

TRƯỜNG ĐẠI HỌC VĂN LANG
KHOA CÔNG NGHỆ

Giáo trình thực hành:

VI SINH VẬT HỌC

(LƯU HÀNH NỘI BỘ)

GVTH: TS. VÕ THỊ XUYẾN

TP. HỒ CHÍ MINH - 2020

MỤC LỤC

NGUYÊN TẮC CHUNG KHI LÀM VIỆC TRONG PHÒNG THÍ NGHIỆM VI SINH VẬT	1
I. NGUYÊN TẮC LÀM VIỆC.....	1
II. MỘT SỐ LƯU Ý VỚI SINH VIÊN NHẪM ĐẠT KẾT QUẢ TỐT TRONG THỰC HÀNH VI SINH VẬT HỌC	1
III. ĐÁNH GIÁ KẾT QUẢ THỰC TẬP	2
BÀI 1: CHUẨN BỊ DỤNG CỤ - PHA CHẾ MÔI TRƯỜNG NUÔI CẤY VI SINH VẬT	3
I. MỤC ĐÍCH YÊU CẦU	3
II. VẬT LIỆU	3
III. CHUẨN BỊ DỤNG CỤ.....	3
1. Bao gói dụng cụ	3
2. Phương pháp khử trùng dụng cụ	4
IV. PHA CHẾ MÔI TRƯỜNG	6
1. Khái niệm chung.....	6
2. Các yêu cầu cơ bản của môi trường dinh dưỡng	6
3. Phương pháp làm môi trường.....	7
V. THỰC HÀNH VÀ BÁO CÁO KẾT QUẢ	11
BÀI 2: PHÂN LẬP VI SINH VẬT.....	12
I. MỤC ĐÍCH YÊU CẦU	12
II. VẬT LIỆU	12
III. KHÁI NIỆM.....	12
IV. PHƯƠNG PHÁP PHÂN LẬP VI SINH VẬT THUẦN KHIẾT	12
1. Tạo ra các khuẩn lạc riêng rẽ (từ quần thể vi sinh vật) trên các môi trường phân lập	13
2. Phân lập vi sinh vật trên môi trường đặc ở đĩa petri	13
3. Kiểm tra độ thuần khiết của giống phân lập.....	14
V. PHÂN LẬP MỘT SỐ GIỐNG VI SINH VẬT	15
1. Phân lập nấm men	15
2. Phân lập nấm mốc <i>Aspergillus oryzae</i> , <i>Aspergillus niger</i> và <i>Mucor</i>	16
3. Phân lập vi khuẩn <i>Bacillus subtilis</i>	17
4. Phân lập xạ khuẩn.....	17

VI. THỰC HÀNH VÀ BÁO CÁO KẾT QUẢ	17
BÀI 3: NUÔI CÂY, QUAN SÁT SỰ PHÁT TRIỂN CỦA VI SINH VẬT	18
I. MỤC ĐÍCH YÊU CẦU	18
II. VẬT LIỆU	18
III. PHƯƠNG PHÁP NUÔI CÂY VI SINH VẬT.....	18
1. Khái niệm	18
2. Mục đích của việc nuôi cấy	18
3. Nguyên tắc.....	18
4. Các phương pháp nuôi cấy	19
IV. CÁC ĐIỀU KIỆN NUÔI VI SINH VẬT.....	22
1. Nhiệt độ	22
2. Độ ẩm	22
3. Điều kiện hiếu khí và yếm khí:	22
V. QUAN SÁT ĐẶC TÍNH SINH LÝ CỦA VI SINH VẬT NUÔI CÂY	23
1. Quan sát đặc tính phát triển của vi sinh vật trên môi trường đặc.....	23
2. Quan sát đặc tính phát triển của vi sinh vật trong môi trường lỏng.	23
VI. THỰC HÀNH VÀ BÁO CÁO KẾT QUẢ	24
BÀI 4: ĐẾM SỐ LƯỢNG TẾ BÀO VI SINH VẬT	25
I. MỤC ĐÍCH YÊU CẦU	25
II. VẬT LIỆU	25
III. THU VÀ PHA LOÃNG MẪU.....	25
1. Thu mẫu.....	26
2. Pha loãng mẫu	26
IV. XÁC ĐỊNH SỐ LƯỢNG TẾ BÀO VI SINH VẬT.....	27
1. Xác định trực tiếp số lượng tế bào vi sinh vật bằng phòng đếm hồng cầu ...	27
2. Xác định gián tiếp số lượng tế bào bằng cách đếm số lượng các khuẩn lạc mọc trên môi trường thạch.	29
V. THỰC HÀNH VÀ BÁO CÁO KẾT QUẢ	30
BÀI 5: QUAN SÁT HÌNH THÁI VI SINH VẬT DƯỚI KÍNH HIỂN VI. 31	31
I. MỤC ĐÍCH YÊU CẦU	31
II. VẬT LIỆU	31
III. QUAN SÁT HÌNH THÁI VI SINH VẬT.....	32
1. Quan sát vi sinh vật ở trạng thái sống – làm tiêu bản tạm thời	32

2. Quan sát vi sinh vật ở trạng thái chết – làm tiêu bản cố định (tiêu bản vi sinh vật chết nhuộm màu)	34
IV. THỰC HÀNH VÀ BÁO CÁO KẾT QUẢ.....	38
TÀI LIỆU THAM KHẢO	40

TaiLieu.vn

NGUYÊN TẮC CHUNG KHI LÀM VIỆC TRONG PHÒNG THÍ NGHIỆM VI SINH VẬT

I. NGUYÊN TẮC LÀM VIỆC

Khi làm việc với vi sinh vật, sinh viên thường thao tác với số lượng rất lớn và đậm đặc tế bào vi sinh vật. Bên cạnh những loài có ích, có rất nhiều loài gây bệnh cho người, động vật, thực vật. Vì vậy, trong quá trình nghiên cứu, việc tiếp xúc thường xuyên với vi sinh vật và các vật phẩm có vi sinh vật là điều không thể tránh khỏi. Do đó, để giữ gìn sức khỏe và đạt hiệu quả cao trong công tác nghiên cứu, người làm thí nghiệm cần phải thực hiện nghiêm ngặt các quy tắc sau:

1. Phải mặc áo blouse trong thời gian thực tập tại phòng thí nghiệm.
2. Không nói chuyện, không ăn uống, không hút thuốc và không đi lại lộn xộn trong phòng thí nghiệm.
3. Khi làm việc trong phòng thí nghiệm vi sinh vật phải tuyệt đối giữ vệ sinh, tôn trọng sự ngăn nắp và trật tự của phòng thí nghiệm.
4. Tuyệt đối không để canh trường hay vật phẩm, môi trường nuôi cấy vi sinh vật gây bẩn ra bàn ghế, sách vở, quần áo hay các vật dụng khác. Trường hợp gây bẩn phải làm vệ sinh ngay.
5. Khi sử dụng các trang thiết bị, dụng cụ... phải hết sức thận trọng, tránh làm đổ vỡ và hư hỏng.
6. Khi xảy ra tai nạn hoặc sự cố, cần báo ngay với cán bộ phụ trách để có biện pháp xử lý thích hợp, kịp thời.
7. Sau khi kết thúc bài thực hành, phải vệ sinh nơi làm việc của mình, vệ sinh các dụng cụ máy móc, dụng cụ thí nghiệm và xếp vào nơi qui định. Rửa tay sạch và dùng cồn sát khuẩn trước khi rời khỏi phòng thí nghiệm.

II. MỘT SỐ LƯU Ý VỚI SINH VIÊN NHẪM ĐẠT KẾT QUẢ TỐT TRONG THỰC HÀNH VI SINH VẬT HỌC

- Trước khi vào bài thực hành:

Cần nghiên cứu kỹ mục đích – yêu cầu và nội dung toàn bộ bài hướng dẫn để hình dung được công việc sắp làm.

Hiểu thật rõ các nguyên tắc của mỗi thí nghiệm để thấy được cơ sở khoa học của việc đề ra phương pháp thực nghiệm.

Đọc thật cẩn thận cách tiến hành thí nghiệm để hiểu được tiến trình của nó.

Nếu có vấn đề gì không rõ thì phải xem lại các khái niệm, các kiến thức có liên quan với lý thuyết để làm sáng tỏ vấn đề trong bài.

- Trong giờ thực hành:

Cần có sổ ghi chép các công việc thí nghiệm ví dụ: tên thí nghiệm, đối tượng nghiên cứu, những nguyên tắc cơ bản của phương pháp, những kết quả đạt được...

Cần thực hiện đúng các thao tác và quy trình thí nghiệm để đạt được mục đích và yêu cầu đề ra.

- Sau mỗi giờ thực hành:

Phải làm đầy đủ tường trình theo phần câu hỏi và bài tập (nếu có) đã nêu cuối bài.

III. ĐÁNH GIÁ KẾT QUẢ THỰC TẬP

Kết quả cuối đợt thực tập được đánh giá dựa vào mức độ chuyên cần (hiện diện đầy đủ, nghiêm túc trong học tập), mức độ hiểu nguyên tắc, nhớ các thao tác chính của mỗi bài thực tập và mức độ thành thạo thao tác. Hai chỉ tiêu sau được đánh giá dựa vào kiểm tra viết (hoặc vấn đáp) và thực hành cuối đợt thực tập.

BÀI 1: CHUẨN BỊ DỤNG CỤ - PHA CHẾ MÔI TRƯỜNG NUÔI CẤY VI SINH VẬT

I. MỤC ĐÍCH YÊU CẦU

- Biết cách bao gói, làm nút bông, khử trùng dụng cụ bằng nồi hấp khử trùng ở áp suất cao và bằng tủ sấy.
- Nắm vững yêu cầu, nguyên tắc, các bước thực hiện pha chế và khử trùng môi trường nuôi cấy vi sinh vật.

II. VẬT LIỆU

- Ống nghiệm, bình tam giác, pipet, đĩa petri ... sạch để bao gói.
- Ống nghiệm, bình tam giác, đĩa petri để pha môi trường
- Gòn không thấm, giấy báo, thun...
- Cân các loại
- Máy đo pH hoặc giấy đo pH
- Cốc thủy tinh, thìa khuấy, phễu thủy tinh, muỗng cân hóa chất, giấy lọc
- Bếp điện, nồi đun
- Dao, kéo, giá ống nghiệm
- Agar, khoai tây, nước cất
- Xilen
- Giấy lau kính hiển vi
- Các loại hóa chất cần cho pha chế môi trường dinh dưỡng

III. CHUẨN BỊ DỤNG CỤ

1. Bao gói dụng cụ

1.1 Nguyên tắc

- Dụng cụ được bao gói để nuôi cấy vi sinh vật phải đạt độ trung tính, phải thật sạch và khô, không bị nứt mẻ.
- Việc bao gói phải thật kín và cẩn thận để dụng cụ sau khi khử trùng vẫn đảm bảo vô trùng trong lớp giấy gói và lấy ra sử dụng dễ dàng.

1.2 Phương pháp bao gói dụng cụ

Việc bao gói dụng cụ gồm hai khâu:

- Làm nút bông: đối với ống nghiệm, bình tam giác, pipet...
- Bao gói: cho hầu hết các dụng cụ thủy tinh.

1.3 Cách làm nút bông

Dùng một miếng gòn không thấm nước cuộn lại, nhét vào miệng ống nghiệm sao cho vừa đủ chặt.

Yêu cầu:

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

Cách làm nút gòn này cũng được áp dụng cho các chai lọ, bình cầu, bình tam giác... cách làm cũng tương tự như đối với ống nghiệm. Nhưng lượng gòn sử dụng phải nhiều hơn và có thể được bọc bằng một lớp vải gạc.

1.4 Cách bao gói dụng cụ

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

- Cắt các mảnh giấy hình chữ nhật với kích thước tùy theo dụng cụ cần bao gói.
- Quấn giấy quanh phần đầu của nút bông.
- Gập ống giấy sát vào nút bông ở mặt trước và hai bên.
- Gập nốt phần giấy còn lại và cài sâu vào bên trong.

Yêu cầu:

- + Phần giấy bao 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

Với các dụng cụ như pipet, đĩa petri, que gạt phải dùng giấy bao kín toàn bộ. Có thể thay giấy báo bằng 1 hộp nhôm kín đựng tất cả các dụng cụ trên để khử trùng.

2. Phương pháp khử trùng dụng cụ

Có thể khử trùng bằng một số tác nhân lý hóa như nhiệt độ, bức xạ, lọc và hóa chất. Tác nhân khử trùng được chọn tùy mục đích và vật liệu cần khử trùng.

- Các dụng cụ thủy tinh bền với nhiệt nên thường được khử trùng bằng phương pháp nhiệt khô trong tủ sấy. Các thanh gạt thủy tinh được khử trùng bằng cách đốt với cồn 70°C và các que cấy kim loại được khử trùng bằng cách đốt trực tiếp trên ngọn lửa.

- Trường hợp cần khử trùng môi trường nuôi cấy vi sinh vật, phương pháp nhiệt ẩm bằng nồi hấp áp lực (autoclave, 1atm, 121°C) thường được sử dụng để các thành

phần hữu cơ của môi trường không bị cháy, biến tính và môi trường không bị mất nước

- Trường hợp môi trường chứa các chất phân tử lượng nhỏ không bền với nhiệt như vitamin, amino acid, hoặc huyết thanh chứa các protein là nhân tố tăng trưởng, phương pháp nhiệt ẩm có thể làm biến tính các thành phần này nên thường được khử trùng riêng bằng phương pháp lọc qua màng.

2.1 Khử trùng dụng cụ, môi trường bằng nồi hấp áp lực

Phương pháp này thực hiện trong nồi hấp vô trùng ở áp suất cao. Là thiết bị làm bằng kim loại, chịu được nhiệt độ và áp suất cao, có khả năng tự động điều chỉnh áp suất và thời gian khử trùng theo yêu cầu của người sử dụng.

- Nguyên tắc hoạt động

Làm gia tăng nhiệt độ bằng hơi nước bão hòa dưới một áp suất lớn hơn áp suất bình thường của khí quyển. Khi áp suất hơi nước tăng lên thì nhiệt độ cũng tăng theo nhờ hệ thống van rất chặt chẽ.

Mối quan hệ giữa áp suất ghi trên áp kế với nhiệt độ trong nồi biểu hiện qua bảng sau đây:

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

Phương pháp khử trùng bằng nhiệt ẩm cho phép diệt cả tế bào dinh dưỡng lẫn bào tử của vi sinh vật.

- Trình tự các bước sử dụng nồi hấp áp lực như sau

- + Bổ sung nước ở đáy nồi đến vạch quy định
- + Xếp dụng cụ và vật liệu cần khử trùng vào giá đặt bên trong nồi hấp, không nên xếp quá chặt để hơi nước lưu thông dễ dàng
- + Đóng kín nắp nồi hấp. Trường hợp nắp có nhiều ốc vặn, cần vặn ốc theo từng cặp đối xứng nhau.
- + Mở van thông hơi giữa 2 nồi (trường hợp nồi hấp 2 lớp)
- + Bật công tắc, đun nồi hấp.
- + Khi nhiệt độ lên đến 80°C hoặc 0,5 atm, mở từ từ van xả để đuổi hết không khí ra khỏi nồi trong vòng 3 – 5 phút cho đến khi luồng hơi nước thoát ra liên tục, đóng van lại.

- + Khi áp suất lên đến mức cần thiết thì bắt đầu tính thời gian khử trùng.
- + Khi đủ thời gian khử trùng, tắt điện, chờ nhiệt độ và áp suất hạ xuống giá trị 0 mới được mở nắp để tránh gây ra tai nạn hoặc tránh áp suất thay đổi đột ngột làm hư môi trường.

Một số nồi hấp hiện đại có thể tự kiểm soát thời gian, áp suất và tự đuổi khí ra khỏi nồi, cho phép bỏ qua một số thao tác tương ứng ở phần trên.

Chú ý: để đảm bảo an toàn và hiệu quả của việc hấp khử trùng, ngoài việc thận trọng thực hiện đúng qui trình đã chỉ dẫn, người làm thí nghiệm cần phải

- + Kiểm tra mực nước và bổ sung lượng nước cần thiết trước khi sử dụng.
- + Với nắp nồi có nhiều ốc vặn, cần phải xiết ốc theo từng cặp đối xứng để đảm bảo độ kín, tránh làm nắp nồi bị chênh hoặc hư vòng đệm cao su.
- + Tuyệt đối không mở nắp nồi khi kim chỉ nhiệt độ và áp suất chưa trở về 0.
- + Trực tiếp theo dõi quá trình hấp khử trùng cho đến khi kết thúc và ngắt điện.

Các bình tam giác, chai lọ, ống nghiệm chứa môi trường trước khi được khử trùng bằng phương pháp nhiệt ẩm cần được đậy chặt nhưng đảm bảo cho phép không khí và hơi nước thông qua.

Thông thường, các hộp petri hoặc nút bông còn được bao gói bằng giấy hoặc giấy nhôm để tránh nguy cơ bị nhiễm sau khi khử trùng. Sau khi hấp các hộp petri cần được sấy khô trước khi dùng.

2.2 Khử trùng dụng cụ thủy tinh bằng phương pháp nhiệt khô

Các hộp petri, ống hút thủy tinh bền với nhiệt có thể được khử trùng bằng phương pháp sấy ở 170°C trong 2 giờ trong tủ sấy. Trong trường hợp này, các ống hút cần được nhét nút bông không thấm nước ở đầu hút. Hộp petri, ống hút, các dụng cụ cần khử trùng khác được gói kín bằng giấy hoặc giấy nhôm trước khi sấy.

IV. PHA CHẾ MÔI TRƯỜNG

1. Khái niệm chung

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

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

Bất kỳ một môi trường dinh dưỡng nào để nuôi cấy vi sinh vật cũng cần đạt được các yêu cầu cơ bản sau đây:

- Có đủ chất dinh dưỡng cần thiết
- Có độ pH thích hợp
- Có độ nhớt nhất định