

**ỦY BAN NHÂN DÂN TỈNH ĐỒNG THÁP
TRƯỜNG CAO ĐẲNG CỘNG ĐỒNG ĐỒNG THÁP**



GIÁO TRÌNH

**MÔN HỌC: VINH SINH ĐẠI CƯƠNG
NGÀNH, NGHỀ: KHOA HỌC CÂY TRỒNG
TRÌNH ĐỘ: CAO ĐẲNG**

*(Ban hành kèm theo Quyết định Số: /QĐ-CD-ĐT ngày... tháng... năm
2017 của Hiệu trưởng Trường Cao đẳng Cộng đồng Đồng Tháp)*

Đồng Tháp, năm 2017

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.

Tailieu.vn

LỜI GIỚI THIỆU

Xuất phát từ nhu cầu thực tế của môn học vi sinh đại cương, chúng tôi biên soạn bài giảng này, với mong muốn giúp cho các đối tượng sinh viên cao đẳng năm thứ hai Khoa nông nghiệp thủy sản thực hành được một số kỹ thuật cơ bản về vi sinh học để hiểu sâu những nội dung đã được học trong phần lý thuyết.

Lần đầu tiên biên soạn bài giảng thực hành phù hợp với điều kiện cơ sở vật chất của nhà trường, phù hợp với yêu cầu thực tế và phù hợp với trình độ của sinh viên, chúng tôi không sao tránh khỏi những thiếu sót, do đó nhóm tác giả rất mong nhận được sự đóng góp ý kiến chân thành của các chuyên gia và của sinh viên, để lần tái bản sau sẽ sửa chữa bổ sung nội dung theo hướng cập nhật hóa, hiện đại hóa và thực tiễn tại Việt Nam.

Đây là cuốn giáo trình được biên soạn công phu, nhưng chắc chắn không tránh khỏi những thiếu sót. Vì vậy chúng tôi rất mong nhận được sự đóng góp ý kiến của đồng nghiệp và các độc giả.

Xin chân thành cảm ơn.

Đồng Tháp, ngày 26 tháng 5 năm 2017

Chủ biên

Tăng Thị Thanh Hương

MỤC LỤC

Trang

Bài 1. Các yêu cầu cơ bản và cách sử dụng các thiết bị trong phòng kiểm nghiệm vi sinh vật.....	1
Bài 2. Môi trường nuôi cấy và các nguồn vi sinh vật	9
Bài 3. Quan sát vi sinh vật	16
Bài 4. Kỹ thuật gieo cấy và phân lập vi khuẩn thuần khiết.....	20
Bài 5. các phương pháp nhuộm vi khuẩn	28
Bài 6. Phương pháp đếm số lượng tế bào vi sinh vật	35
TÀI LIỆU THAM KHẢO	43

GIÁO TRÌNH MÔN HỌC

Tên môn học: VI SINH ĐẠI CƯƠNG

Mã môn học: CNN241

Vị trí, tính chất, ý nghĩa và vai trò của môn học:

- Vị trí: Vi sinh đại cương là môn học kỹ năng chuyên ngành bắt buộc, được bố trí sau khi người học đã học xong chương trình các môn học chung và các môn học cơ sở.

- Tính chất: đây là một trong những môn học kỹ năng quan trọng, giúp sinh viên hiểu về các hoạt động Vi sinh đại cương và các kỹ năng cần thiết trong hoạt động khuyến nông.

Ý nghĩa và vai trò: Giáo trình này cung cấp cho sinh viên những kiến thức cơ bản nhất về nông Khuyến nông, kỹ thuật tổ chức và quản lý các chương trình Vi sinh đại cương nhằm giúp sinh viên sau khi ra trường có thể nắm được các kỹ năng cần thiết để xây dựng và quản lý chương trình Vi sinh đại cương một cách hiệu quả nhất

Mục tiêu của môn học:

- Về kiến thức:

- + Hiểu được Vi sinh đại cương là gì, các hoạt động của vi sinh đại cương
- + Biết được phương pháp tiếp xúc với nông dân như thế nào để nông dân có cảm tình và đạt hiệu quả cao trong công việc
- + Biết các nguyên tắc thuyết phục nông dân hành động và biết cách tổ chức những buổi tập huấn, hội họp
- + Nắm bắt được các cách thiết kế bài giảng, áp phích, bảng lật, tờ bướm.

- Về kỹ năng:

- + Thực hiện các nguyên tắc để lấy thiện cảm với nông dân
- + Xây dựng được bài thuyết trình và thực hiện thuyết trình trước nông dân đạt hiệu quả tốt
- + Thực hiện tổ chức những buổi hội thảo, tập huấn cho nông dân
- + Thiết kế được các bảng lật, bài báo cáo sinh động, dễ hiểu.

- Về năng lực tự chủ và trách nhiệm:

- + Rèn luyện tính cẩn thận, ham học hỏi.

+ Làm việc độc lập hoặc làm việc theo nhóm, giải quyết công việc, vấn đề phức tạp trong điều kiện làm việc thay đổi, chịu trách nhiệm cá nhân và trách nhiệm đối với nhóm.

Nội dung của mô đun:

Số TT	Tên bài, mục	Thời gian (giờ)			
		Tổng số	Lý thuyết	Thực hành, thí nghiệm, thảo luận, bài tập	Kiểm tra
1	Chương 1: Các yêu cầu cơ bản và cách sử dụng các thiết bị trong phòng thí nghiệm vi sinh vật	1	1		
2	Chương 2: Môi Trường Nuôi cấy và Các Nguồn Vi Sinh Vật	1	1		
3	Chương 3: Quan Sát Vĩnh Vật	2	2		
4	Chương 4: Kỹ Thuật Gieo Và Phân Lập Vi Khuẩn Thuần Khiết	12	4	8	
5	Kiểm tra	1			1
6	Chương 5: Phương Pháp Nhuộm Vi Khuẩn	15	3	12	
7	Chương 6: Phương pháp Điểm Số Lượng Tế bào Vi Sinh Vật	11	3	8	
8	Ôn thi	1			1
9	Thi/kiểm tra kết thúc môn học	1			1
Cộng		45	14	28	3

Chương 1

CÁC YÊU CẦU CƠ BẢN VÀ CÁCH SỬ DỤNG CÁC THIẾT BỊ TRONG PHÒNG KIỂM NGHIỆM VI SINH VẬT

Vi sinh vật được phân bố rộng rãi trong tự nhiên, vì vậy khi nuôi cấy một loại vi sinh vật nào đó để phục vụ cho nghiên cứu thì rất dễ bị tạp nhiễm, do đó khi xây dựng phòng thí nghiệm cần chú ý địa điểm, vị trí, hướng gió và cách phân bố từng khu vực trong phòng làm việc để bố trí các dụng cụ, thiết bị nhằm tránh tạp nhiễm khi nuôi cấy.

Thiết bị cơ bản nhất để quan sát vi sinh vật là kính hiển vi, bởi vì kích thước tế bào vi sinh vật rất nhỏ, mắt thường không thể thấy được. Muốn quan sát hình thái, cấu tạo... của vi sinh vật ta phải sử dụng nó. Kính hiển vi là dụng cụ quang học giúp phóng đại mẫu vật lên gấp nhiều lần và chúng ta có thể quan sát ảnh của chúng được rõ.

1.1 Mục đích-yêu cầu

- Giúp sinh viên biết những quy tắc an toàn vi sinh vật trong phòng thí nghiệm
- Biết sát trùng dụng cụ thực hành và phòng thí nghiệm vi sinh
- Biết cấu tạo và cách sử dụng các thiết bị trong phòng thí nghiệm, đặc biệt là cách bảo quản kính hiển vi.

1.2 Dụng cụ và thiết bị

- Tủ cấy vi sinh vật
- Tủ ủ ấm
- Tủ khử trùng nhiệt khô
- Nồi khử trùng nhiệt ướt (Autoclave)
- Các dụng cụ thủy tinh: đĩa petri, ống nghiệm, bình tam giác, bình cầu, ống đong, đĩa thủy tinh, đĩa đồng hồ, que trang...
- Kính hiển vi quang học (Olympus)
- Nhiệt kế, pH kế
- Máy lắc (Vortex)
- Dầu cèdre

1.3 Các quy tắc an toàn trong phòng kiểm nghiệm

1. Các yêu cầu về phòng kiểm nghiệm

- Phòng kiểm nghiệm phải được xây dựng nơi cao ráo, thoáng mát, tránh nơi cộng cộng. Trong phòng phải phân biệt thành từng khu vực riêng biệt như: thu và lưu mẫu, rửa dụng cụ, khử trùng dụng cụ, bảo quản hóa chất, nuôi cấy mẫu...

- Cửa luôn đóng để làm giảm thiểu sự dịch chuyển không khí, ngăn ngừa bụi làm giảm ngoại nhiễm.

- Máy điều hòa không khí để kiểm soát độ ẩm, nhiệt độ

- Khử trùng phòng bằng formol 37%

2. Các quy tắc an toàn trong phòng kiểm nghiệm vi sinh

Cần tuân thủ một số quy tắc an toàn để đảm bảo an toàn cho bản thân và cho những người khác trong phòng thí nghiệm:

- Không ăn uống, hút thuốc trong phòng

- Mặc áo blouse, mang găng tay và mang khẩu trang trong thời gian làm việc với vi sinh vật

- Khử trùng mặt bàn bằng cồn 70°C lau bằng giấy thấm và khử trùng tay bằng cồn 70°C hoặc dung dịch diệt khuẩn khác.

- Cần ghi chú tên chủng, ngày tháng thí nghiệm, người cấy lên tất cả các hộp petri, ống nghiệm, bình nuôi cấy.

- Sử dụng quả bóp cao su khi thao tác ống hút định lượng, (không hút bằng miệng)

- Tách riêng chất thải rắn và chất thải lỏng nhiễm vi sinh vật và hấp khử trùng trước khi bỏ vào các bãi rác.

- Gói hoặc ràng bằng băng keo khi đặt chồng các hộp đĩa petri.

- Khi đốt que cấy có dính sinh khối vi sinh vật, cần đặt đầu que cấy chìm vào ngọn lửa để tránh sự văng nhiễm vi sinh vật vào không khí.

- Rửa dụng cụ bằng xà bông nước để khử trùng.

- Sát trùng và rửa tay sạch sẽ trước khi rời khỏi phòng thí nghiệm.

1.4 Một số thiết bị thường dùng

1. Tủ cấy vi sinh vật

a. Công dụng: tủ cấy là thiết bị bảo đảm ở buồng cấy không có vi sinh vật, ta có thể dùng môi trường vô trùng và mẫu vật định cấy đưa vào để nhân giống hoặc cấy chuyển (trong điều kiện vô trùng)

b. Cấu tạo: tủ cấy 1 người hoặc tủ cấy 2 người được che kín bên trên nóc, phía trong có cấu tạo gồm:

- Quạt gió và lưới lọc bên trên, khi mở điện quạt gió luôn thổi ra làm cho không khí bên ngoài không tràn vào được, hệ thống lưới lọc ngăn cản bụi bẩn
- Hệ thống đèn cực tím để khử trùng mặt bàn và buồng cấy
- Đèn chiếu sáng để tạo đủ ánh sáng cho buồng cấy
- Công tắc ở bên phải tủ cấy

c. Cách sử dụng

Tủ cấy luôn đặt ở vị trí tránh gió lùa, hạn chế người qua lại, thường ở phòng kín. Trước khi sử dụng phải khử trùng tủ bằng cách dùng bình xịt tay có chứa cồn 70°C để xịt xung quanh bên trong, ngoài cánh tủ và bàn cấy rồi dùng giấy thấm lau khô. Mở điện, đèn cực tím, đèn chiếu sáng và đóng kín cửa tủ, đèn cực tím bật lên, đèn chiếu sáng tự động tắt, sau 30 phút khử trùng, mới có thể đưa mẫu vật vào cấy.

Khi mở cửa tủ, đèn cực tím tự động tắt và đèn chiếu sáng sẽ bật lên, lúc đó buồng cấy đã sẵn sàng cấy.

Sau khi sử dụng xong, ta tắt tất cả các đèn và tủ rồi đóng kín cửa để hạn chế vi sinh vật lạ

2. Tủ ủ (incubator)

a. Công dụng

Tủ ủ là thiết bị tạo nhiệt độ cần thiết để nuôi cấy vi sinh vật, nhiệt độ có thể thay đổi từ 25 – 60°C

b. Cấu tạo: tủ ủ có cấu tạo đơn giản, gồm có vỏ và điện trở

- Vỏ tủ ủ cấu tạo gồm 2 lớp, ở giữa có đệm một lớp cách nhiệt
- Điện trở để cung cấp nhiệt làm nóng bầu không khí trong tủ và có một bộ phận điều chỉnh nhiệt độ tự động (rò le) để giữ nhiệt độ cố định theo yêu cầu thí nghiệm.

c. Cách sử dụng

Bật công tắc, xoay nút điều chỉnh nhiệt độ mong muốn, theo dõi nhiệt độ trên nhiệt kế cho đến khi ổn định theo nhiệt độ đã điều chỉnh.

3. Tủ khử trùng nhiệt khô (dry-air sterilizer)

a. Công dụng

Tủ khử trùng nhiệt khô dùng để khử trùng các vật dụng không bị nhiệt độ phá hủy như thủy tinh, kim loại. Nhiệt khô có thể thay đổi từ 70-200°C.

b. Cấu tạo

Tủ khử trùng nhiệt khô có cấu tạo giống như tủ ủ nhưng cấu tạo 2 lớp vỏ chắc chắn hơn, điện trở có công suất cao để đưa nhiệt độ lên cao.

c. Cách sử dụng

Sau khi rửa sạch dụng cụ cần khử trùng nhiệt khô, để khô, gói lại bằng giấy không thấm nước, cho vào tủ. Mở điện, xoay nút điều chỉnh nhiệt độ và theo dõi nhiệt kế đến khi nhiệt độ đạt mức mong muốn, bắt đầu tính giờ khử trùng. Thời gian khử trùng thay đổi từ 1-3 giờ (tùy theo số lượng và kích thước của vật dụng cần khử trùng) tính từ khi nhiệt độ lên đến 170°C. Khi đã đủ thời gian khử trùng cần thiết, tắt điện và chờ nhiệt độ hạ xuống từ từ đến 40°C - 45°C thì mở tủ lấy vật dụng khử trùng ra.

4. Nồi khử trùng nhiệt ướt (autoclave)

a. Công dụng

Nồi khử trùng nhiệt ướt là thiết bị dùng hơi nước ở nhiệt độ cao (121°C) bằng cách nâng áp suất trong nồi lên (1kgf/cm²) để khử trùng các vật dụng hoặc môi trường để nuôi cấy vi sinh vật.

b. Cấu tạo

Nồi khử trùng nhiệt ướt được cấu tạo bằng kim loại, chắc chắn, dày, có 2 lớp vỏ và có khả năng chịu được áp suất cao. Khí trong nồi là buồng khử trùng (nơi chứa các vật dụng cần khử trùng), buồng khử trùng có lắp van thoát không khí, áp kế, nhiệt kế để đo áp suất, nhiệt độ hơi nước và van bảo hiểm để xì hơi khi áp suất vượt quá mức an toàn và đảm bảo nồi không bị nổ. Nước cất hoặc được đổ vào bên dưới nồi, hơi nước từ khoang chứa được cung cấp cho buồng khử trùng. Phía trên nồi khử trùng có 1 nắp nặng được khóa chắc chắn bằng các nút vặn khít với buồng khử trùng bằng vòng đệm cao su.

c. Cách sử dụng

Cho vật dụng cần khử trùng vào buồng khử trùng, đổ nước sạch hoặc (nước cất 1 lần) vào khoang chứa nước, đẩy nắp khoang chứa nước rồi cho các vật dụng cần khử trùng vào và đẩy nắp nồi, khóa kín để không cho không khí hay hơi nước thoát ra ngoài. Mở điện, điện trở bên dưới nồi sẽ cung cấp nhiệt làm sôi nước trong khoang chứa tạo ra hơi nước làm cho áp suất trong khoang tăng lên.