính có trị số mở lớn. Nếu dùng vật kính có trị số mở 0,65 và soi với ánh sáng trắng (có bước sóng trung bình $\lambda = 0,55 \text{ mm}$) thì khoảng cách nhỏ nhất có thể nhìn thấy rõ được là:

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

Với những chi tiết có khoảng cách nhau dưới 0,85 mm thì người ta không phân biệt được. Trong khi đó nếu dùng thị kính có độ phóng đại lớn hơn cũng không ích gì mà phải thay vật kính khác có trị số mở lớn hơn.

Nếu thay vật kính chìm (vật kính dầu x100) thì khoảng cách nhỏ nhất giữa các chi tiết của vật soi có thể thấy được là:

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

Vì λ đã xác định bởi nguồn ánh sáng thấy, muốn giảm d để tăng khả năng phân tích của kính thì chỉ có cách là tăng $n \sin \alpha$. Trong số này góc α bị giới hạn bởi nhiều sai lệch khó điều chỉnh, còn lại là chỉ số chiết quang n . Nhưng n không được cao hơn chỉ số chiết quang của các thấu kính trong vật kính, nên người ta chỉ nâng n giữa vật kính và mẫu vật bằng một chất dầu gọi là dầu bách hương (dầu cede) để đạt chỉ số chiết quang tối đa mong muốn bằng chỉ số chiết quang của thấu kính.

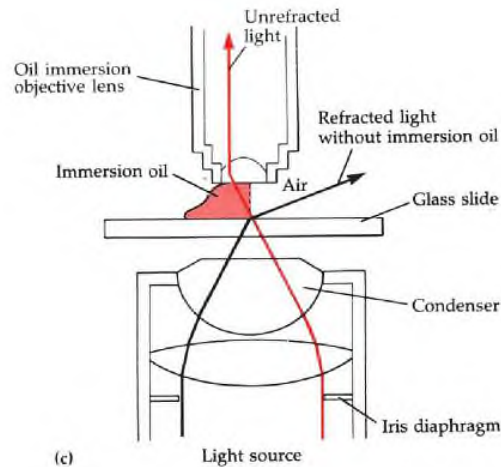
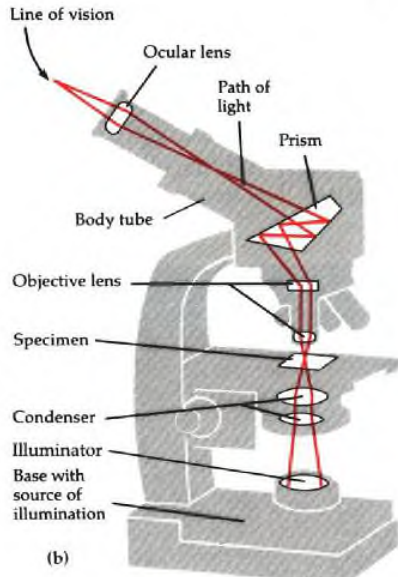
n không khí = 1,000

n thủy tinh = 1,515

n dầu soi = 1,520

Chiết suất ánh sáng của không khí nhỏ hơn thủy tinh, nên tia sáng khi đi qua tiêu bản thủy tinh sẽ bị khúc xạ một phần. Phần phía ngoài của tia sáng do bị khúc xạ nên không đi vào được vật kính. Vật kính có độ phóng đại lớn thì đường kính của thấu kính càng nhỏ,

lượng tia sáng đi vào được vật kính rất ít, nên không thấy rõ ảnh. Để hạn chế nhược điểm này ta dùng dầu soi có chiết suất ánh sáng gần bằng thủy tinh, thủy tinh và dầu soi được xem như một môi trường đồng nhất. Ánh sáng đi qua không bị khúc xạ, nên tập trung đầy đủ vào vật kính, giúp xem rõ ảnh. Năng suất phân ly của kính càng cao thì góc nghiêng càng lớn và bước sóng càng nhỏ. Tăng góc nghiêng bằng cách chế tạo vật kính sao cho vật quan sát (tiêu bản) được đặt gần vật kính.



Hình Đường đi của tia sáng

Hình Nguyên lý hoạt động của vật kính dầu

Kính tụ quang là hệ thống thấu kính dùng tập trung ánh sáng vào tiêu bản, tăng cường độ chiếu sáng, rất quan trọng khi dùng vật kính dầu.

Với vật kính khô ta dùng tụ quang có độ mở (A): 0,20 – 0,65.

Với vật kính dầu thường dùng tụ quang có độ mở từ: 1,20 – 1,30.

Trong tụ quang có màng chắn sáng, khi tia sáng càng mạnh thì màu của vật quan sát càng mờ nhạt, nên khép bớt màn chắn sáng lại. Ngược lại, cần mở hết chắn sáng ra, khi dùng vật kính dầu.

Điều chỉnh tụ quang cần lưu ý:

- Khi nguồn sáng ở xa thì dùng gương phẳng, vì tụ quang chỉ tập trung được các tia sáng song song.
- Điểm giữa của tụ quang phải trùng với trục quang học của kính.
- Độ mở của tụ quang phải tương ứng hơn độ mở của vật kính.

Vậy ta dùng màng chắn sáng điều chỉnh cho độ mở của tụ quang nhỏ đi, loại bớt ánh sáng khuếch tán làm ảnh rõ hơn (mối tương quan giữa vật kính và lá chắn điều chỉnh ánh sáng)

- Nguồn sáng quyết định hình ảnh của tiêu bản, độ phóng đại càng cao thì nguồn sáng phải càng mạnh. Để điều khiển cường độ chiếu sáng có thể dùng đèn chiếu sáng rời hoặc lắp vào để kính kết hợp với màng chắn sáng.

* Cách sử dụng: trước khi sử dụng phải kiểm tra tất cả các bộ phận của kính, dùng khăn mềm để lau các bộ phận của kính (Chú ý: chỉ lau bên ngoài, không tháo rời các bộ phận của kính), để kính ngay ngắn vừa với tầm ngồi, sau đó tiến hành tuân tự các bước tiếp theo để soi tiêu bản.

+ Bước 1: Lấy ánh sáng

Đối với kính hiển vi phải dùng gương để lấy ánh sáng từ bên ngoài thì làm như sau: Chọn phía sáng nhất để làm nguồn sáng, quay gương về phía nguồn sáng đã chọn (nếu ánh sáng mạnh thì dùng mặt phẳng, nếu ánh sáng yếu thì dùng mặt lõm của gương), mở que chắn sáng nếu hệ thống chắn sáng bị đóng. Mắt nhìn qua lỗ trên mâm kính, tay điều khiển gương sao cho thấy mặt trên hộp tụ quang có 1 chùm sáng mạnh là đạt yêu cầu. Xoay vật kính nhỏ nhất (vật kính 10) về trục kính (khi nghe tiếng cạch nhẹ là đã đúng vị trí).

Mắt nhìn vào thị kính, thấy vi trường sáng tròn đều là được. Nếu vi trường chưa sáng tròn đều thì mắt nhìn vào thị kính, tay điều khiển gương cho đến khi được vi trường sáng tròn đều.

Đối với kính hiển vi dùng ánh sáng đèn thì cắm dây đèn vào ổ cắm, bật công tắc, điều khiển núm chỉnh ánh sáng ở đế kính để có được ánh sáng thích hợp. Xoay vật kính nhỏ nhất (vật kính x10) về trục kính như trên.

+ Bước 2: Đặt tiêu bản vào mâm kính

Trước khi đặt tiêu bản vào mâm kính, phải chọn mặt phải, mặt trái của tiêu bản. Mặt phải của tiêu bản thường có dán lamén, dán nhãn (nếu có lamén và nhãn) hoặc làm giảm bớt độ lóa của gương khi để nghiêng soi ra ánh sáng (nếu không có lamén, không có nhãn).

Để mặt phải của tiêu bản lên trên, tay phải mở kẹp tiêu bản, tay trái cầm phía đầu nhãn tiêu bản, đặt tiêu bản vào mâm kính và tay phải thả kẹp giữ tiêu bản ra. Tiêu bản được giữ chặt vào xe đẩy, trên mâm kính.

Dùng ốc xe đẩy để điều chỉnh sao cho mẫu vật nằm đúng vào trục kính (giữa lỗ mâm kính).

Chú ý: Có thể dùng điểm sáng của hộp tụ quang để làm điểm chuẩn khi điều chỉnh mẫu vật về điểm trục kính, nếu mẫu vật nhỏ quá.

+ Bước 3: Quan sát

Nguyên tắc bắt buộc khi quan sát là phải quan sát được ở vật kính có độ phóng đại nhỏ, rồi mới chuyển sang quan sát ở vật kính có độ phóng đại lớn hơn kề nó.

Xem tiêu bản ở vật kính x10:

- Hạ tụ quang kính xuống dưới (tức tăng khoảng cách tụ quang với tiêu bản, thị trường mờ đi).
- Xoay vật kính x10 vào khớp của ổ đỡ vật kính (hướng vật kính vào tụ quang).
- Mắt nhìn vào bàn đặt tiêu bản (không nhìn vào thị kính), hai tay xoay ốc điều chỉnh sơ cấp đưa dần vật kính hướng đến tiêu bản (không được chạm vào tiêu bản).
- Đặt mắt hướng vào thị kính, hai tay xoay chậm ốc điều chỉnh sơ cấp hướng ra xa tiêu bản đến khi mắt thấy rõ dần tiêu bản mẫu vật thì dừng lại.

- Hai tay nắm ốc vi cấp điều chỉnh cho ảnh rõ nhất.
- Mắt vẫn hướng vào thị kính, điều chỉnh một lần nữa khoảng cách của tụ quang kính với tiêu bản và màn chắn sáng sao cho ảnh rõ nhất.

Xem tiêu bản ở vật kính x40:

- Nâng tụ quang kính lên vừa phải (thị trường sáng hơn).
- Xoay vật kính x40 vào khớp của ổ đỡ vật kính (hướng vật kính vào tụ quang).
- Đặt mắt hướng vào thị kính, có thể nhìn thấy ngay hình thái của mẫu vật (đôi khi không rõ lắm). Hai tay nắm ốc vi cấp điều chỉnh cho ảnh rõ nhất.
- Mắt vẫn hướng vào thị kính, điều chỉnh một lần nữa khoảng cách của tụ quang kính với tiêu bản và màn chắn sáng sao cho ảnh rõ nhất.

Xem tiêu bản ở vật kính x90, x100:

- Nâng tụ quang kính lên sát tiêu bản, mở cường độ sáng tối đa (thị trường sáng nhất).
- Xoay vật kính x100 vào khớp của trụ đỡ vật kính (hướng vật kính vào tụ quang).
- Nhỏ một giọt dầu soi vào giữa tiêu bản.
- Mắt nhìn vào bàn đặt tiêu bản (không nhìn vào thị kính), hai tay xoay ốc điều chỉnh sơ cấp đưa dần vật kính hướng đến tiêu bản vừa chạm vào tiêu bản thì dừng lại.
- Đặt mắt hướng vào thị kính, hai tay xoay chậm ốc điều chỉnh sơ cấp hướng ra xa tiêu bản đến khi mắt thấy rõ dần tiêu bản mẫu vật thì dừng lại.

Lưu ý: Khi di chuyển vật kính quá xa, đầu vật kính không còn nhúng vào giọt dầu soi thì thị trường tối hẳn đi.

- Hai tay nắm ốc vi cấp điều chỉnh cho ảnh rõ nhất.
- Mắt vẫn hướng vào thị kính, điều chỉnh một lần nữa khoảng cách của tụ quang kính với tiêu bản và chỉnh màn chắn sáng sao cho ảnh rõ nhất.

* Bảo quản

- Sau khi sử dụng xong, xoay tất cả các vật kính ra trước, mở kẹp tiêu bản, lấy tiêu bản ra trả về chỗ cũ, hạ mâm kính, hạ hộp tụ quang. Dùng hai tay bê kính cất vào tủ chống ẩm (tủ bảo quản KHV).
- Phải giữ gìn kính luôn luôn sạch sẽ, không để bụi bẩn và hóa chất dính vào. Luôn luôn giữ kính ở nơi khô ráo, mát mẻ để các bộ phận quang học không bị mốc.
- Khi lau kính, khi sử dụng kính, không được tháo rời các bộ phận của kính. Không được dùng tay xoa trên mặt các thấu kính, mà nên dùng một bút lông nhỏ sạch để chải bụi ở các mặt kính hoặc dùng bông mềm, sạch để lau.
- Nếu sử dụng vật kính x100 thì phải dùng dung dịch phù hợp thấm vào giấy chuyên dụng để lau sạch dầu cede đầu vật kính x100.
- Tránh mọi sự va chạm mạnh vào kính, không đánh đổ, đánh rơi kính. Nếu di chuyển kính ra khỏi phòng thí nghiệm, nhất thiết phải đưa kính vào hộp của nó có chèn lót cẩn thận.

- Nếu phát hiện có 1 hư hỏng nào đó, nhất thiết không được tự ý tháo ra sửa chữa mà phải báo với cán bộ hướng dẫn biết để xử lý.

Bài 3 PHƯƠNG PHÁP KHỬ TRÙNG

động chủ yếu dựa vào các tác nhân lý hóa (nhiệt độ, bức xạ, lọc và hóa chất) để diệt vi sinh vật. Có thể khử trùng bằng phương pháp nhiệt khô hoặc nhiệt ẩm. Với tác nhân khử trùng bức xạ, năng lượng chiếu xạ ở bước sóng ngắn (tia X, tia gamma) có khả năng ion hóa phân tử nước tạo ra các gốc tự do tác dụng phá hủy DNA, màng lipid và protein trong tế bào. Các dịch lỏng có thể được khử trùng bằng cách lọc qua màng với kích thước lỗ 0,2 mm, cho phép dịch lỏng đi qua và giữ lại tất cả vi khuẩn và các vi sinh vật có kích thước lớn hơn. Ethylen oxid, Triethyl glycol, chất diệt khuẩn, kháng sinh...được sử dụng để khử trùng, ức chế sự sống và tăng trưởng của vi sinh vật. Tác nhân khử trùng được chọn tùy mục đích và vật liệu cần khử trùng.

1. Khử trùng bằng nhiệt

a. Nhiệt khô (lò Pasteur hay tủ sấy): dùng để khử trùng các dụng cụ bằng kim loại hay thủy tinh. Quá trình này được thực hiện trong tủ sấy (là một lò sấy kín bằng kim loại, được đốt nóng bằng điện trở hay chất khí). Nhiệt độ trong tủ sấy có thể lên đến 180°C và khí nóng tỏa đều trong tủ. Dụng cụ được sấy ở **180°C/30 phút** hay **160°C/2 giờ**. Tắt tủ sấy khi sử dụng xong, chờ nhiệt độ giảm **dưới 80°C** mới được mở cửa tủ.

b. Nhiệt ẩm: phương pháp này làm nóng nhanh, hơi nóng nhiều và thấm sâu vào phẩm vật. Vi sinh vật chết vì protein bị đông kết lại.

Bảng 3.1 Nhiệt độ và thời gian khử trùng bằng nhiệt ẩm

Vi sinh vật	Nhiệt độ khử trùng			
	Tế bào dinh dưỡng		Bào tử	
	Nhiệt độ (°C)	Thời gian (phút)	Nhiệt độ (°C)	Thời gian (phút)

Nấm men	50 – 70	5 - 10	70 – 80	5 – 10
Nấm mốc	60	5 – 10	70	5 – 10
Vi khuẩn không bào tử	60 – 70	5 – 10		
Vi khuẩn có bào tử	60 – 70	5 – 10	120	12
Siêu vi trùng	60 – 70	5 – 10		

c. Hơ trực tiếp trên lửa: que cấy, kéo, kẹp...có thể được khử trùng theo cách này hay là nhúng vào cồn rồi hơ.

d. Phương pháp hấp Pasteur (hấp cách thủy): sữa, kem, thức uống lên men phải qua một lần khử trùng bằng nhiệt. Quá trình này không diệt hoàn toàn vi sinh vật mà chỉ diệt vi khuẩn dị dưỡng gây bệnh, không diệt được các vi khuẩn hoại sinh có bào tử. Khi sử dụng phương pháp này, phải chọn nhiệt độ và thời gian cần thiết để diệt một loại vi khuẩn đối kháng mạnh nhất mà ta cần diệt. Ưu điểm của phương pháp này là giữ được hương vị và phẩm chất của chất cần được khử trùng.

e. Đun sôi: thường thêm vào 1% bicarbonat natri để tăng nhiệt độ sôi. Phương pháp này chỉ diệt tế bào dinh dưỡng, bào tử và nấm vẫn còn. Thường dùng cho kim và ống chích.

f. Chưng cách thủy nhiều lần: với môi trường chứa huyết thanh hay những chất dễ hư ở nhiệt độ cao phải áp dụng phương pháp này ở nhiệt độ 70 – 80°C, mỗi ngày đun 1 giờ và thực hiện liên tục trong 3 ngày liên.

g. Hơi nước lưu thông: dùng để khử trùng môi trường và dung dịch hóa học không chịu nhiệt độ trên 100°C. Có thể dùng autoclave nhưng luôn mở van thoát hơi (để nhiệt độ không lên quá 100°C. Hấp từ 30 phút đến 1 giờ.

Cũng như phương pháp chưng cách thủy nhiều lần, những phẩm vật khử trùng theo phương pháp này phải được kiểm soát sự vô trùng bằng cách để ở 37°C trong 24 giờ.

h. Hơi nước bão hòa ở áp suất cao (Autoclave): phương pháp này dựa trên nguyên tắc làm gia tăng nhiệt vật khử trùng bằng hơi nước bão hòa dưới áp suất lớn hơn áp suất khí quyển. Khi áp suất hơi nước tăng thì nhiệt độ cũng tăng. Phương pháp này có thể tiêu diệt cả tế bào dinh dưỡng lẫn bào tử vi sinh vật.

Bảng 2.2 Nhiệt độ hơi nước bão hòa ở các áp suất khác nhau

<i>Áp suất (atm)</i>	<i>Nhiệt độ (°C)</i>
0	100
0,5	112
1,0	121
1,5	128
2,0	135

Chú ý: thường hấp khử trùng ở **nhệt độ 121°C** và áp suất **1,2 atm**. Thời gian hấp tùy thuộc thể tích vật cần khử trùng và dụng cụ để chứa vật đó.

Bảng 2.3 Thời gian khử trùng ở 121°C cho các loại dụng cụ

Dụng cụ	Thể tích	Thời gian khử trùng ở 121°C
Ống nghiệm	10 ml	15'
Bình tam giác	50 – 200 ml	15'
Bình tam giác	500 ml	17' – 20'
Bình tam giác	1000 ml	25'
Bình tam giác	2000 ml	35'

2. Khử trùng bằng hóa chất

Sự phân loại và sử dụng các chất hóa học căn cứ vào các điểm sau:

- Tính chất của vật cần sát trùng (ví dụ: thuốc sát trùng dụng cụ không thể được dùng cho da)
- Loại vi sinh vật cần khử. Một chất diệt khuẩn mạnh có thể diệt nấm yếu nhưng một chất diệt virus có thể không tác dụng với vi nấm.
- Cần ấn định rõ các điều kiện tổng quát như nhiệt độ, pH, thời gian, nồng độ.

Chất khử trùng	Hình thức sử dụng	Tác dụng
Phenol	Dung dịch 2-5%	- Tẩy uế, sát trùng dụng cụ thí nghiệm - Tẩy trùng phòng - Không được thoa lên da - Tính sát trùng giảm khi nhiệt độ giảm. - Thường dùng các chất chuyển hóa của phenol như crésol, hexachlorophene
Rượu (etylic)	Nồng độ 70%	- Dùng sát trùng ngoài da. - Còn làm đông kết protein vi khuẩn.
Iode		- Tác dụng lên hầu hết các loại vi sinh vật kể cả virus. - Thường dùng để sát trùng ngoài da, tẩy uế nước
Kim loại nặng	HgO Metaphène AgNO ₃ 1% CuSO ₄	- Dùng làm thuốc mỡ - Dùng sát trùng ngoài da và các màng nhày - Dung dịch tác dụng lên hầu hết vi sinh vật - Tác dụng chủ yếu lên nấm mốc.
Thuốc tẩy		Tạo nhũ tương với chất béo trên da trong đó có vi khuẩn, chỉ làm giảm đi số vi khuẩn mà không sát khuẩn thực sự.

3. Khử trùng bằng màng lọc

Phương pháp này dùng để khử trùng các chất lỏng dễ bị hư hỏng ở nhiệt độ cao trên 60°C như huyết thanh. Nguyên tắc của phương pháp này là cho dung dịch lọc qua màng

lọc với những lỗ có đường kính nhỏ hơn đường kính của vi sinh vật nhỏ nhất. Vi sinh vật sẽ bị giữ lại trên màng lọc, còn dung dịch sẽ đi qua và được vô trùng. Màng lọc có thể bằng sứ, amiante, cellulose, hỗn hợp cellulose và ester của cellulose. Mỗi loại có một áp suất tương ứng thường được kiểm soát bằng thể tích qua màng lọc trong thời gian nhất định. Nếu áp suất quá cao vi sinh vật sẽ lọt qua lỗ lọc. Tùy theo cấu tạo của màng lọc, ta có nhiều loại lọc:

- Lọc Chamberland: lọc là một trụ bằng bột sứ
- Lọc Seitz: màng lọc bằng giấy lọc đặc biệt
- Lọc Pyrex: màng lọc bằng sợi thủy tinh

4. Khử trùng bằng bức xạ

- Tia tử ngoại (UV – Ultra violet) là bức xạ thường dùng nhất. Dùng tia UV diệt trùng không khí phòng bệnh viện, phòng thanh trùng. Tia UV chỉ khử trùng bề mặt.
- Tia âm cực: diệt trùng các dụng cụ giải phẫu, thuốc nhuộm, thực phẩm. Tia âm cực có thể khử trùng các vật đã cho vào bao gói kín.

II. NỘI DUNG THỰC HÀNH

Sinh viên thực tập làm nút bông, gói đĩa petri và hấp khử trùng.

1. Vật liệu

- Bình tam giác, ống nghiệm, hộp petri, ống hút
- Bông không thấm, giấy gói
- Nồi hấp áp lực

2. Thực hành

- Làm nút bông ống nghiệm, bình tam giác.
- Gói đĩa petri.
- Hấp khử trùng.

Bài 4 MÔI TRƯỜNG NUÔI CẤY VI SINH VẬT

I. GIỚI THIỆU

1. Khái niệm môi trường dinh dưỡng

- Các chất dinh dưỡng là những hợp chất tham gia vào quá trình trao đổi chất nội bào.
- Môi trường dinh dưỡng là hỗn hợp các chất dinh dưỡng và các chất này có nhiệm vụ duy trì thế oxy hóa khử, áp suất thẩm thấu của tế bào và sự ổn định của pH trong môi trường.

2. Yêu cầu của môi trường dinh dưỡng

Môi trường dinh dưỡng của vi sinh vật phải đạt các yêu cầu cơ bản như sau:

- Chứa đủ các chất dinh dưỡng cần thiết đối với hoạt động sống của vi sinh vật cụ thể.
- Đảm bảo đủ các điều kiện hóa, lý thích hợp cho sự trao đổi chất của VSV với môi trường.
- Môi trường chứa đầy đủ các nguyên tố hữu cơ và vô cơ cần thiết ở dạng có thể hấp thụ được, có pH thích hợp, không chứa các yếu tố độc hại và phải hoàn toàn vô trùng.

3. Phân loại môi trường

❖ Theo thành phần

- Môi trường tự nhiên: có thành phần là các sản phẩm tự nhiên như: trứng, sữa, khoai tây, dịch chiết nấm men, đường, cám. Thành phần hóa học của loại môi trường không được xác định chính xác do sự không ổn định của sản phẩm tự nhiên.
- Môi trường tổng hợp: chứa các chất hóa học mà thành phần của chúng được xác định và định lượng một cách cụ thể và chính xác.
- Môi trường bán tổng hợp: chứa cả các chất hóa học lẫn các sản phẩm tự nhiên.

❖ Theo tính chất lý học

- Môi trường lỏng: thành phần môi trường này không chứa agar và thường được sử dụng để nghiên cứu quá trình tổng hợp của vi sinh vật.
- Môi trường đặc: môi trường này chứa 1,5 – 2% agar hoặc 10 – 20% gelatin. Môi trường này được sử dụng để nghiên cứu các đặc điểm hình thái, sinh lý của vi sinh vật.
- Môi trường bán lỏng: chỉ chứa 0,3 – 0,7% agar.

❖ Theo công dụng

- Môi trường cơ bản: thích hợp cho nhiều loại vi sinh vật khác nhau.
- Môi trường chọn lọc: là môi trường đảm bảo cho sự phát triển ưu thế của một loài hay một nhóm loài vi sinh vật xác định nào đó.
- Môi trường kiểm định: là môi trường cho phép phân biệt được một số đặc điểm của một số loài vi khuẩn xác định. Thông thường, người ta cho vào môi trường chất chỉ thị màu để tạo ra những màu đặc trưng.

II. NỘI DUNG THỰC HÀNH

Sinh viên chuẩn bị một số môi trường để nuôi cấy vi sinh vật.

1. Vật liệu

- Bình tam giác 100 ml, ống nghiệm, phễu thủy tinh, ống hút 5 ml, 10 ml, ống đong 100 ml.
- Cân, lò viba, nồi hấp áp suất.
- Agar và các hóa chất cần thiết.

2. Thực hành

❖ Các bước pha môi trường dinh dưỡng

- Cân, đong thật chính xác các thành phần môi trường.
- Hòa tan vào nước cất.
- Cân agar rồi cho vào dung dịch trên (nếu là môi trường đặc)
- Làm trong môi trường (có thể bỏ qua bước này): lọc qua giấy lọc, vải thưa...
- Điều chỉnh pH của môi trường: dùng HCl 10% hoặc NaOH 10% để điều chỉnh pH.
- Đun tan agar (đối với môi trường đặc)
- Phân phối vào dụng cụ: môi trường thường được phân phối vào đĩa petri, ống nghiệm, bình tam giác.
- Đậy nút bông lại.
- Khử trùng môi trường.

Chú ý:

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

2/3 thể tích bình.

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

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

- Thạch nghiêng: tiến hành ngay sau khi khử trùng và môi trường chưa đông đặc.

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

+ Để yên cho đến khi môi trường đông đặc.

- Thạch đứng: đặt các ống nghiệm có môi trường vào giá, để yên cho môi trường đông đặc

- Đổ môi trường vào đĩa petri:

+ Mở bao giấy gói các đĩa petri

+ Một tay cầm dụng cụ chứa môi trường,

+ Tay còn lại mở nút bông và hơi miệng bình trên ngọn lửa đèn cồn.

+ Mở hé nắp đĩa petri, rót môi trường vào đĩa petri (khoảng 15 – 20 ml).

+ Đậy nắp đĩa lại, xoay tròn đĩa để môi trường được phân phối đều bên trong đĩa.

+ Để yên cho môi trường đông đặc.

+ Lật ngược đĩa lại và bảo quản.

3. Thành phần và cách pha một số môi trường thường dùng

a. Môi trường Hansen (nuôi cấy nấm men) (500ml gồm 100ml ống thạch nghiêng, 100ml ống lỏng, 300ml đổ đĩa)

Glucose	50 g	MgSO ₄	3 g
Pepton	10 g	Agar	20 g
KH ₂ PO ₄	3 g	Nước cất đủ	1000 ml

b. Môi trường cao thịt – pepton (nuôi cấy vi khuẩn)(tương tự Hansen)

Cao thịt	3 g	Pepton	10 g
NaCl	5 g	Agar	15 g
Nước cất đủ	1000 ml		

c. Môi trường nước pepton (nuôi cấy vi khuẩn)

Pepton	10 g
Nước mắm	20 ml
Nước cất đủ	1000 ml

d. Môi trường Crapek – dox (nuôi cấy nấm mốc)(400ml gồm ống nghiêng và đổ đĩa)

NaNO ₃	3,5 g	FeSO ₄	0,1 g
K ₂ HPO ₄	1,5 g	Đường kính	30 g
MgSO ₄	0,5 g	Agar	20 g

KCl	0,5 g	Nước cất đủ	1000 ml
-----	-------	-------------	---------

e. Môi trường Gausse (nuôi cấy xạ khuẩn)(400ml gồm ống nghiêng và đồ đĩa)

- | | | | |
|---------------------------------|------|-------------------|---------|
| Tinh bột tan | 20 g | FeSO ₄ | 0,01 g |
| K ₂ HPO ₄ | 3 g | NaCl | 0,5 g |
| MgSO ₄ | 3 g | Agar | 20 g |
| KNO ₃ | 1 g | Nước cất đủ | 1000 ml |
- Môi trường sử dụng là Plate Count Agar (PCA) có pH 7,0 ÷ 0,2. (500ml)

Casein enzymic hydrolysate	5g
Yeast extract	2.5 g
Dextrose	1g
Agar	15g
 - Dung dịch pha loãng (8,5g NaCl + 1g pepton + đủ 1000ml) (250ml)

Cách pha

- Cân, đo đúng chính xác lượng cần thiết các thành phần môi trường.
- Bổ sung lượng nước cho đủ theo công thức.
- Cho agar vào, đun sôi và khuấy đều cho đến khi agar vừa tan (nếu môi trường lỏng thì bỏ qua bước này).
- Phân phối vào dụng cụ chứa, đầy bằng nút bông.
- Khử trùng ở 1,2 atm / 30 phút.

f. Môi trường PGA (potato glucose agar) (nuôi cấy nấm mốc)

Khoai tây	200 g
Glucose	20 g
Agar	20 g
Nước cất đủ	1000ml

Cách pha

- Khoai tây được gọt vỏ, rửa sạch, cân đủ 200 g, cắt lát, nấu sôi để lấy nước chiết.
- Cho glucose vào và hòa tan hoàn toàn.
- Bổ sung lượng nước cho đủ theo công thức.
- Cho agar vào, đun sôi và khuấy đều cho đến khi agar vừa tan.
- Phân phối vào dụng cụ chứa, đầy bằng nút bông.
- Khử trùng ở 1,2 atm / 30 phút.

4. Các phương pháp khử trùng môi trường dinh dưỡng

a. Nguyên tắc: tiêu diệt toàn bộ vi sinh vật ngoại lai hiện diện trong môi trường, tạo điều kiện vô trùng cho môi trường để kết quả phân lập, nuôi cấy chính xác. Do đó, khi khử trùng môi trường phải đảm bảo một số điều kiện như sau:

- Không làm biến tính môi trường, không làm biến tính một số chất trong môi trường

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

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

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

- ❖ Đối với môi trường chứa các chất dễ biến tính (sữa, các loại đường)
 - Đối với môi trường chứa sữa: không được khử trùng trên 100°C vì ở nhiệt độ cao sữa dễ bị biến tính. Do đó, đối với loại môi trường này, ta tách ra làm 2 phần: sữa tiến hành thanh trùng Pasteur, còn các thành phần khác được khử trùng trong autoclave. Sau đó, hòa trộn 2 thành phần đó với nhau.
 - Đối với một số môi trường chứa một số chất dễ bị phân hủy ở nhiệt độ cao như urea thì nếu chúng ta tự pha chế thì chia ra 2 phần để khử trùng còn nếu môi trường tổng hợp thì ta khử trùng bằng cách sử dụng màng lọc có kích thước lỗ nhỏ (0,45 μm) để lọc khử trùng.
- ❖ Môi trường thông thường: tiến hành khử trùng bình thường với các điều kiện thời gian và nhiệt độ được khuyến cáo cho từng loại môi trường.

Bài 5 CÁC PHƯƠNG PHÁP CẤY VI SINH VẬT

I. GIỚI THIỆU

- Vi sinh vật cần được nuôi cấy để định danh, khảo sát đặc tính tăng trưởng và biến dưỡng của chúng. Các chủng vi sinh vật được cấy vào môi trường đặc trưng khác nhau. Thao tác cấy cần được thực hiện sao cho không đưa vi sinh vật khác hay vi sinh vật tạp nhiễm vào môi trường. Kỹ thuật thao tác vô trùng được sử dụng trong nuôi cấy vi sinh để loại trừ các vi sinh vật gây nhiễm. Môi trường, dụng cụ chứa môi trường, dụng cụ nuôi cấy hoặc các dụng cụ cần thiết khác cần được khử trùng và được giữ ở trạng thái vô trùng trước khi sử dụng.

- Các thao tác vô trùng được thực hiện trong một không gian vô trùng xung quanh ngọn lửa (đèn cồn hoặc đèn bunsen). Ngoài ra ngọn lửa được dùng để đốt khử trùng que cấy, miệng chai lọ, ống nghiệm khi mở nắp hay nút bông.

- Để đảm bảo tính vô trùng cao, thao tác cấy thường được thực hiện trong tủ cấy vô trùng. Không khí trong tủ cấy vô trùng sẽ được khử trùng bằng tia tử ngoại (đèn UV) và màng lọc. Trước khi sử dụng tủ, cần bật đèn UV trước 30 – 60 phút và bật quạt thông gió khi tiến hành thao tác.

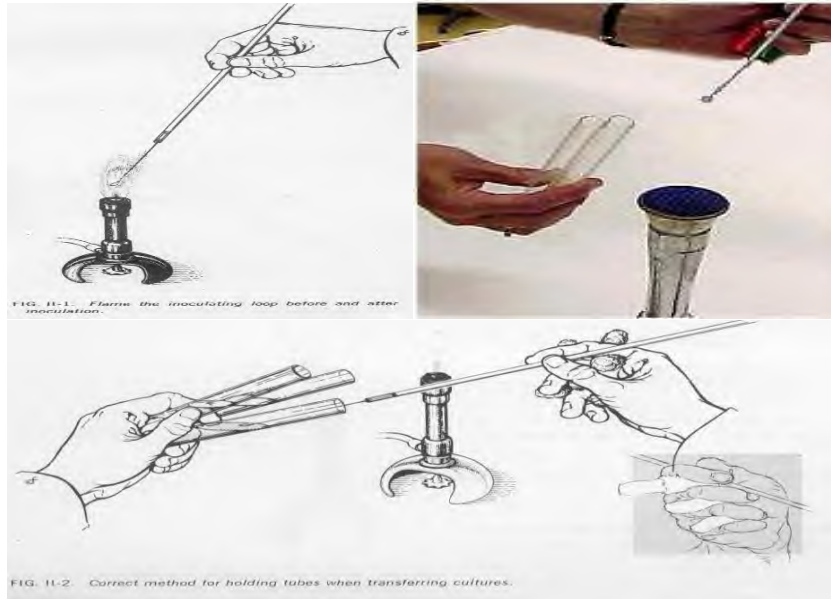
- Để tránh việc gây nhiễm thông qua tiếp xúc, người thao tác cần mang găng tay hoặc sát trùng tay trước khi bắt đầu thao tác. Cần sát trùng mặt bên trong tủ cấy và bề mặt tủ bằng cách lau với cồn 70° hoặc các dung dịch diệt khuẩn khác trước khi thao tác.

- Các dụng cụ thường dùng để cấy vi sinh:

- Kim cấy: que cấy kim loại có đầu nhọn, thường dùng để cấy chủng ở dạng khuẩn lạc từ môi trường rắn lên môi trường rắn hoặc lỏng.
- Que cấy móc: que cấy có đầu vuông góc, thường dùng để cấy vi sinh vật có tạo hệ khuẩn ty.
- Que cấy vòng: que cấy kim loại đầu có vòng tròn, thường dùng để cấy chủng từ môi trường rắn hoặc lỏng lên môi trường rắn, lỏng.
- Ống hút thủy tinh: dùng để chuyển một dung tích nhất định giống lên bề mặt môi trường rắn hoặc vào môi trường lỏng. Hiện nay, pipetman với đầu tip vô trùng được sử dụng thay thế cho ống hút.
- Cũng có thể dùng đầu tăm bông vô trùng cấy giống từ môi trường lỏng lên bề mặt môi trường rắn.

- Vi sinh vật sẵn sàng cho nuôi cấy thường ở một trong các dạng sau:

- Dịch nuôi cấy hoặc canh trường lỏng (broth culture) có chứa một số lượng lớn chủng vi sinh vật quan tâm.
- Dạng trên bề mặt môi trường rắn chứa agar (1,5 – 2%) trong ống thạch nghiêng (agar slant) hay trong đĩa petri.
- Dạng nằm sâu trong môi trường rắn trong ống thạch sâu (deep agar) chứa agar mềm (0,5 – 0,7%).



Hình 5.1 Một số thao tác cơ bản khi sử dụng que cấy

II. NỘI DUNG THỰC HÀNH

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

1. Vật liệu

- Que cấy vòng, que cấy móc, kim cấy
- Pipetman và đầu tip 0,2 ml, 1 ml vô trùng
- Đèn cồn
- Ống môi trường, ống giống

2. Thực hành

Trước khi cấy cần ghi chú cẩn thận lên thành dụng cụ sẽ chứa vi sinh (ống nghiệm, đĩa petri, bình nuôi cấy) tên giống vi sinh vật và ngày cấy.

a. Khử trùng que cấy

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

b. Cấy giống từ môi trường lỏng sang ống nghiệm chứa môi trường lỏng

* Dùng que cấy

- Ống nghiệm vi sinh vật được cầm ở tay trái, tay phải cầm que cấy. Ngón út của tay phải dùng để mở nút bông. Sau khi khử trùng que, mở nút bông, hơi nóng miệng ống nghiệm.
- Đưa ngay que cấy đã khử trùng vào trong và làm nguội que cấy.
- Thu sinh khối bằng cách nhúng que cấy vào môi trường lỏng, rút thẳng que cấy ra không để dính vào thành miệng ống nghiệm.
- Hơ miệng ống nghiệm, đẩy nút bông lại.
- Đặt ống nghiệm vào giá.
- Đầu que cấy chứa vi sinh vật được giữ gần ngọn đèn
- Dùng tay trái lấy ống môi trường mới, mở nút bông, khử trùng miệng ống nghiệm.
- Đưa que cấy chứa vi sinh vật vào ống môi trường, khuấy mạnh để sinh khối tách khỏi đầu que cấy.
- Hơ miệng ống nghiệm, đẩy nút bông lại.
- Khử trùng que cấy ngay sau khi sử dụng xong và để lại chỗ cũ.

** Dùng pipetman*

- Tay trái cầm ống giống vi sinh vật, tay phải cầm pipetman với đầu tip vô trùng đã chỉnh trước thể tích cần hút, ngón út tay phải mở nút bông, hút sinh khối rồi chuyển qua ống môi trường.
- Đầu tip được bỏ vào túi đựng rác (được hấp trước khi thải bỏ).

Lưu ý khi sử dụng pipetman

- Không đưa pipetman và đầu tip vào ngọn lửa.
- Không dùng với dung tích ngoài khoảng giới hạn dung tích cho phép (được ghi rõ trên pipetman)
- Thao tác từ tốn, nhẹ nhàng khi điều chỉnh dung tích.
- Khi hút dịch lỏng, cần thả đầu ngón tay cái từ từ để dịch lỏng không văng lên gây hư hỏng pipetman hoặc gây nhiễm.

c. Cấy giống từ ống thạch nghiêng (môi trường rắn) sang môi trường lỏng

Tiến hành tương tự như trường hợp b với một số khác biệt sau:

- Thu sinh khối từ ống giống: chấm nhẹ đầu que cấy lên khuẩn lạc trên bề mặt môi trường.
- Chuyển giống vào môi trường lỏng: khuấy mạnh đầu que cấy trong môi trường lỏng để tách sinh khối ra khỏi đầu que cấy.

d. Cấy giống từ môi trường lỏng lên bề mặt ống thạch nghiêng

- Thu sinh khối như trường hợp b
- Cấy giống lên bề mặt ống thạch nghiêng bằng cách đặt nhẹ đầu que cấy lên bề mặt môi trường ở đáy ống, dàn đều sinh khối. Tiếp theo cấy theo hình sin từ đáy ống nghiệm lên đến đầu trên của mặt thạch nghiêng.

Bài 6 KỸ THUẬT TẠO KHUẨN LẠC ĐƠN

I. GIỚI THIỆU

- Vi sinh vật trong tự nhiên ở dạng quần xã gồm nhiều quần thể. Việc nghiên cứu một quần thể vi sinh vật nhất định phụ thuộc nhiều vào khả năng phân lập, làm thuần quần thể, khả năng giữ giống dùng cho các thí nghiệm tiếp theo. Đa số các nghiên cứu về vi sinh vật đều được thực hiện trên chủng thuần. Hầu hết các phương pháp tạo chủng thuần đều dựa trên kỹ thuật pha loãng kết hợp với điều kiện nuôi cấy chọn lọc tạo ưu thế tăng trưởng cho chủng quan tâm. Một số phương pháp tạo khuẩn lạc đơn như sau:

- Phương pháp cấy rìa (streak plate): đây là phương pháp hữu hiệu và dễ thực hiện. Hỗn hợp vi sinh vật được trải và rìa trên môi trường sao cho các tế bào riêng lẻ tách nhau ra. Sau thời gian ủ, mỗi tế bào sẽ tăng trưởng thành khuẩn lạc đơn riêng biệt. Khuẩn lạc đơn này chính là chủng thuần do có nguồn gốc từ một tế bào ban đầu.

- Phương pháp hộp trải (spread plate) hoặc hộp đổ (pour plate): là phương pháp pha loãng liên tiếp bậc 10 dịch chứa vi sinh vật thành các mức pha loãng khác nhau. Chuyển 0,1 ml dịch được pha loãng ở các mức lên môi trường rắn chuẩn bị sẵn (hộp trải) hoặc 1 ml dịch tương ứng vào môi trường rắn đun chảy (hộp đổ). Mỗi tế bào riêng biệt sẽ tăng trưởng thành khuẩn lạc đơn.

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

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

- **Lưu ý:** Hạn chế thấp nhất nguy cơ bị nhiễm bằng cách thực hiện nghiêm túc các yêu cầu của thao tác vô trùng.

II. NỘI DUNG THỰC HÀNH

Sinh viên thực hành tạo khuẩn lạc đơn bằng hộp rìa (kỹ thuật rìa chữ T và rìa bốn góc) và hộp trải.

1. Vật liệu

- Que cấy vòng, thanh gạt thủy tinh, đĩa petri môi trường thạch nước pepton.
- Đèn cồn, cốc thủy tinh chứa cồn
- Pipetman và đầu tip 0,2 ml vô trùng
- Ống giống *E. coli*
- Các ống nghiệm chứa chính xác 9ml nước muối sinh lý.
- Petri, ống nghiệm, bình tam giác 250ml, ống đông, đèn cồn, que cấy tam giác.
- Pipetman và đầu tip 1ml vô trùng.
- Môi trường: PCA (Pepton plate count agar).

- Dung dịch pha loãng (8,5g NaCl + 1g pepton + đủ 1000ml)

2. Thực hành

2.1. Kỹ thuật cấy ria

- Dùng que cấy vòng thao tác vô trùng thu giống (xem bài 5)
- Ria các đường trên hộp petri như hình vẽ (ria chữ T và ria bốn góc). Sau mỗi đường ria, đốt khử trùng đầu que cấy và làm nguội trước khi thực hiện đường ria tiếp theo.
- Gói đĩa petri, ủ ở 37°C trong tủ ẩm 2 ngày.

2.2. Kỹ thuật cấy trải

- Dùng pipetman và đầu tip vô trùng, thao tác vô trùng (xem bài 5) chuyển 0,1 ml dịch chứa hỗn hợp vi sinh lên bề mặt môi trường trong đĩa petri.
- Dùng thanh gạt thủy tinh, thao tác vô trùng, trải đều vi sinh vật lên bề mặt môi trường.
- Gói hộp petri, ủ ở 37°C trong tủ ẩm 2 ngày.

2.3. Kỹ thuật pha loãng

a. Thu mẫu

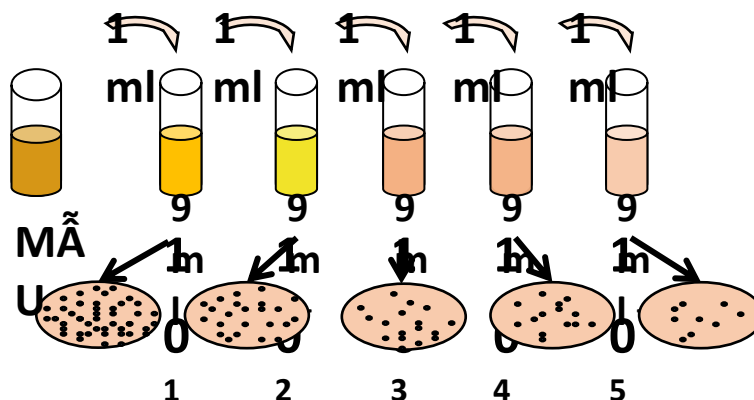
Khi tiến hành thu mẫu, cần lưu ý bảo đảm các yêu cầu sau:

- Lấy mẫu có tính chất đại diện.
- Mẫu phân tích vi sinh phải được lấy trước khi mẫu phân tích các chỉ tiêu hóa lý.
- Dụng cụ lấy mẫu và chứa mẫu phải vô trùng.
- Mẫu lấy xong phải phân tích ngay, không để quá 24 giờ.
- Mỗi mẫu phải được ghi nhãn ký hiệu và ghi rõ đặc điểm của mẫu và nơi thu mẫu.

b. Pha loãng mẫu

- Nếu mẫu nghiên cứu là chất lỏng: pha 1ml mẫu với 9 ml dung dịch pha loãng để được nồng độ 10^{-1} . Tiếp tục pha 1 ml dung dịch nồng độ 10^{-1} vừa thu được với 9 ml dung dịch pha loãng sẽ được nồng độ 10^{-2} . Tiếp tục tiến hành như vậy để được các nồng độ 10^3 , 10^{-4} ... như mong muốn.

- Nếu mẫu nghiên cứu là chất đặc (như đất, lương thực, thực phẩm): chuẩn bị 2 bình nón dung tích 250 ml. Bình 1 chứa 99 ml dung dịch pha loãng. Bình 2 cũng vô trùng nhưng không chứa gì. Cân 1 g mẫu cho vào cối sứ vô trùng (khử trùng bằng cách đốt một ít cồn, để nguội), thêm một ít nước lấy ở bình 1, nghiền mẫu cho nát. Sau đó dùng nước ở bình 1 để chuyển toàn bộ mẫu đã nghiền nát sang bình 2, lắc đều 5 phút, để lắng 30 giây rồi tiếp tục pha loãng như trên.



Hình 8.1 Pha loãng mẫu

c. Cấy mẫu

❖ Phương pháp cấy trải

- Dùng pipette hút 0,1 ml dịch pha loãng ở 3 nồng độ liên tiếp tùy chọn cho vào 3 đĩa môi trường PCA đã chuẩn bị sẵn.
- Khử trùng que gạt thủy tinh trên ngọn lửa đèn cồn, để nguội.
- Trải đều dịch mẫu trên môi trường thạch bằng que gạt thủy tinh.
- Lật ngược đĩa, ủ ở 37°C trong 24 – 48 giờ.
- Ghi nhận sự hiện diện của vi sinh vật và đếm số khuẩn lạc hình thành.

Copyright © The McGraw-Hill Companies, Inc. Permission required for reproduction or display.



Hình 8.2 Phương pháp cấy trải

❖ Phương pháp đổ đĩa

- Môi trường PCA được giữ ở 45±1°C
- Cấy 1 ml dịch pha loãng ở 3 nồng độ liên tiếp vào 3 đĩa petri trống vô trùng.
- Đổ 15 ml môi trường PCA vào đĩa. Xoay ngược và xuôi chiều kim đồng hồ 5 lần.
- Đặt đĩa ở mặt phẳng ngang để môi trường đông đặc.
- Lật ngược đĩa, ủ ở nhiệt độ 37°C trong 48h.

- Ghi nhận sự hiện diện của vi sinh vật và đếm số khuẩn lạc hình thành.



Hình 8.3 Phương pháp đổ

3. Báo cáo kết quả

Báo cáo kết quả phân lập khuẩn lạc đơn theo các kỹ thuật khác nhau.

III. CÂU HỎI

1. So sánh sự phân bố của vi sinh vật ở 2 phương pháp cấy trang và đổ đĩa.
2. Ưu và khuyết điểm của hai phương pháp đổ đĩa và cấy trải.
3. Tại sao dùng dd có chứa NaCl để pha loãng mẫu? Có dùng nước cất pha loãng mẫu được không?
4. Thiết kế dãy pha loãng mẫu để đạt 3 độ pha loãng 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8}

Bài 7 PHƯƠNG PHÁP QUAN SÁT VI SINH VẬT

I. GIỚI THIỆU

1. Quan sát

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

- Kính hiển vi là công cụ quan trọng trong nghiên cứu hình thái và nhận diện vi sinh vật. Kính hiển vi được thiết kế để có tính năng khác nhau nhằm đáp ứng yêu cầu cho phép phóng đại và quan sát rõ, chân thật các đối tượng vi sinh vật, nội bào quan khác nhau. Một số kính hiển vi thường gặp là:

- Kính hiển vi soi nổi
- Kính hiển vi quang học
- Kính hiển vi đối pha
- Kính hiển vi huỳnh quang

2. Các phương pháp nhuộm

Khi quan sát mẫu vật qua kính hiển vi quang học, phần lớn cơ cấu bên trong của vi sinh vật có chiết suất gần bằng nhau cho nên rất khó phân biệt được, vì vậy cần phải làm tiêu bản và nhuộm màu. Nhuộm màu vi sinh vật nhằm:

- + 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.
 - + Để dễ phân biệt và quan sát được các vi cấu tạo trong tế bào vi sinh vật.
 - + Để bảo tồn tiêu bản trong một thời gian dài, để chụp ảnh.
- Các kỹ thuật nhuộm đơn giản bao gồm:

+ Nhuộm đơn (Simple stain): là phương pháp nhuộm màu chỉ sử dụng một loại thuốc nhuộm, các loại thuốc nhuộm thường dùng là methylene blue, crystal violet, fuchsin, với nấm thường dùng dung dịch Lactophenol cotton blue (nấm bắt màu xanh). Bao gồm các loại sau: nhuộm base (Basic dyes), nhuộm acid (Acidic dyes), nhuộm trung tính (indifferent dyes)

+ Nhuộm phân biệt: nhuộm Gram, nhuộm acid-fast

+ Nhuộm cấu trúc: nhuộm Feulgen, nhuộm bào tử, nhuộm vách tế bào, nhuộm Capsule, nhuộm Flagella

- Trong đó, Nhuộm Gram là một trong những phương pháp nhuộm quan trọng nhất để phân loại vi khuẩn. Nó cho phép ta phân biệt hai nhóm vi khuẩn tùy theo phản ứng với thuốc nhuộm.

Khi nhuộm vi khuẩn với thuốc nhuộm tím crystal violet và một chất gắn màu iodine (dung dịch lugol), sau khi tẩy màu (decolorization) bằng cồn 95%, có hai trường hợp xảy ra:

+ Nếu vi khuẩn giữ chặt màu tím, đó là các vi khuẩn G⁺.

+ Nếu vi khuẩn bị mất màu sau khi tẩy cồn, khi nhuộm bổ sung với dung dịch safranin, vi khuẩn sẽ có màu hồng, đó là vi khuẩn G⁻.

II. NỘI DUNG THỰC HÀNH

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

1. Vật liệu

- Phẩm nhuộm xanh methylen hay fuchsin (1‰)

- Dầu soi kính (cèdre), dung dịch lau kính xylol, cồn, phiến kính (lampe), lá kính (lamelle), gòn thấm, que cấy, đèn cồn, nước cất vô trùng.

- Hóa chất nhuộm Gram: Dung dịch Tím kết tinh (Crystal violet), dung dịch Iod (lugol), dung dịch tẩy màu (Etanol 95%), dung dịch nhuộm bổ sung Safranin.

- Kính hiển vi quang học

- Giống vi sinh vật: *Staphylococcus aureus*, *E. coli*, *Bacillus* sp., *Aspergillus*, *Penicillium*, ...

2. Thực hành

2.1. Quan sát nấm, vi khuẩn ở trạng thái sống

a. Quan sát khuẩn ty và cuống sinh bào tử của nấm mốc

- Cho 1 giọt nước lên giữa phiến kính sạch (lau bằng vải mềm và hơi qua ngọn lửa đèn cồn trước khi dùng).

- Dùng que cấy móc lấy một mẫu nấm điển hình để vào trong dịch thấm ướt.

- Dùng kim dìm nấm vào trong giọt nước.

- Khi nấm bị thấm ướt hoàn toàn ta đẩy lá kính lên trên (tránh tạo bọt khí vì nếu không sẽ rất khó quan sát). Phương pháp này dễ làm gãy các cuống sinh bào tử (khuẩn ty sinh dục) của nấm

- Thực hành: Quan sát khuẩn ty và cuống sinh bào tử của *Aspergillus* ở vật kính X10 và vật kính X 40

b. Quan sát nấm men và vi khuẩn bằng phương pháp làm giọt ép

- Dùng que cấy vòng lấy 1 giọt dịch vi khuẩn hoặc nấm men cho vào giữa phiến kính.

- Đẩy lá kính lên trên, tránh tạo bọt khí.

- Quan sát dưới kính hiển vi ở vật kính X10 và X40.

- Thực hành: quan sát vi khuẩn *E. coli* và nấm men *Sacharomyces cerevisiae*

2.2. Quan sát vi khuẩn ở trạng thái nhuộm

a. Phương pháp làm vết bôi (cố định tiêu bản)

- Đặt một giọt nước vô trùng lên phiến kính. Dùng que cấy lấy một ít vi khuẩn từ khuẩn lạc trên môi trường hòa đều vào giọt nước và trải mỏng trên mặt lam, để khô (không dùng giọt nước nếu lấy mẫu từ canh khuẩn).

- Cố định mẫu: Hơ nhẹ phía dưới phiến kính qua ngọn lửa đèn cồn 3 đến 4 lần hoặc nhỏ giọt cồn ngay vết trải và đốt. Mục đích là giết chết tế bào sống và gắn chặt tế bào vào phiến kính khi rửa không bị trôi và giúp tế bào dễ bắt màu hơn.

b. Phương pháp nhuộm đơn

- Chuẩn bị vết bôi

- Nhuộm màu: Nhỏ vài giọt thuốc nhuộm đơn (xanh metilen 0,1% hay Fuchsin Ziehl). Rửa nước và làm khô trong không khí, sau đó quan sát ở vật kính X100 với giọt dầu soi kính.

- Thực hành: nhận dạng hình thái của các vi khuẩn thường gặp: *Staphylococcus*, *Bacillus*, *E. coli*,

c. Phương pháp nhuộm Gram (phương pháp Hucker cải tiến)

- Chuẩn bị vết bôi

- Nhuộm bằng dung dịch Tím kết tinh trong 1 phút, rửa nước, thấm khô.

- Nhuộm lại bằng dung dịch Iod trong 1 phút, rửa nước, thấm khô.

- Tẩy còn khoảng 30 giây (cho đến khi vừa thấy mất màu), rửa nước, thấm khô.

- Nhuộm bổ sung bằng dung dịch Safranin 2-3 phút, rửa nước, để khô trong không khí.

- Quan sát dưới kính hiển vi ở vật kính dầu 100X.

Kết quả: Vi khuẩn Gram (+) bắt màu tím dung dịch tím kết tinh: *Staphylococcus aureus*

Vi khuẩn Gram (-) bắt màu đỏ của Safranin: *E. coli*

Lưu ý:

- Giai đoạn tẩy màu rất quan trọng. Tẩy màu đúng, các loại tế bào kể cả nhân giữ màu đỏ safranin.

- Gram (+) có thể thành Gram (-):
 - + Do sự tự hủy, tăng tính acid của môi trường, nhiệt độ cấy không thích hợp, sự hiện diện của một số độc chất. Do đó muốn được chính xác phải nhuộm Gram với lứa cấy từ 18 – 24 giờ.
 - + Khi dung dịch Iodine đã hỏng. Vì vậy phải giữ dung dịch Iodine trong chai nâu, tránh ánh sáng và loại bỏ khi dung dịch từ màu nâu sậm chuyển sang vàng nhạt hay không màu.
 - + Tẩy màu quá lâu.
- Gram (-) có thể thành Gram (+):
 - + Nếu vết bôi được cố định khi chưa khô.
 - + Vết bôi quá dày, vi khuẩn phân tán không đều, tập trung quá nhiều ở một chỗ và có thể giữ màu tím khi tẩy.
 - + Thời gian tẩy màu quá ít.

III. CÂU HỎI

1. Tại sao phải cố định tiêu bản?
2. Giải thích cơ chế nhuộm Gram
3. Tại sao phải dùng giọt dầu khi quan sát ở vật kính X100?

Bài 8 PHƯƠNG PHÁP ĐỊNH LƯỢNG VI SINH VẬT

I. GIỚI THIỆU

Sự hiện diện của vi sinh vật có thể định lượng bằng nhiều phương pháp khác nhau như: đếm số lượng tế bào trực tiếp trên kính hiển vi, định lượng gián tiếp thông qua mức độ cản ánh sáng (độ đục), đếm số khuẩn lạc mọc trên một môi trường xác định, định lượng một cách thống kê bằng phương pháp pha loãng tới hạn (phương pháp MPN, most probable number), định lượng dựa trên sinh khối tích lũy,...

Phương pháp đếm trực tiếp: các sinh vật đơn bào kích thước tương đối lớn như nấm men, tảo, nguyên sinh động vật, có thể dùng phương pháp đếm trực tiếp bằng buồng đếm hồng cầu để định lượng vi sinh vật. Trường hợp vi sinh vật có kích thước nhỏ như vi khuẩn, khó quan sát và đếm bằng kính hiển vi thì các phương pháp như đếm khuẩn lạc hoặc nuôi cấy trong môi trường lỏng bằng phương pháp MPN được sử dụng. Tuy nhiên các phương pháp đếm khuẩn lạc, phương pháp MPN cũng thích hợp cho các vi sinh vật có kích thước lớn.

Phương pháp đếm khuẩn lạc: phương pháp này cho phép định lượng các tế bào vi sinh vật sống hiện diện trong mẫu. Phương pháp này có đặc điểm là cho phép định lượng chọn lọc vi sinh vật tùy môi trường và điều kiện nuôi cấy.

Phương pháp đo độ đục: khi một pha lỏng có chứa nhiều phần tử không tan (không phải là phân tử tan), thì sẽ tạo thành một hệ huyền phù (suspension: rắn – lỏng, không phải là dung dịch: chất tan – lỏng) và có độ đục bởi các phần tử hiện diện trong môi trường lỏng cản ánh sáng, làm phân tán chùm ánh sáng tới. Tế bào vi sinh vật là một thực thể nên khi hiện diện trong môi trường cũng làm môi trường trở nên đục. Độ đục của huyền phù tỷ lệ với một độ tế bào. Trong một giới hạn nhất định của độ đục và mật độ tế bào, có thể xác lập được quan hệ tỷ lệ tuyến tính giữa mật độ tế bào và độ đục. Do vậy có thể định lượng mật độ tế bào một cách gián tiếp thông qua đo độ đục bằng máy so màu ở bước sóng từ 550 – 610 nm. Trong trường hợp này, trước tiên cần phải thiết lập đường quan hệ tuyến tính giữa độ đục và mật độ bằng cách sử dụng một số huyền phù tế bào có độ đục xác định và mật độ tế bào của mỗi huyền phù được xác định bằng một phương pháp trực tiếp khác, ví dụ như phương pháp đếm khuẩn lạc, phương pháp buồng đếm, ...

Phương pháp pha loãng tới hạn (MPN): còn được gọi là phương pháp pha loãng tới hạn hay phương pháp chuẩn độ. Đây là phương pháp dùng để đánh giá số lượng vi sinh vật theo xác suất lớn nhất có thể có trong một đơn vị thể tích mẫu với độ chính xác tương đối cao. Phương pháp MPN thường được thực hiện trên mẫu ở vài nồng độ pha loãng khác nhau, trong đó phương pháp 3 nồng độ thường được dùng phổ biến nhất.

Phương pháp xác định sinh khối vi sinh vật: mức độ hiện diện của vi sinh vật có thể được định lượng bằng sinh khối tích lũy của vi sinh vật. Phương pháp này mang tính ước lượng, có độ chính xác không cao.

II. NỘI DUNG THỰC HÀNH

Sinh viên thực hành định lượng vi khuẩn bằng phương pháp đếm khuẩn lạc trên môi trường thạch đĩa và đếm số lượng nấm men bằng buồng đếm hồng cầu.

1. Vật liệu

- Buồng đếm hồng cầu, lamel.
- Sinh khối nấm men 24 giờ sau nuôi cấy.
- Các ống nghiệm chứa chính xác 9 ml nước muối sinh lý.
- Pipette

2. Thực hành

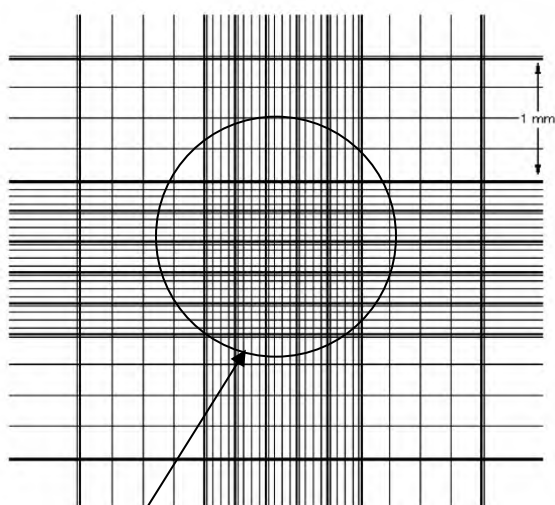
- Phương pháp đếm số lượng vi sinh vật nhằm đánh giá số lượng vi sinh vật trong một thể tích hay một trọng lượng mẫu xác định.

- Hiện nay, có 3 phương pháp đếm số lượng vi sinh vật thường được sử dụng:
 - + Đếm trực tiếp bằng phòng đếm hồng cầu (dùng để đếm tế bào nấm men).
 - + Đếm gián tiếp số lượng vi sinh vật bằng cách đếm số khuẩn lạc mọc trên môi trường đặc.
 - + Phương pháp pha loãng tới hạn (với chỉ số MPN).
- Cả 3 phương pháp trên đều trải qua 2 bước cơ bản sau:
 - + Thu mẫu
 - + Pha loãng mẫu: Mẫu sau khi lấy về cần được pha loãng đến mức độ có thể tiến hành đếm được. Tùy theo số lượng vi sinh vật trong mẫu (ước đoán) mà pha loãng nhiều hay ít.

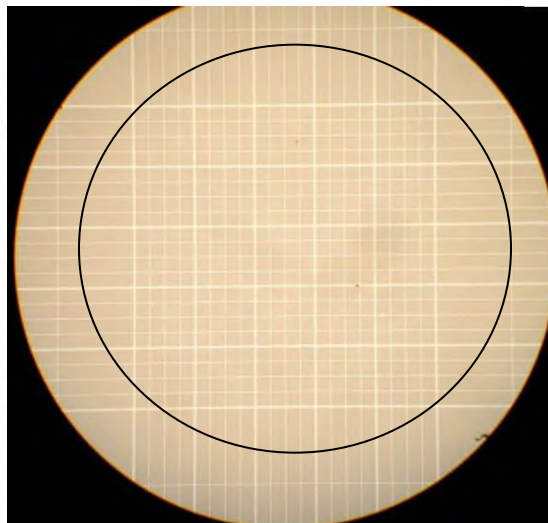
Phương pháp pha loãng đã được trình bày trong bài trước.

2.1. Đếm trực tiếp bằng phòng đếm hồng cầu

Phòng đếm hồng cầu ngoài việc dùng để đếm các tế bào máu, còn dùng để đếm tế bào vi sinh vật có kích thước lớn (nấm men, bào tử nấm mốc).



25 ô vuông lớn (X10)



16 ô vuông nhỏ (X40)

Hình 8.4 Buồng đếm hồng cầu quan sát dưới kính hiển vi.

Người ta thường dùng 2 loại phòng đếm hồng cầu: phòng đếm Thomas và phòng đếm Goriep. Nguyên tắc cấu tạo của 2 loại phòng đếm này đều giống nhau. Đó là một phiến kính dày hình chữ nhật, chia thành 3 khoảng ngang. Khoảng giữa chia thành 2 khoảng nhỏ. Trên mỗi khoảng nhỏ này có kẻ 1 lưới đếm, gồm rất nhiều ô vuông. Mỗi ô lớn lại được chia thành các ô vuông nhỏ thường là 16 ô (có loại kính có 20 ô con) và chiều cao là 1/10 mm. Như vậy thể tích một ô nhỏ là 1/4000 mm³ (hay 1/5000 mm³). Phòng đếm có lá kính dày để đáy.

❖ Các bước thực hiện

- Lắc đều ống nghiệm chứa mẫu đã được pha loãng mẫu.
- Đậy lá kính lên lưới đếm.
- Dùng ống hút vô trùng lấy mẫu, cho 1 giọt vào mép lá kính, do sức mao dẫn dịch tự dàn vào mặt trên lưới đếm. Chú ý: không để thành bọt khí trong lưới đếm hoặc tràn dịch mẫu xuống rãnh quá nhiều.

- Đặt phòng đếm lên bàn kính hiển vi và để yên trong 3-5 phút, sau đó tiến hành đếm tế bào trong 5 ô lớn chéo nhau. Trong mỗi ô lớn, đếm lần lượt từ ô con thứ nhất đến ô con thứ 16. Chỉ **đếm các tế bào nằm bên trong ô con và những tế bào nằm trên 2 cạnh liên tiếp cùng chiều**. Ghi số lượng tế bào đếm được trong 5 ô lớn (80 ô con).

- Dùng xong, phòng đếm và lá kính phải rửa ngay và lau khô.
- Số lượng tế bào trong 1 ml mẫu nghiên cứu được tính bằng công thức:

$$\text{Số tế bào/ml} = a * 4.000 * 10^{(3)} * 10^{(-n)} / b$$

Trong đó:

a: Số tế bào trong 5 ô lớn (80 ô con)

b: Số ô con trong 5 ô lớn (16 ô x 5 = 80 ô con)

10⁽³⁾: Số chuyển mm³ thành ml

10⁽⁻ⁿ⁾: Độ pha loãng mẫu

Lưu ý: số tế bào đếm được trong 5 ô lớn phải trên 200 mới bảo đảm được mức độ chính xác của phương pháp.

2.2. Phương pháp gián tiếp đếm số khuẩn lạc trên môi trường đặc

Nguyên tắc của phương pháp này là cấy 1 thể tích xác định huyền phù cần nghiên cứu lên môi trường đặc trong đĩa petri và sau đó đếm số khuẩn lạc mọc lên sau khi ủ. Khi đó ta coi mỗi khuẩn lạc là kết quả của sự phát triển từ 1 tế bào.

❖ Các bước thực hiện

- Pha loãng mẫu đến độ pha loãng thích hợp.
- Cấy bằng phương pháp cấy trải hoặc đổ đĩa.
- Ủ ở điều kiện thích hợp trong thời gian xác định.
- Sau khi hình thành khuẩn lạc, tiến hành đếm. Lấy bút viết kính kẻ hai đường kính giao nhau ở đáy đĩa petri. Đếm số khuẩn lạc trong từng vùng và nhớ chấm mực đánh dấu các khuẩn lạc đã đếm. Việc pha loãng được coi là tốt nhất khi từ dịch pha loãng này cấy vào môi trường đặc làm mọc lên 25 – 250 khuẩn lạc.

- Số lượng vi sinh vật trong 1g hoặc 1ml dịch mẫu được tính bằng công thức:

$$\text{Số tế bào / g} = M * a * 10^{(-n)}$$

Trong đó: M : Số khuẩn lạc trung bình trong 1 petri

A : Thể tích mẫu được cấy vào hộp petri

$10^{(-n)}$: Độ pha loãng

- Khi số lượng khuẩn lạc lớn, người ta có thể dùng máy đếm khuẩn lạc bán tự động. Người ta đặt đĩa thạch sấp đáy trên bàn của máy đếm có chiếu sáng từ dưới lên. Đếm các khuẩn lạc bằng 1 chiếc bút đặc biệt có thiết bị lò xo. Ấn đầu nhọn của ngòi bút lên chỗ tương ứng với từng khuẩn lạc, kết quả trên mặt đĩa petri sẽ có một dấu vết, đồng thời mạch điện được đóng lại và chỉ số của máy đếm tăng thêm 1 đơn vị. Sau đó đầu nhọn của mặt bút được nâng lên khỏi đĩa, lò xo kéo nó lại vị trí xuất phát và mạch điện bị ngắt.

2.3. Phương pháp pha loãng tới hạn (với chỉ số MPN)

- Nguyên tắc của phương pháp là pha loãng thật nhiều lần dịch có chứa vi sinh vật. Sau đó kiểm tra xem tới độ pha loãng nào còn phát hiện thấy sự có mặt của vi sinh vật cần kiểm tra. Dùng phương pháp thống kê toán học để tính ra số lượng gần đúng của từng nhóm vi sinh vật nhất định trong mẫu nghiên cứu. Phương pháp này được dùng để kiểm tra độ nhiễm bẩn của nước, thực phẩm,...

- Số lượng gần đúng của vi sinh vật là chỉ số MPN (Most probable number) được tra trong bảng Mac Crady (bảng do Mac Crady xây dựng trên cơ sở xử lý xác suất thống kê một khối lượng lớn các kết quả thử nghiệm).

Các bước thực hiện

- Pha loãng mẫu: tùy tình trạng của mẫu mà ta sử dụng các độ pha loãng khác nhau, từ nồng độ nguyên chất, 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} hay từ nồng độ 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} . Phải chọn giới hạn thế nào để nồng độ thấp nhất luôn luôn có mặt vi sinh vật, còn nồng độ cao nhất thì hoàn toàn không phát hiện thấy vi sinh vật. Cách pha loãng từ dịch huyền phù ban đầu được chuẩn bị giống hệt như đối với phương pháp thạch đĩa

- Cấy vào môi trường lỏng: từ mỗi độ pha loãng, có thể cấy vào từ 2, 3, 4 hay 5 ống nghiệm chứa môi trường dinh dưỡng thích hợp cho vi sinh vật cần kiểm tra phát triển (ví dụ cần kiểm tra vi khuẩn *E. coli* trong nước thì dùng môi trường có dùng lactose và chỉ thị màu, ống Durham để dễ phát hiện thấy vi sinh vật phát triển, thường dùng môi trường BGBL 2%). Ủ ở nhiệt độ thích hợp.

- Sau thời gian ủ, ở mỗi độ pha loãng ghi số ống nghiệm (+) (nghĩa là có vi khuẩn mọc bằng cách theo dõi sự chuyển màu của môi trường và có bọt khí trong ống Durham). Ghi nhận nồng độ pha loãng cao nhất không thấy vi khuẩn mọc.

- Tìm chỉ số ống nghiệm có phản ứng (+). Chỉ số này gồm 3 chữ số:

+ Chữ số cuối cùng (hàng đơn vị): ghi số lượng ống nghiệm có phản ứng dương tính ở độ pha loãng cao nhất, mà ở nồng độ pha loãng cao hơn kế tiếp sẽ không có ống nghiệm nào dương tính cả (không có vi khuẩn mọc được).

+ Hai chữ số tiếp theo: ghi số ống (+) ở 2 nồng độ pha loãng thấp kế tiếp.

- Từ chỉ số trên, tính được số lượng tế bào vi sinh vật có xác suất lớn nhất trong mỗi đơn vị thể tích của dịch huyền phù theo bảng Mac Crady.

- Số lượng vi sinh vật trong 1g hay 1ml mẫu được tính bằng cách lấy tích của chỉ số MPN (số lượng gần đúng) với độ pha loãng đã được dùng để nhận được con số đầu tiên trong chỉ số ống dương tính (con số hàng trăm)

Ví dụ: cấy mẫu thực phẩm từ nồng độ nguyên chất, 10^{-1} ,... 10^{-4} vào 5 dãy ống nghiệm ứng với 5 loại nồng độ. Mỗi nồng độ được cấy vào 3 ống môi trường BGBL 2% có ống Durham. Ủ nhiệt độ thích hợp. Kết quả được ghi nhận như sau:

▪ Độ pha loãng	1	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}
▪ Số ống nghiệm được cấy	3	3	3	3	3
▪ Số ống nghiệm có vi sinh vật (+)	3	3	2	1	0
▪ Chỉ số ống (+):	321				
▪ Chỉ số gần đúng của vi sinh vật (chỉ số MPN – tra bảng Mac Crady):	15,0				
▪ Số lượng vi sinh vật có khả năng xuất hiện trong 1 g (1ml)					

$$N \text{ tế bào/ml} = 15 \times 10 = 150 \text{ tế bào/ml}$$

III. CÂU HỎI

Tại sao chỉ đếm số khuẩn lạc nằm trong khoảng 25 - 250 khuẩn lạc

Phụ lục

BẢNG CHỈ SỐ MAC CRADY

Trường hợp cây 2 ống nghiệm cho mỗi nồng độ

Chỉ số ống (+)	Chỉ số MPN	Chỉ số ống (+)	Chỉ số MPN	Chỉ số ống (+)	Chỉ số MPN	Chỉ số ống (+)	Chỉ số MPN
000	0.0	100	0.6	121	3.0	212	20.0
001	0.5	101	1.2	200	2.5	220	25.0
010	0.5	110	1.3	201	5.0	221	70.0
011	0.9	111	2.0	210	6.0	222	110.0
020	0.9	120	2.0	211	13.0		

Trường hợp cây 3 ống nghiệm cho mỗi nồng độ pha loãng

Chỉ số ống (+)	Chỉ số MPN	Chỉ số ống (+)	Chỉ số MPN	Chỉ số ống (+)	Chỉ số MPN	Chỉ số ống (+)	Chỉ số MPN
000	0.0	121	1.5	223	4.0	320	9.5
001	0.3	130	1.6	230	3.0	321	15.0
010	0.3	200	0.9	231	3.5	322	20.0
011	0.6	201	1.4	232	4.0	323	30.0
020	0.6	202	2.0	300	2.5	330	25.0
100	0.4	210	1.5	301	4.0	331	45.0
101	1.7	211	2.0	302	6.5	332	110.0
102	1.1	212	3.0	310	4.5	333	140.0
110	0.7	220	2.0	311	7.5		
111	1.1	221	3.0	312	11.5		
120	1.1	222	3.5	313	16.0		

Trường hợp cây 4 ống nghiệm cho mỗi nồng độ pha loãng

Chỉ số ống (+)	Chỉ số MPN	Chỉ số ống (+)	Chỉ số MPN	Chỉ số ống (+)	Chỉ số MPN	Chỉ số ống (+)	Chỉ số MPN
000	0.0	113	1.3	231	2.0	402	5.0
001	0.2	120	0.8	240	2.0	403	7.0
002	0.5	121	1.1	241	3.0	410	3.5
003	0.7	122	1.3	300	1.1	411	5.5
010	0.2	123	1.6	301	1.6	412	8.0
011	0.5	130	1.1	302	2.0	413	11.0
012	0.7	131	1.4	303	2.5	414	14.0
013	0.9	132	1.6	310	1.6	420	6.0
020	0.5	140	1.4	311	2.0	421	9.5
021	0.7	141	1.7	312	3.0	422	13.0
022	0.9	200	0.6	313	3.5	423	17.0
030	0.7	201	0.9	320	2.0	424	20.0

031	0.9	202	1.2	321	3.0	430	11.0
040	0.9	203	1.6	322	3.5	431	16.5
041	1.2	210	0.9	330	3.0	432	20.0
100	0.3	211	1.3	331	3.5	433	30.0
101	0.5	212	1.6	332	4.0	434	35.0
102	0.8	213	2.0	333	5.0	440	25.0
103	.0	220	1.3	340	3.5	441	40.0
110	0.5	221	1.6	341	4.5	442	70.0
111	0.8	222	2.0	400	2.5	443	140.0
112	1.1	230	1.7	401	3.5	444	160.0

Bài 9 KỸ THUẬT ĐĨA KHÁNG SINH

I. GIỚI THIỆU

- Nhiều vi sinh vật có tính miễn cảm đối với kháng sinh, có thể được kiểm soát bằng kháng sinh. Kháng sinh là nhóm các sản phẩm chuyển hóa được tạo bởi vi sinh vật có tác dụng ức chế sự tăng trưởng hoặc tiêu diệt vi sinh vật khác. Kháng sinh tác động đặc hiệu có nghĩa là một loại kháng sinh chỉ tác động lên một hay một số nhóm vi khuẩn nhất định. Ngày nay, nhiều kháng sinh và dẫn xuất kháng sinh tự nhiên được tổng hợp hóa học.

- Các chủng vi khuẩn khác nhau có độ nhạy cảm với các loại kháng sinh ở mức độ khác nhau, tính miễn cảm của một vi sinh vật đối với kháng sinh có thể được quan sát bằng thực nghiệm dựa trên kỹ thuật đĩa kháng sinh và vòng vô khuẩn. Kỹ thuật đĩa kháng sinh sử dụng một đĩa giấy vô trùng được tẩm kháng sinh ở một liều lượng nhất định đặt lên một hộp petri môi trường rắn chứa vi sinh vật mục tiêu. Kháng sinh sẽ khuếch tán vào môi trường, nếu nồng độ kháng sinh đủ để ức chế sự tăng trưởng của vi sinh vật, xung quanh đĩa sẽ hình thành một vòng vô khuẩn. Đường kính vùng bị chặn diễn đạt tính cảm ứng của vi khuẩn đối với thuốc kháng sinh, trường hợp không có vùng bị chặn, vi khuẩn kháng lại thuốc kháng sinh. Tìm hiểu tính kháng kháng sinh của vi khuẩn gây bệnh giúp cho việc chọn lựa phương hướng điều trị đúng với những kháng sinh đặc hiệu. Kỹ thuật này cũng được dùng để sàng lọc, xác định hoạt tính kháng khuẩn của các kháng sinh hoặc hợp chất kháng khuẩn.

- Những điều cơ bản về kỹ thuật đĩa kháng sinh

Môi trường nuôi cấy: môi trường được chuẩn hóa cao để giúp cho hầu hết các vi khuẩn gây bệnh thông thường mọc tốt (ví dụ môi trường Mueller-Hinton). Đổ vào đĩa petri (đường kính 9cm) 25 ml môi trường, tương ứng độ dày 4 mm $\pm$ 0,5. Các đĩa thạch phải được đặt trên một mặt phẳng ngang bằng để đảm bảo cho độ sâu của thạch ở tất cả các vị trí trong đĩa bằng nhau, cho thạch nguội tới nhiệt độ phòng

Môi trường bổ phụ: Các vi khuẩn khó mọc sẽ được cung cấp thêm các chất bổ phụ vào môi trường cơ bản như máu hoặc các sản phẩm của máu, các vitamin hoặc các yếu tố phát triển khác.

Đĩa giấy kháng sinh: là các khoanh giấy có tẩm kháng sinh được bảo quản trong hộp riêng, dự trữ ở -20°C . Các khoanh giấy làm hàng ngày được giữ ở $2 - 8^{\circ}\text{C}$ tùy theo sự chỉ dẫn của hãng sản xuất và phải được để thăng bằng 30 phút ở nhiệt độ phòng trước khi sử dụng.

Độ đục chuẩn: Độ đục chuẩn Mc Farland 0,5 được làm bằng cách lấy 0,5 ml BaCl_2 nồng độ 0,048 M (1,175% $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ W/V) trộn với 99,5ml H_2SO_4 nồng độ 0,18 M (1% v/v) và phân chia vào các ống giống nhau và cùng loại với những ống để sử dụng cho việc chuẩn bị các hỗn dịch vi khuẩn. Các ống này phải được hàn kín và giữ tối trong nhiệt độ phòng và có thể sử dụng được trong vòng 6 tháng.

Cách tiến hành: cấy dịch khuẩn lên đĩa môi trường bằng cách cấy trải, hoặc láng bằng tấm bông (nếu ở những nơi có độ ẩm không khí cao), hút bỏ dịch khuẩn còn thừa. Để cho khô mặt thạch bằng cách đặt chúng vào tủ ẩm 15 phút. Thông thường, 5 đĩa giấy sẽ được đặt ở xung quanh đĩa và cách nhau khoảng 20 mm từ cạnh của đĩa giấy này tới cạnh của đĩa giấy khác và một đĩa đặt ở trung tâm. Sử dụng kẹp đầu nhọn vô trùng để đặt khoanh giấy nhẹ nhàng, rồi ấn khế khoanh giấy xuống bảo đảm tiếp xúc hoàn toàn với mặt thạch. Không dịch chuyển khoanh giấy nếu như nó đã tiếp xúc với mặt thạch. Các đĩa được để ở nhiệt độ phòng khoảng 30 phút (không quá 60 phút) để đảm bảo cho kháng sinh từ các khoanh giấy khuếch tán ra một cách đồng đều ở thạch. Ủ ngược các đĩa ở 37°C trong vòng 18-20 giờ. Đo đường kính vòng ức chế (được tính bằng mm) từ phía sau mặt đĩa. Nếu cạnh của vòng ức chế không rõ nét, người ta phải đọc khu vực ức chế xấp xỉ 80% sự ức chế.

II. NỘI DUNG THỰC HÀNH

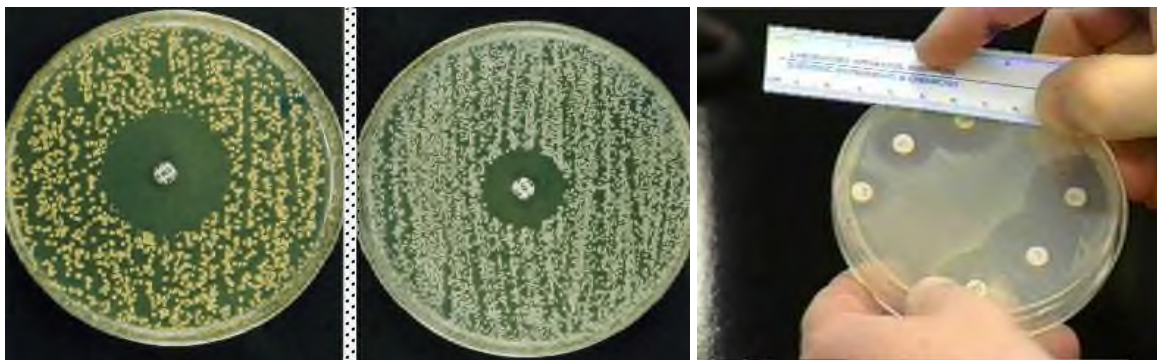
Sinh viên thực hành phương pháp đục lỗ trên đĩa thạch để quan sát tác dụng ức chế tăng trưởng vi sinh vật của kháng sinh.

1. Vật liệu

- Dung dịch chuẩn độ đục: huyền dịch BaSO₄ tương đương với độ đục chuẩn 0.5 McFarland. Huyền dịch như vậy có chứa khoảng 1×10^8 cfu/ml.
- Vi khuẩn thử nghiệm: đĩa khuẩn lạc *E.coli*, *Streptococcus aureus* < 24h
- Thước kẻ li, que cấy tam giác, pipetman và đầu tip 100ul, 1000 ul vô trùng
- Đĩa petri môi trường cao thịt pepton, ống nghiệm chứa 5ml dung dịch pha loãng.
- Các dung dịch kháng sinh riêng lẻ ampicilin, streptomycin (2 mg/ml), kanamycin, tetracylin (96 mg/ml), penicilin (2.000 đơn vị /ml).

2. Thực hành

- Lấy khoảng 10 khuẩn lạc bằng que cấy vòng hòa tan trong 1ml nước muối sinh lý. Chuẩn độ dịch khuẩn *E.coli*, *Staphylococcus aureus* tương đương với độ đục chuẩn 0.5 McFarland.
- Trong điều kiện vô trùng, cấy trải 100 µl dịch khuẩn *E. coli*, *Staphylococcus aureus* lên 2 đĩa thạch chứa môi trường pepton (mỗi chủng cấy 1 đĩa). Hút bỏ dịch thừa nếu có.
- Để khô bề mặt trong 15 phút. Dùng bút đánh dấu chia hộp petri thành 5 phần bằng nhau.
- Dùng dụng cụ vô trùng, đục 5 lỗ có đường kính bằng nhau (6 mm) trên mỗi phần của hộp petri.
- Dùng pipetman và đầu tip 100 µl vô trùng chuyển 50 µl dung dịch kháng sinh vào lỗ thạch. Mỗi lỗ được bổ sung một trong số các kháng sinh sau: ampicilin, kanamycin, penicillin, streptomycin, tetracylin.
- Ủ ở 37°C trong 24 giờ.
- Quan sát và đo đường kính vòng vô khuẩn.



Hình 8.4 Vòng kháng khuẩn của kháng sinh trên đĩa thạch.

Bài 10 KHẢO SÁT ĐẶC TÍNH SINH HÓA CỦA VI SINH VẬT

Phân loại và định danh vi khuẩn là một vấn đề quan trọng trong chẩn đoán vi khuẩn gây bệnh (trên người, động vật và các thủy sản) cũng như trong xét nghiệm vi sinh thực phẩm. Muốn định danh phân loại vi sinh vật, ngoài việc khảo sát hình thái, kích thước tế bào và khuẩn lạc, tính chất bắt màu Gram, cần phải khảo sát các tính chất sinh lý của vi khuẩn thể hiện qua các phản ứng sinh hóa xảy ra trong những môi trường nuôi cấy đặc biệt.

I. Các đặc tính phân giải glucid của vi sinh vật

1. Phản ứng lên men hydratcarbon

* *Nguyên tắc*: nhằm xác định khả năng lên men một loại hydratcarbon đặc hiệu có trong môi trường cơ bản của vi sinh vật. Khi lên men hydratcarbon, vi sinh vật sẽ tạo trong môi trường những acid hữu cơ, có sinh hơi hay không sinh hơi. Việc sinh acid sẽ làm giảm pH thể hiện qua sự đổi màu chất chỉ thị pH có trong môi trường nuôi cấy.

* *Môi trường*: - Phenio Red Broth Base pH 7,4, có bổ sung 1% loại đường cần khảo sát.

- Chỉ thị: phenol red, màu vàng ở pH acid, màu đỏ ở pH kiềm

- Hydratcarbon (1%) thường sử dụng nhất là: glucose, lactose, galactose, raffinose, rhamnose, sucrose, inositol, xylose, fructose, mannitol, sorbitol, trehalose, cellobiose, arabinose,...

Có thể pha dung dịch mẹ (stock) đường 5% hoặc 10% trong nước cất trước khi thêm vào môi trường cơ bản để đạt được nồng độ cần thiết. Môi trường được phân vào các ống nghiệm, sau đó cho các ống Durham vào (để theo dõi sự sinh hơi của vi khuẩn). Khử trùng môi trường ở 116 – 118°C trong 15 phút.

* *Phương pháp cấy*: dùng khuẩn lạc của các dòng thuần 18 – 24 giờ trên môi trường thích hợp. Có thể dùng que cấy vòng hoặc que cấy thẳng để cấy vi khuẩn vào ống nghiệm chứa môi trường cần thử

* *Đọc kết quả*: - Phản ứng (+): môi trường chuyển màu vàng

- Phản ứng (-): môi trường vẫn màu đỏ.

- Có sinh hơi: có khí trong ống Durham

- Ở những vi sinh vật lên men chậm, môi trường có màu cam. Nếu nghi ngờ cần so sánh với ống không cấy, ủ lại và đọc kết quả như trên

* *Ứng dụng*: khả năng lên men đường hoặc rượu thường được dùng để định danh các vi sinh vật đường ruột hoặc để phân tích một số giống hay loài bằng vài loại đường đặc hiệu dựa trên tính chất chuyên biệt của chúng. Ví dụ: mọi thành viên của họ Enterobacteriaceae đều lên men glucose, *E. coli*, *Klebsiella* và nhóm *Enterobacter* lên men glucose và lactose. Thử nghiệm trên có thể giúp phân biệt 2 giống *Listeria monocytogenes* (salicin +) với

Corynebacterium (salicin -), giúp phân biệt *Staphylococcus aureus* (mannitol +) với *S. epidermidis* (mannitol -)...

2. Phản ứng Methyl Red (MR)

* *Nguyên tắc*: phản ứng này dùng để phân biệt 2 loại vi khuẩn về hình thức biến dưỡng glucose:

- Loại 1: lên men thật mạnh đường glucose tạo các chất acid cuối cùng rất bền và cho phản ứng MR (+).

- Loại 2: lên men glucose thành các chất trung gian không bền. Các chất này biến thành các chất trung tính cuối cùng (chất acetoin) và cho phản ứng MR (-).

Yêu cầu là phải thực hiện với canh trùng già ít nhất là 48 giờ.

* *Môi trường và thuốc thử*:

- Môi trường MR-VP (môi trường Clark-Lubs, dạng môi trường đông khô).

- Thuốc thử methyl red:

+ Methyl red	0,02 g
+ Ethanol 95%	50 ml
+ Nước cất	50 ml

* *Phương pháp cấy*: cấy vi khuẩn vào ống nghiệm có chứa 5 ml môi trường MR-VP, ủ trong 24 – 28 giờ ở 37°C, thêm 5 giọt thuốc thử methyl red và lắc đều.

* *Đọc kết quả*:

- Phản ứng (+): môi trường có màu đỏ
- Phản ứng (-): môi trường có màu vàng

* *Ứng dụng*: phản ứng MR giúp phân biệt các giống: *E. coli* (+) với *Enterobacter aerogenes* (-), *Yersinia* (+) với các trực khuẩn Gram âm không thuộc họ đường ruột khác (-), xác định loài *Listeria monocytogenes* (+).

3. Phản ứng Voges Proskauer (VP)

* *Nguyên tắc*: có loại vi khuẩn biến dưỡng đường glucose thành một chất trung tính là acetyl-methyl-carbinol hay acetoin, chất này bị oxyt hóa trong môi trường kiềm và kết hợp với α -naphthol để cho phức chất có màu hồng đỏ.

* *Môi trường và thuốc thử*:

- Môi trường MR-VP (môi trường Clark-Lubs)

- Thuốc thử: dung dịch α -naphthol 5% trong ethanol

- Dung dịch KOH 40% trong nước.

* *Phương pháp cấy*: cấy vi khuẩn vào ống nghiệm có chứa 3 ml môi trường MR-VP ủ 37°C trong 24 – 48 giờ. Sau thời gian ủ thêm vào 1,8 ml α -naphthol 5% (hay 15 giọt trong 1 ml môi trường) và 0,6 ml KOH 40% trong nước (hay 10 giọt trong 1 ml môi trường) lắc đều và để yên 5 – 10 phút.

* *Đọc kết quả*: phản ứng (+) khi có màu hồng đỏ xuất hiện. Vài loại vi khuẩn cho phản ứng (+) chậm và yếu nên cần phải hơi nhẹ vừa nóng (để ống nghiệm hơi nghiêng) mới xuất hiện màu.

* *Ứng dụng*: phản ứng MR-VP giúp phân biệt *E. coli* (thường -) với *Klebsiella*, *Enterobacter* (thường +), *Staphylococcus* (thường +) với *Micrococcus* (thường -).

4. Phản ứng Simmons citrate

* *Nguyên tắc*: một số vi khuẩn có khả năng sử dụng citrate như nguồn carbon duy nhất trong môi trường tổng hợp vô cơ. Khi citrate biến dưỡng đến giai đoạn cuối cùng là CO₂, có một sự mất cân bằng về ion (có sự phóng thích NH₃) và do đó môi trường bị kiềm hóa chuyển từ màu xanh lá cây sang màu xanh dương đậm.

* *Môi trường*: môi trường thạch Simmons citrate (dạng đông khô) được đều chế theo thể thạch nghiêng, thành phần môi trường có chứa chỉ thị màu xanh bromothymol.

* *Phương pháp cấy*: cấy vi khuẩn trên thạch nghiêng, chú ý cấy từ khuẩn lạc của vi khuẩn trên môi trường đặc, không nên cấy từ canh trùng (môi trường lỏng) vì sẽ cho phản ứng (+) giả. Ủ các ống môi trường ở 37°C trong 18 – 24 giờ.

* *Đọc kết quả*:

- Phản ứng (+): vi khuẩn mọc trên mặt thạch nghiêng với sự đổi màu sang màu xanh dương hoàn toàn, chút ít hay không.

- Phản ứng (-): vi khuẩn không mọc trên mặt thạch và không đổi màu môi trường.

* *Ứng dụng*: phản ứng giúp phân biệt *Edwardsiella* (-) với *Salmonella* (thường +), *Klebsiella*, *Enterobacter* (thường +) với *E. coli* (-), *Aeromonas hydrophilia* (thường +) với *A. salmonicida* (-).

5. Phản ứng Malonat

* *Nguyên tắc*: phản ứng dùng để khảo sát khả năng sử dụng Sodium malonat làm nguồn carbon. Khi vi khuẩn sử dụng malonat sẽ sinh ra phản ứng kiềm, biến đổi môi trường từ màu xanh lá cây sang màu xanh dương.

* *Môi trường*: Malonat broth (lỏng) với chỉ thị là màu là xanh bromothymol (màu xanh lá cây).

* *Phương pháp cấy*: dùng que cấy lấy 1 ít vi khuẩn thuần khiết (hay khuẩn lạc trên môi trường thạch) cấy vào môi trường malonat lỏng, ủ 37°C trong 18 – 24 giờ.

* *Đọc kết quả*:

- Phản ứng (+): môi trường chuyển sang màu xanh dương.

- Phản ứng (-): môi trường vẫn màu xanh lá cây

* *Ứng dụng*: phản ứng giúp phân biệt các giống *Alcaligenes faecalis* (+) với *Acinobacter* (-), *Klebsiella*, *Enterobacter* (+) với *E. coli* (-), *Arizona* (+) với *Salmonella* (-).

6. Phản ứng trên môi trường KIA (Kligler Iron Agar) hay TSI (Triple Sugar Iron agar)

* *Nguyên tắc*: phản ứng này dùng để phân biệt các loại vi trùng thuộc họ Enterobacteriaceae. Môi trường KIA (có thể dùng môi trường TSI) thường dùng để khảo sát sự lên men đường glucose, lactose và khả năng sinh khí H₂S, khí H₂ và CO₂ của vi

khuẩn. Trong môi trường có chỉ thị màu phenol red dùng để phát hiện khả năng lên men đường của vi khuẩn. Đây là môi trường đặc, được chuẩn bị trong ống nghiệm ở thể nghiêng sâu.

* *Phương pháp cấy*: cấy vi khuẩn bằng cách cấy đâm sâu vào phần môi trường sâu và cấy trên bề mặt thạch nghiêng. Ủ ở nhiệt độ thích hợp một thời gian.

* *Đọc kết quả*: có các trường hợp xảy ra:

- Phần sâu và phần nghiêng vẫn giữ màu đỏ: vi khuẩn không lên men ở cả 2 loại đường, có nghĩa vi khuẩn là gốc lactose âm, glucose âm, (kí hiệu K/K).

- Phần sâu bị acid hóa đổi màu vàng, phần nghiêng vẫn giữ màu đỏ: nguyên nhân là do khởi đầu vi khuẩn lên men glucose, acid hóa 2 phần nghiêng và sâu. Sau đó vì trên phần nghiêng vi khuẩn mọc nhanh nên đã kiềm hóa trở lại do sự biến dưỡng peptone có trong môi trường và thải ra $\text{NH}_3 \rightarrow$ vi khuẩn gốc lactose âm, glucose dương (K/A).

- Phần nghiêng và phần sâu đổi màu vàng do vi khuẩn lên men cả 2 loại đường, môi trường trở nên rất acid, các chất chuyển hóa kiềm được phóng thích từ sự biến dưỡng peptone ở phần nghiêng không đủ sức để trung hòa cùng một lúc các chất chuyển hóa acid của 2 loại đường glucose và lactose, nên phần nghiêng không bị kiềm hóa như trường hợp trên $\rightarrow$ vi khuẩn thuộc gốc lactose dương, glucose dương (A/A).

- Có hiện tượng sinh khí: sinh các bong bóng khí ở phần sâu do vi khuẩn lên men đường sinh khí CO_2 và $\text{H}_2 \rightarrow$ vi khuẩn là gốc có khả năng sinh hơi.

- Khi có màu đen xuất hiện ở vùng nối 2 phần nghiêng và sâu là do vi khuẩn có khả năng khử sulfate có trong môi trường, tạo thành khí H_2S . Chất này phản ứng với Fe (ferrous sulfate) có trong môi trường để tạo kết tủa sulfur sắt màu đen.

Chú ý: môi trường TSI chỉ khác với KIA ở chỗ có thêm đường sucrose (saccharose). Sucrose có nồng độ giống lactose, sự sử dụng sucrose cũng giống lactose, được ghi nhận bởi sự acid hóa ở phần thạch đứng và nghiêng. Môi trường này giúp tìm ra những vi khuẩn lên men lactose chậm (nhiều ngày) vì đa số vi khuẩn đường ruột lên men lactose chậm, đều lên men sucrose sau một ngày. Cách thực hiện phản ứng cũng tương tự như môi trường KIA, cho kết quả về lên men đường glucose, lactose, sucrose, sinh H_2S và sinh hơi.

7. Phản ứng thủy phân tinh bột

* *Nguyên tắc*: một số vi sinh vật sinh amylase thực hiện việc thủy phân tinh bột và sử dụng các sản phẩm thủy phân để làm nguồn carbon và năng lượng. Để phát hiện khả năng này, căn cứ vào sự chuyển màu của môi trường tinh bột khi gặp iot.

* *Môi trường và thuốc thử*:

- Môi trường tinh bột (%):	Peptone	1,0
	KH_2PO_4	0,5
	Tinh bột tan	0,2
	Agar	1,5

pH 6,8 – 7,0

Chuẩn bị môi trường trong bình tam giác, khử trùng 1 atm và sau đó rót vào đĩa petri vô trùng.

- Dung dịch Lugol

* *Phương pháp cấy*: sau khi môi trường đông, cấy vi sinh vật cần nghiên cứu thành một vết cấy dọc theo đường kính của đĩa petri hay cấy chấm ở giữa đĩa thạch (đối với nấm mốc). Nuôi cấy 7 – 10 ngày đêm. Khi vi sinh vật phát triển, nhỏ dung dịch Lugol phủ kín bề mặt môi trường.

* *Đọc kết quả*: quan sát vùng môi trường quanh vết cấy:

- Nếu có sự thủy phân tinh bột bởi vi sinh vật thì vùng quanh vết cấy sẽ không màu hay màu đỏ nâu (do tinh bột bị thủy phân).

- Nếu vùng quanh vết cấy có màu tím, chứng tỏ vi sinh vật không có khả năng thủy phân tinh bột do không có enzyme amylase.

* *Ứng dụng*: khảo sát đặc tính sinh enzyme amylase của nấm mốc và vi khuẩn, phân biệt *Corynebacterium diptheriae type gravis* (+) với *Corynebacterium* spp. (-), *Streptococcus bovis* nhóm D (+) với *Streptococcus* spp. khác (-).

II. Các đặc tính phân giải hợp chất nitơ của vi sinh vật

1. Phản ứng hóa lỏng gelatin (phân giải protein)

* *Nguyên tắc*: một số vi sinh vật có khả năng dịch hóa (làm lỏng) gelatin nhờ chúng tiết vào môi trường các enzyme thủy phân protein (collagenase). Để phát hiện khả năng này, người ta cấy các vi sinh vật cần nghiên cứu lên môi trường gelatin – nước thịt – peptone.

* *Môi trường*: môi trường gelatin 12% (nutrient broth + 12% gelatin): thêm 12% gelatin vào môi trường canh thịt – peptone, để yên 20 – 30 phút cho gelatin trương lên, sau đó nung trong nồi cách thủy cho đến khi gelatin tan hết. Rót hỗn hợp trên vào các ống nghiệm, mỗi ống 8 – 10 ml. Khử trùng ở 0,5 atm trong 15 phút.

* *Phương pháp cấy*: cấy bằng que cấy đầu nhọn theo lối cấy đâm sâu, ủ ở 30°C trong 24 – 48 giờ.

* *Đọc kết quả*: nếu vi khuẩn được ủ ở nhiệt độ 30°C, để quan sát hiện tượng hóa lỏng gelatin phải đưa ống nghiệm nuôi cấy vi khuẩn vào tủ lạnh trong vòng 10 phút, sau đó lấy ra quan sát:

- Phản ứng (+): môi trường gelatin ở trạng thái lỏng

- Phản ứng (-): môi trường gelatin ở trạng thái đông đặc.

2. Phản ứng Indol

* *Nguyên tắc*: một số vi khuẩn có khả năng phân giải tryptophan trong môi trường thành indol. Nhân pyrol của indol sẽ kết hợp với p-dimethylamino benzaldehyde trong thuốc thử Kovacs tạo thành một phức chất dạng quinon màu đỏ tía trên mặt thoáng của môi trường.

* *Môi trường và thuốc thử*:

- Môi trường: Tryptone water gồm 15 g tryptone trong 1 lít nước cất, pH 7,3, phân phối vào ống nghiệm, hấp khử trùng 121°C trong 15 phút.

- Môi trường kết hợp: MIU (Motility-Indol-Urea); SIM (Sulfide-Indol-Motility).

- Thuốc thử Kovacs:
- | | |
|--------------------------------|--------|
| - p-dimethylamino benzaldehyde | 10 g |
| - Amyl hoặc butanol | 150 ml |
| - HCl đậm đặc | 50 ml |

Thuốc thử đựng trong chai nâu và luôn đậy kín, khi thuốc thử đổi màu nâu sẫm thì đổ bỏ.

* *Phương pháp cấy:*

- Đối với môi trường nước peptone: dùng que cấy lấy vi khuẩn cần kiểm tra cho vào ống nghiệm chứa môi trường nước peptone.

- Nếu dùng môi trường MIU hay SIM: dùng que cấy đã lấy vi khuẩn đâm thẳng vào giữa mặt thạch một đường dài bằng $\frac{3}{4}$ chiều sâu của thạch. Ủ 37°C trong 18 – 24 giờ. Sau thời gian ủ, nhỏ 3 – 5 giọt thuốc thử Kovacs vào canh trùng.

* *Đọc kết quả:*

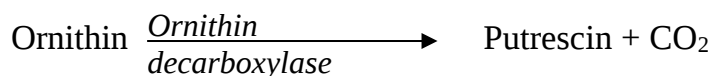
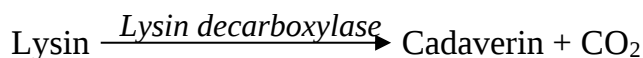
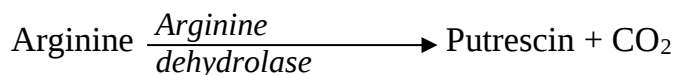
- Phản ứng (+): một vòng màu đỏ sẫm xuất hiện trên bề mặt môi trường.

- Phản ứng (-): bề mặt môi trường giữ nguyên màu vàng của thuốc thử

* *Ứng dụng:* phản ứng indol dùng để phân biệt các vi khuẩn trong nhóm Coliforms. Ví dụ: *E. coli* (thường +) với *Klebsiella* và *Enterobacter* (thường -).

3. Phản ứng ADH (Arginine dehydrolase), LDC (Lysin decarboxylase), ODC (Ornithine decarboxylase)

* *Nguyên tắc:* phản ứng này dùng để xác định vi sinh vật có khả năng phân giải acid amin bằng cách khử nhóm carboxyl (-COOH) thành amin hoặc diamin và CO₂ nhờ có enzyme decarboxylase. Các sản phẩm của sự tách carboxyl làm tăng pH môi trường, làm chuyển màu chất chỉ thị. Sự phân giải acid amin xảy ra trong điều kiện kỵ khí.



* *Môi trường và thuốc thử:*

- Môi trường Moller Decarboxylase Base (dạng đông khô), thêm vào acid amin: lysin, arginin, ornithin nồng độ 1%, pH 6,0, phân phối vào ống nghiệm, khử trùng 121°C trong 20 phút.

- Chỉ thị màu bromocresol purple, chuyển màu từ vàng sang tím ở pH 6,8.

Ống B (Base – đối chứng): ống kiểm chứng chỉ chứa glucose, không chứa acid amine.

Ống L (Lysin): chứa glucose và lysin

Ống A (Arginin): chứa glucose và arginin

Ống O (Ornithin): chứa glucose và ornithin

- Dầu parafin

* *Phương pháp cấy*: cấy vi khuẩn vào 4 ống B, L, A, O, phủ dầu parafin trên bề mặt môi trường dày khoảng 5 mm. Ủ 37°C trong 18 – 24 giờ.

* *Đọc kết quả*:

- Đọc ống B trước: ống này phải có màu vàng

- Đọc các ống L, A, O: phản ứng (+) có màu tím, phản ứng (-) có màu vàng.

* *Ứng dụng*: dùng để phân loại và định danh các loài thuộc họ Enterobacteriaceae.

4. Phản ứng Urease

* *Nguyên tắc*: một số vi khuẩn sản xuất ra enzyme urease thủy phân ure trong môi trường thành CO₂ và NH₃. Môi trường bị kiềm hóa làm chất chỉ thị màu phenol red đổi sang màu đỏ.

* *Môi trường*:

- Môi trường ure đặc (Christensen Ure agar): rất nhạy

- Môi trường ure lỏng với chất chỉ thị màu phenol red.

* *Phương pháp cấy*: cấy vào môi trường gốc vi khuẩn thuần khiết từ một khuẩn lạc. Ủ 37°C trong 18 – 24 giờ.

* *Đọc kết quả*:

- Phản ứng (+): môi trường chuyển sang màu đỏ

- Phản ứng (-): môi trường không đổi màu

* *Ứng dụng*: *Klebsiella* cho phản ứng (+) sau 18 – 24 giờ, *Citrobacter* cho phản ứng (+) sau 24 – 48 giờ, *Proteus* cho phản ứng (+) sau 18 – 24 giờ, đối với các vi khuẩn khác loại môi trường lỏng ít nhạy nên khó tìm thấy phản ứng (+).

5. Phản ứng sinh H₂S

* *Nguyên tắc*: xác định khả năng vi sinh vật sinh H₂S từ các acid amin chứa lưu huỳnh (methionine, cysteine và cystine) tạo chất kết tủa màu đen. Việc tạo thành H₂S còn đặc trưng cho cả nhóm vi sinh vật khử sulfate thành H₂S trong hô hấp kỵ khí.

* *Môi trường*: canh thịt-peptone được phân phối vào ống nghiệm và hấp khử trùng. Có thể dùng môi trường KIA hay SIM (bán lỏng) để thử khả năng sinh H₂S.

* *Phương pháp cấy*: với canh thịt, cấy vi khuẩn cần kiểm tra vào ống môi trường. Sau khi cấy, gắn vào nút bông một miếng giấy lọc có tẩm acetate chì. Bên ngoài nút bông bọc thêm một lớp nylon để ngăn khí H₂S bay ra khỏi ống nghiệm. Ủ ở 37°C trong 7 – 10 ngày. Đối với môi trường KIA hay SIM, cấy theo lối cấy đâm với que cấy thẳng.

* *Đọc kết quả*:

- Đối với môi trường canh thịt có gắn giấy lọc tẩm acetate chì, nếu thấy giấy lọc chuyển sang màu đen là phản ứng (+), nếu không có màu đen là phản ứng (-).

- Đối với môi trường KIA hay SIM, quan sát thấy các vệt màu đen trong môi trường là phản ứng (+), nếu không thấy xuất hiện các vệt đen trong thạch là phản ứng (-).

* *Ứng dụng*: phân biệt *Pseudomonas putrefaciens* (+) với *Pseudomonas* spp. khác (-), *Salmonella* (thường +) với *Shigella* (-).

6. Phản ứng khử nitrate (nitrate reductase)

* *Nguyên tắc*: việc khử nitrate thành nitrite (đôi khi thành N_2) xảy ra ở các vi sinh vật có enzyme nitratoreductase, chúng có khả năng sử dụng nitrate làm nguồn thức ăn nitơ. Ngoài ra có một số vi sinh vật có khả năng sử dụng nitrate làm chất nhận e^- hay H^+ trong hô hấp kỵ khí để oxy hóa hợp chất hữu cơ: $NO_3^- + 2e^- + 2H^+ \longrightarrow NO_2^- + H_2O$.

* *Môi trường và thuốc thử*: môi trường nitrate: canh thịt peptone có chứa 0,2% KNO_3 và thuốc thử Griess gồm 2 loại có thành phần sau:

- Acid sulfanilic: hòa tan 0,5 g acid sulfanilic vào 30 ml acid acetic (glacial) bổ sung thêm 100 ml nước cất, đem lọc. Dung dịch được bảo quản trong 1 tháng.

- α - naphthylamin: hòa tan 0,1 g α -naphthylamin trong 100 ml nước cất đun sôi. Để nguội rồi bổ sung thêm 30 ml acid acetic (glacial), đem lọc, bảo quản trong 1 tháng.

* *Phương pháp cấy*: cấy vi khuẩn vào môi trường nitrate, ủ trong 1 – 5 ngày. Thêm 1 ml dung dịch acid sulfanilic, tiếp theo thêm 1 ml dung dịch α -naphthylamin.

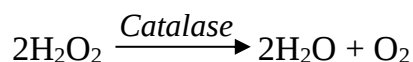
* *Đọc kết quả*: nếu có sự hình thành một hợp chất màu đỏ hồng chứng tỏ có hiện diện của NO_2 (do nitrate bị khử thành nitrite) kết luận phản ứng (+). Nếu không có sự hình thành hợp chất màu đỏ hồng phải tiếp tục thêm 2 – 3 mg bột kẽm (Zn) vào ống nghiệm. Nếu sau 5 phút vẫn không có màu đỏ là phản ứng (-), nếu có màu đỏ xuất hiện là phản ứng (+) do còn hiện diện NO_3 khi gặp Zn sẽ bị khử thành NO_2 .

* *Ứng dụng*: xác định các vi khuẩn trong họ Enterobacteriaceae thường có phản ứng (+).

III. Các phản ứng liên quan đến enzyme hô hấp của vi sinh vật

1. Phản ứng catalase

* *Nguyên tắc*: nhằm xác định sự có mặt của enzyme catalase của một số vi sinh vật hô hấp kỵ khí tùy ý. Catalase giúp vi sinh vật kỵ khí không bị ngộ độc khi môi trường có oxy không khí bởi sự hình thành chất H_2O_2 . Catalase xúc tác phản ứng sau:



* *Thuốc thử*:

- Hydrogen peroxide 30% (superoxal) giữ lạnh trong chai sẫm màu, tránh sáng.

- Dung dịch đệm phosphate (M/15), pH 7,0

* *Phương pháp thử*:

- Thử trên lame: dùng kim cây lấy tâm của khuẩn lạc thuần khiết (18 - 20 giờ ủ trên môi trường thích hợp) đặt lên lame kính sạch, rồi nhỏ một giọt H_2O_2 30% lên trên. Việc dùng kim hoặc khuyên cây trộn lẫn H_2O_2 vào vi sinh vật là không cần thiết.

- Thử trong ống nghiệm: nhỏ trực tiếp 1 ml H₂O₂ 30% lên dòng thuần vi sinh vật cấy dày trên mặt thạch nghiêng (không dùng môi trường thạch máu). Quan sát các bóng khí xuất hiện tức thì và ghi nhận kết quả.

- Phương pháp lamelle: dùng kim cấy lấy tâm khuẩn lạc đặt lên lam kính, nhỏ một giọt H₂O₂ 0,5% lên và đẩy lại bằng lamelle. Theo dõi bóng khí bị giữ lại dưới lamle.

* *Đọc kết quả:*

- Catalase (+): tạo O₂, các bóng khí xuất hiện tức thì (hoặc trong vòng 10 giây)

- Catalase (-): không tạo O₂, không có bóng khí.

* *Ứng dụng:* phản ứng thường được dùng để phân biệt vi sinh vật hiếu khí với vi sinh vật kỵ khí: *Bacillus* (+) với *Clostridium* (-), *Streptococcus* (-) với *Micrococcus* hay *Staphylococcus* (+), *Listeria monocytogenes* (+) với *Erysipelothrix* (-)

2. Phản ứng Oxydase

* *Nguyên tắc:* nhằm xác định sự có mặt của enzyme cytochrom oxydase của vi khuẩn. Đây là nhóm enzyme cuối cùng vận chuyển e- đến oxy phân tử để tạo thành nước trong chuỗi hô hấp.

* *Giống vi khuẩn và thuốc thử:*

- Vi khuẩn kiểm tra được nuôi trên môi trường thạch đến khi phát triển thành khuẩn lạc.

- Thuốc thử: Tetramethyl-p-phenylenediamine dihydrochloride 1% (dung dịch không màu)

* *Đọc kết quả:* để xác định hoạt tính oxydase có 2 cách:

- Cách 1: người ta nhỏ vài giọt dung dịch Tetramethyl-p-phenylenediamine dihydrochloride 1% (trong nước) lên trên các khuẩn lạc mọc trong các đĩa thạch. Khuẩn lạc của các vi sinh vật có hoạt tính oxydase sẽ bị nhuộm đỏ và sau 10 - 30 phút chuyển thành đen.

- Cách 2: nhỏ vài giọt thuốc thử trên lên giấy lọc. Dùng que cấy lấy một ít vi khuẩn cần kiểm tra bôi lên giấy lọc có tẩm dung dịch thuốc thử phản ứng oxydase. Phản ứng (+) sẽ tạo màu đỏ tím trong vòng 10 - 30 phút.

* *Ứng dụng:* giúp xác định *Aeromonas* (+), *Pseudomonas* (thường +), Enterobacteriaceae (-).

Phân biệt: vi khuẩn họ Pseudomonadaceae (oxydase +) với họ Enterobacteriaceae (-)

3. Phản ứng O/F (Oxidation-fermentation test)

* *Nguyên tắc:* xác định vi khuẩn chuyển hóa carbohydrate (glucose) bằng cách lên men (Fermentation) hay bằng cách oxyd hóa hiếu khí (Oxydation).

* *Môi trường:*

- Môi trường: O-F Basal Medium, khử trùng ở 121°C/15 phút.

- Dung dịch glucose 10%, khử trùng bằng cách lọc với màng lọc có kích thước 0,2 µm.

Bổ sung một cách vô trùng 10 ml dung dịch đường glucose 10% với 90 ml môi trường O/F basal để có môi trường O/F có chứa 1% đường. Phân phối môi trường vào ống nghiệm trong điều kiện vô trùng: 5 ml mỗi ống.

* *Phương pháp cấy*: cấy vi khuẩn kiểm tra vào 2 ống môi trường:

- Ống 1: ủ trong điều kiện kỵ khí (cho thêm một lớp parafin vô trùng)
- Ống 2: ủ trong điều kiện hiếu khí.

* *Đọc kết quả*:

- Vi khuẩn oxyd hóa (O): ống kỵ khí có màu xanh (green), ống hiếu khí có màu vàng.
- Vi khuẩn lên men (F): cả hai ống môi trường đều có màu vàng.
- Không phản ứng: cả 2 ống có màu xanh.

* *Ứng dụng*: phản ứng dùng để phân biệt các vi khuẩn G- không thuộc họ đường ruột với các vi khuẩn G- thuộc họ Enterobacteriaceae. Ví dụ: Vi khuẩn họ Enterobacteriaceae có phản ứng lên men glucose (F). Hầu hết các vi khuẩn *Pseudomonas* spp. có phản ứng oxyd hóa glucose (O).

IV. Khảo sát tính chất liên quan đến tính gây bệnh ở vi sinh vật

1. Phản ứng đông huyết tương (coagulase test)

* *Nguyên tắc*: kiểm tra khả năng làm đông huyết tương của vi sinh vật do tác dụng của men coagulase. Coagulase là một chất giống prothombin có khả năng tác động lên những yếu tố bình thường của huyết tương để sinh ra chất giống thrombin, có tác dụng biến fibrinogen thành fibrin (kết quả tạo khối đông dạng sợi).

* *Hóa chất – thuốc thử*:

- Hóa chất thử: huyết tương hoặc fibrinogen.
- Huyết tương: nên dùng huyết tương người hoặc thỏ vô trùng, tươi hoặc đông khô (dạng thương mại). Huyết tương tươi thu được bằng cách quay ly tâm máu tươi có chứa chất chống đông. Huyết tương đông khô đã pha nên dùng ngay trong ngày.

* *Phương pháp thử và đọc kết quả*:

- Phương pháp thử trên lame: nhỏ một giọt nước cất hay nước muối sinh lý lên lame kính sạch, dùng que cấy lấy một lượng lớn tế bào từ khuẩn lạc cần kiểm tra, hòa nhẹ vào giọt nước, tạo huyền phù nồng độ cao. Thêm vào một khuyên cấy chứa huyết tương, trộn đều và đọc kết quả:

+ Phản ứng (+): có ngưng kết rõ rệt sau 5 – 20 giây hoặc từ 20 giây đến 2 phút. Nếu ngưng kết xảy ra sau một phút, lặp lại phép thử trên lame. Nếu kết quả vẫn như cũ chuyển sang thử trong ống nghiệm.

+ Phản ứng (-): không có ngưng kết, hỗn dịch vẫn đồng nhất. Khẳng định bằng cách thử trong ống nghiệm.

- Phương pháp thử trong ống nghiệm: cho vào ống nghiệm 0,5 ml huyết tương thỏ. Thêm 0,5 ml dịch nuôi cấy dòng thuần hoặc một khuyên cấy khuẩn lạc từ môi trường thạch. Xoay

nhẹ (không lắng) để trộn đều vi khuẩn. Ủ 37°C. Quan sát 30 phút liên tục 4 giờ (khi xem chỉ nghiêng nhẹ ống nghiệm). Đọc kết quả:

+ Phản ứng (+): xuất hiện những khối đông hoặc những sợi rõ rệt. Mọi mức độ đông kết đều được coi là dương tính.

+ Phản ứng (-): không có khối đông, hỗn dịch vẫn đồng nhất như ống không cấy.

* *Ứng dụng*: phản ứng đông huyết tương là test đặc hiệu để phân biệt các loài trong giống *Staphylococcus*: *S. aureus* (+) với *S. epidermidis* (-) và *S. saprophyticus* (-). Kết quả: Phản ứng dương tính (+) thường được coi là tiêu chuẩn chẩn đoán cuối cùng để định danh *Staphylococcus aureus* và chỉ thị về tính gây bệnh.

V. CÁC PHẢN ỨNG SINH HÓA ĐẶC BIỆT KHÁC

1. Phản ứng ONPG

* *Nguyên tắc*: xác định sự có mặt hay không có mặt enzyme β -galactosidase nhờ vào sử dụng một chất hữu cơ có tên gọi: O-Nitrophenyl- β -D-galactopyranoside (gọi tắt ONPG) hoặc chất hữu cơ p-Nitrophenyl- β -D-galactoside (PNPG) được xem như là cơ chất đối với enzyme. Khi vi khuẩn có enzyme β -galactosidase thì chúng sẽ phân cắt cơ chất O-Nitrophenyl- β -D-galactoside để giải phóng nitrophenyl làm môi trường xuất hiện màu vàng.

* *Mục đích*: phân biệt các vi khuẩn có khả năng sử dụng đường lactose và vi khuẩn không sử dụng được lactose (không có β -galactosidase): *Citrobacter* và *Arizona* (+) với *Salmonella* (-), *Escherichia coli anaerogeneic* (+) với *Shigella sonnei* (-).

* *Cách thử*: dùng que cấy lấy 1 khuẩn lạc của vi khuẩn cho vào ống nghiệm chứa 0,25 ml dung dịch NaCl 0,85% và 1 giọt toluen, lắc để phân tán đều, ủ ở 37°C trong 5 – 10 phút. Thêm 0,25 ml dung dịch ONPG, ủ ở 37°C trong 20 phút đến 24 giờ.

Có thể dùng đĩa ONPG (đĩa giấy lọc có tẩm ONPG) cho vào ống nghiệm chứa huyền dịch vi trùng trên.

* *Đọc kết quả*: sau 20 phút thấy có sự đổi màu sang màu vàng là phản ứng (+), nếu không đổi màu thì tiếp tục ủ thêm, thời gian tối đa là 24 giờ, nếu không đổi màu là phản ứng (-).

2. Phản ứng KCN

* *Nguyên tắc*: dùng để phân biệt các vi khuẩn có khả năng sống và phát triển được trong môi trường dinh dưỡng có chứa chất potassium cyanic (KCN) – một chất độc đối với đa số vi khuẩn.

* *Môi trường*: cứ 100 ml môi trường KCN broth base (sau khi khử trùng xong) được bổ sung 1,5 ml dung dịch KCN nồng độ 0,5%.

* *Cách thử*: Cấy vi khuẩn vào môi trường dinh dưỡng có KCN, ủ ở 35°C trong 48 giờ.

* *Đọc kết quả*:

- Phản ứng (+): vi trùng mọc được làm đục môi trường

- Phản ứng (-): vi trùng không mọc được và vi trùng vẫn trong

* *Ứng dụng*: dùng để phân biệt vi khuẩn: *Citrobacter freundii* (+) với nhóm *Salmonella* (-), *Pseudomonas aeruginosa* (+) với *Alcaligenes fecalis* (-).

3. Thủy phân Esculine

* *Nguyên tắc*: nhằm xác định khả năng thủy phân glycoside escilin thành glucose và esculetin của một số vi khuẩn trong điều kiện có sự hiện diện của 40% mật.

* *Môi trường*: môi trường Bile Esculin Medium (môi trường chứa 40% mật) được phân phối vào các ống nghiệm, khử trùng 121°C, làm thạch nghiêng.

* *Cách thử*: cấy vi khuẩn thuần khiết cần kiểm tra ở 24 giờ tuổi, ủ 35°C trong 24 giờ (hoặc 48 giờ đối với *Streptococcus*).

* *Đọc kết quả*:

- Phản ứng (+): tạo màu đen trên môi trường quanh khuẩn lạc vi khuẩn.

- Phản ứng (-) (chỉ được kết luận sau 72 giờ ủ): không tạo màu đen trên môi trường.

* *Ứng dụng*: dùng để phân biệt *Streptococcus* nhóm D (+) với các *Streptococcus* không thuộc nhóm D, *E. coli* (-) với *Klebsiella serratia* (+).

VI. THÀNH PHẦN VÀ CÁCH PHA MỘT SỐ LOẠI MÔI TRƯỜNG

1. Môi trường MR-VP (môi trường Clark Club)

- Thành phần (g/l)

Peptone	5 g
K ₂ HPO ₄	5 g
Dextrose	5 g

- Cách pha: đun tan các chất trên trong 1000 ml nước cất, chỉnh pH 7,5, phân phối vào các ống nghiệm đường kính cỡ 16 mm, mỗi ống khoảng 4 ml, hấp khử trùng ở 121°C trong 15 phút.

2. Môi trường Simmons citrate agar

- Thành phần (g/l)

NH ₄ H ₂ PO ₄	1 g	K ₂ HPO ₄	1 g
NaCl	5 g	Natri citrate	2 g
MgSO ₄	0,2 g	Bromothymol blue	0,08 g
Agar	12,5 g		

- Cách pha: đun tan các chất trên trong 1000 ml nước cất, điều chỉnh pH 6,6, phân phối vào các ống nghiệm, hấp khử trùng 121°C trong 15 phút, làm thạch nghiêng.

3. Môi trường KIA (Kligler Iron Agar)

- Thành phần (g/l)

Cao thịt	3 g
Cao nấm men	3 g
Peptone	15 g
Proteose peptone	5 g
NaCl	5 g
Lactose	10 g
Glucose	1 g

Ferrous sulfate	0,2 g
Sodium thiosulfate	0,3 g
Dung dịch methyl red 0,5%	0,6 ml
Agar	12 g

- Cách pha: hòa các chất trên trong 1000 ml nước cất, đun sôi để hòa tan hoàn toàn, điều chỉnh pH 7,4, phân phối vào các ống nghiệm, hấp khử trùng 121°C trong 15 phút, làm thạch nghiêng sâu (thể tích phần đáy gấp đôi thể tích phần nghiêng).

4. Môi trường MIU (Motility Indol Urea)

- Thành phần (g/l)

Tryptone	30 g
KH ₂ PO ₄	1 g
NaCl	5 g
Phenol red 1%	2,5 ml
Agar	4 g (thạch mềm)

- Cách pha: đun tan các chất trên trong 1000 ml nước cất, hấp khử trùng 121°C trong 15 phút. Dùng nước cất pha dung dịch urea 20%, khử trùng bằng bộ lọc vi khuẩn. Thêm dung dịch urea vào môi trường thạch để nguội khoảng 45°C theo tỉ lệ 1 : 9. Phân phối môi trường vào các ống nghiệm vô trùng, mỗi ống 5 ml và để thẳng đứng (làm thạch đứng).

5. Huyết tương dùng thử phản ứng ngưng kết

Hòa tan 10 g sodium citrate vào nước cất để có dung dịch 10%. Mỗi 100 ml máu cần 3 ml dung dịch citrate. Cho dung dịch citrate vào trong ống nghiệm có nắp, khử trùng bằng autoclave. Dùng xylanh vô trùng hút máu thỏ (đang đói) cho vào ống nghiệm, lắc nhẹ để trộn đều cho máu không đông. Quay ly tâm 3000 vòng/phút trong 10 phút. Lấy phần dịch trong ở trên, đó chính là huyết tương. Phân phối vào trong các ống nghiệm vô trùng, bảo quản trong tủ lạnh.

6. Bile Esculin Medium

Peptone	5 g
Oxgall (Bile)	40 g
Feriric citrate	0,5 g
Beef extract	3 g
Esculine	1 g
Agar	15 g
Nước cất	1000 ml

7. KCN broth

Peptone	3 g
NaCl	5 g
KH ₂ PO ₄	0,225 g
Na ₂ HPO ₄ .2H ₂ O	5,64 g
Nước cất	1000 ml

Khử trùng 121°C trong 15 phút, để nguội 45°C. Cứ 100 ml môi trường cho thêm 1,5 ml dung dịch KCN 0,5%. Phân phối vào ống nghiệm trong điều kiện vô trùng.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Nguyễn Ngọc Hải và Nguyễn Thị Kim Loan, 2009. *Thực hành Nghiên cứu vi sinh vật*. Nhà xuất bản Nông nghiệp.
2. Nguyễn Xuân Thành (chủ biên). *Giáo trình thực tập vi sinh vật*, trường ĐH Nông Nghiệp Hà Nội. Nhà xuất bản Nông Nghiệp.
3. Ted R. Johnson and Christine L. Case. *Laboratory Experiments in Microbiology*. An Imprint of Addison Wesley Longman.
4. *Thực hành vi sinh vật đại cương*. Trường ĐH Khoa học Tự nhiên Tp. Hồ Chí Minh
5. Vương Thị Việt Hoa, 2002. *Thực tập Vi sinh đại cương*. Tủ sách Đại học Nông Lâm TP.HCM.

LỜI GIỚI THIỆU

Giáo trình CÔNG NGHỆ VI SINH được biên soạn cho trình độ cao đẳng Công nghệ sinh học hiện đang được đào tạo tại Khoa Nông nghiệp và sinh học ứng dụng Trường Cao đẳng Đà Lạt

Giáo trình được biên soạn căn cứ trên chương trình khung mô đun công nghệ sau thu hoạch trong Công nghệ sinh học.

Nguồn tài liệu tham khảo dựa trên nhiều tác giả và các biên soạn giáo trình của đồng nghiệp tại Khoa

Lâm Đồng ngày 10 tháng 10 năm 2018

Tham gia biên soạn

Chủ biên: Nguyễn Lâm Thiên Thanh