

TRƯỜNG CAO ĐẲNG LƯƠNG THỰC THỰC PHẨM
KHOA CÔNG NGHỆ SINH HỌC
BỘ MÔN CÔNG NGHỆ VI SINH

BÀI THỰC HÀNH

VI SINH VẬT HỌC

NGÀNH: CÔNG NGHỆ SINH HỌC

Trình độ: Cao đẳng

Tổng số giờ thực hành: 30 giờ

Năm 2015

Bài 1

KHỬ TRÙNG DỤNG CỤ VÀ PHA CHẾ HÓA CHẤT TRONG NUÔI CẤY NẤM MEN

Mục tiêu: Sau khi học xong bài này, sinh viên có khả năng:

- Nêu được những nội qui phòng thí nghiệm vi sinh vật;
- Trình bày được quy trình tiến hành xử lý và bao gói các loại dụng cụ nuôi cấy vi sinh vật;
- Trình bày được phương pháp và chế độ khử trùng dụng cụ nuôi cấy vi sinh vật;
- Vận hành được tủ sấy để khử trùng các dụng cụ.
- Tiến hành các thao tác xử lý và bao gói các loại dụng cụ theo đúng trình tự và yêu cầu kỹ thuật;
- Tuân thủ nội qui của phòng thí nghiệm và có ý thức bảo vệ thiết bị.

Thời gian thực hành: 5 giờ

Nhóm thực hành: 15 - 20 học sinh/sinh viên

Địa điểm thực hành: Phòng thí nghiệm Công nghệ vi sinh

Nội dung bài thực hành:

1. Nội qui phòng thí nghiệm

Người làm thí nghiệm trong phòng thí nghiệm vi sinh cần phải tuân thủ các qui tắc cơ bản sau đây:

- + Phải chuẩn bị cho mỗi buổi thí nghiệm bằng cách đọc bài kỹ và làm quen với các qui tắc và phương pháp có liên quan đến bài thí nghiệm.
- + Không ăn, uống, hút thuốc, nói chuyện ồn ào khi đang tiến hành thí nghiệm.
- + Phải luôn mặc áo blouse trong phòng thí nghiệm, tuyệt đối không để môi trường hay vật phẩm có vi sinh vật dính lên quần áo, giấy tờ và dụng cụ cá nhân. Đồng thời cũng phải chú ý bảo vệ da và quần áo khỏi bị dính hoá chất và thuốc nhuộm.
- + Chỉ đem những đồ vật cho phép vào phòng thí nghiệm, như tài liệu hướng dẫn thực hành, sổ sách ghi chép, và các vật liệu thí nghiệm khác. Tất cả các thứ khác như áo khoác, túi xách,...phải đặt đúng nơi qui định, cách xa nơi làm thí nghiệm.
- + Trước lúc bắt đầu làm thí nghiệm, phải sát trùng bề mặt bàn thí nghiệm bằng các hoá chất sát trùng đã chuẩn bị sẵn và lau khô bằng giấy vệ sinh. Lặp lại công việc này lần nữa sau khi đã hoàn thành thí nghiệm.

+ Tất cả các vật liệu và hoá chất thí nghiệm ngoài tên vật liệu, hoá chất còn phải ghi chính xác tên người làm thí nghiệm, tên lớp học và ngày làm thí nghiệm, để tránh nhầm lẫn khi sử dụng và vứt bỏ vật liệu, hoá chất.

+ Chú ý, phải hết sức thận trọng để không làm đổ vỡ, hư hỏng các trang thiết bị và dụng cụ.

+ Phải chú ý cẩn thận khi sử dụng đèn cồn. Không được đốt đèn cồn khi không sử dụng. Thao tác cẩn thận tránh làm bỏng tay và gây hỏa hoạn.

+ Tất cả các vật liệu bị nhiễm bẩn cần phải được khử trùng trước khi vứt bỏ hoặc sử dụng lại. Các vật liệu cần khử trùng cần phải đặt đúng nơi qui định.

+ Phòng thí nghiệm phải vệ sinh sạch sẽ trước và sau khi kết thúc thí nghiệm như lau chùi sàn nhà, tường, bàn ghế, tủ cấy... Có thể dùng các loại hoá chất sát trùng như chlorine 3%...

+ Khi kết thúc thí nghiệm, cần phải vệ sinh các thiết bị, dụng cụ đã sử dụng theo đúng qui trình và sắp xếp chúng vào đúng nơi qui định.

+ Sau mỗi lần làm thí nghiệm, phải rửa tay sạch sẽ trước khi rời phòng thí nghiệm.

+ Trong trường hợp nếu có tai nạn hay bị thương, lập tức báo cho cán bộ phòng thí nghiệm để có thể chữa chạy kịp thời.

2. Chuẩn bị dụng cụ trong nuôi cấy vi sinh vật

2.1. Nguyên tắc chung

- Các loại dụng cụ dùng để nuôi cấy vi sinh vật phải đạt độ trung tính, thật sạch và trong, không bị nứt mẻ.

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

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

- Sau khi khử trùng cần phải đảm bảo sự vô trùng tuyệt đối cho các dụng cụ.

2.2. Hoá chất và dụng cụ

*** Hoá chất**

- Dung dịch sulfuricromate

- Cồn 90⁰

- Xà phòng

- Chlorine 3%

*** Dụng cụ**

- Ống nghiệm

- Pipet (1 - 10 - 20 ml)

- Đũa thủy tinh

- Cối, chày sứ

- Đĩa petri

- Bình tam giác (100 - 250 - 500 ml)

- Que cấy vòng

- Que cấy trang

- Cốc thuỷ tinh
- Bóp cao su
- Bông không thấm nước
- Rổ nhựa
- Phễu thuỷ tinh
- Ống đông
- Giấy báo
- Dao nhỏ

2.3. Phương pháp rửa dụng cụ

* Ống nghiệm

- Đối với các ống nghiệm cũ đã bị nhiễm khuẩn:
 - + Khử trùng ở 121°C trong 15 phút.
 - + Lấy ra và đổ các vật phẩm trong ống nghiệm đi.
 - + Ngâm ống nghiệm vào nước ấm.
 - + Rửa ống nghiệm
 - + Sấy khô trong tủ ấm ở $40 - 50^{\circ}\text{C}$.
- Đối với các ống nghiệm không nhiễm khuẩn hay chứa các vi khuẩn không gây bệnh: không phải hấp khử trùng và tiến hành rửa như trên.

* Đĩa petri

- Đặt ngửa đĩa petri trong lòng bàn tay trái.
- Tay phải dùng giẻ chấm xà phòng xát vào hai mặt của đĩa, các khe ở chân đĩa và thành đĩa.
- Rửa nước 2 - 3 lần.
- Úp nghiêng các đĩa trong rổ nhựa cho thật khô.
- Sấy khô trong tủ ấm ở $40 - 50^{\circ}\text{C}$.

* Pipet

- Dùng que hoặc dây thép nhỏ rút nút bông ở đầu lớn pipet ra.
- Khử trùng ở 121°C trong 15 phút.
- Ngâm vào dung dịch sulfurbicromate trong 24 giờ.
- Xát kỹ hai đầu và phần ngoài pipet bằng giẻ với nước xà phòng.
- Dùng nước xả ngược để thông cặn pipet.
- Cắm pipet trên giá, đầu nhọn để lên trên.

* Phiến kính

- Đối với phiến kính cũ (đã dùng làm tiêu bản)
 - + Làm sạch mỡ hay vaseline trên phiến kính bằng cách ngâm trong dung dịch sulfurbicromate trong 48 giờ.
 - + Ngâm phiến kính vào nước xà phòng và đun sôi trong 1 giờ.
 - + Rửa nước, để ráo.
 - + Ngâm phiến kính vào cồn 90° trong 2 giờ.
 - + Lau khô chúng bằng vải mịn rồi sấy khô.
- Đối với phiến kính mới: cần kiểm tra độ pH và xử lý để đạt độ trung tính.

* **Các dụng cụ thủy tinh khác:** gồm phễu, chai, lọ, cối sứ, bình tam giác...

- Dùng giẻ với nước xà phòng đặc lắc kỹ để rửa phần trong dụng cụ.
- Rửa nước nhiều lần cho thật sạch và để ráo.

* **Nút và ống cao su**

- Phân loại các dụng cụ này theo kích thước to, nhỏ, tốt, xấu, sạch hay bẩn.

- Ngâm từng loại riêng vào nước ấm ($50 - 80^{\circ}\text{C}$) trong 3 - 4 giờ.
- Rửa nước nhiều lần.
- Phơi nắng 2 - 3 giờ rồi cất đi dùng dần.

2.4. Phương pháp bao gói dụng cụ

Việc bao gói dụng cụ gồm hai khâu:

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

* **Cách làm nút bông**

- Đối với các ống nghiệm:
 - + Lấy một miếng bông không thấm nước cuộn lại.
 - + Dùng khúc tre ấn vào đoạn giữa cuộn bông.

Yêu cầu:

- + Nút có kích thước, độ chặt vừa phải.
- + Đầu nút tròn, phần ngoài lớn hơn phần trong ống nghiệm.
- + Lấy nút ra hay đóng vào dễ dàng.
- Đối với các bình tam giác, chai, lọ có kích thước lớn: cách làm tương tự nhưng lượng bông sử dụng phải nhiều hơn.
- Đối với các pipet: dùng một sợi dây thép nhỏ nhét một ít bông vào đầu lớn của pipet.

* **Cách bao gói dụng cụ**

- Đối 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, đảm bảo điều kiện vô trùng tốt hơn. Cách làm như sau:

- + Cắt các băng giấy hình chữ nhật với kích thước tùy theo dụng cụ cần bao gói.
- + Quấn băng giấy quanh đầu có 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 trong.

Yêu cầu:

- + Phần giấy bao ngoài phải chặt kín.
- + Bao bằng giấy dầu với dụng hấp ướt.
- + Bao bằng giấy báo với dụng cụ sấy khô khi khử trùng.

- Đối với các dụng cụ như: pipet, đĩa petri, que gạt,...phải dùng giấy bao kín toàn bộ.

2.5. Phương pháp khử trùng

Thường sử dụng phương pháp khử trùng bằng sức nóng khô (khử trùng bằng tủ sấy).

Cách tiến hành:

- Các dụng cụ khử trùng cần được bao gói cẩn thận và xếp vào tủ sấy.
- Bật công tắc điện để tủ hoạt động.
- Điều chỉnh nhiệt độ và thời gian khử trùng theo yêu cầu (165 - 170⁰C trong 1,5 - 2 giờ).
- Nhiệt độ và thời gian mong muốn sẽ được duy trì nhờ bộ phận điều khiển tự động.
- Tắt tủ sấy, để nguội tới 60⁰C mới mở tủ lấy dụng cụ ra. Tránh mở tủ lấy dụng cụ khi nhiệt độ tủ còn cao sẽ làm dụng cụ thuỷ tinh dễ bị nứt vỡ.
- Các dụng cụ sau khi sấy mà giấy bao có màu hơi vàng là đạt yêu cầu.

Bài 2

PHA CHẾ MÔI TRƯỜNG PHÂN LẬP, TUYỂN CHỌN GIỐNG NẤM MEN

Mục tiêu: Sau khi học xong bài này, sinh viên có khả năng:

- Trình bày được quy trình tiến hành pha chế môi trường dinh dưỡng nuôi cấy nấm men;
- Trình bày được phương pháp khử trùng môi trường bằng áp suất cao trong nồi hấp (Autoclave);
- Tiến hành các thao tác pha chế môi trường dinh dưỡng theo đúng trình tự và yêu cầu kỹ thuật;
- Vận hành được nồi hấp để khử trùng môi trường dinh dưỡng;
- Tuân thủ nội quy của phòng thí nghiệm, đảm bảo an toàn và vô trùng.

Thời gian thực hành: 5 giờ

Nhóm thực hành: 15 - 20 học sinh/sinh viên

Địa điểm thực hành: Phòng thí nghiệm

Nội dung bài thực hành:

1. Nguyên liệu, hoá chất và dụng cụ

* *Nguyên liệu, hoá chất*

- | | |
|----------------------------|---|
| - Glucose | - Pepton |
| - KH_2PO_4 | - $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ |
| - Agar | |

* *Dụng cụ, thiết bị*

- Các dụng cụ thủy tinh, kim loại,... đã chuẩn bị ở bài 1.
- Tủ cấy vô trùng
- Nồi hấp áp lực (Autoclave)
- Cân kỹ thuật, cân phân tích
- Lò vi sóng

2. Môi trường phân lập

2.1. Thành phần môi trường

Môi trường Hansen có thành phần như sau:

- | | |
|---|-----------|
| - Glucose | : 50 g/l |
| - Pepton | : 10 g/l |
| - KH_2PO_4 | : 3g/l |
| - $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | : 2g/l |
| - Agar | : 20 g |
| - Nước cất | : 1000 ml |

pH = 5,6

2.2. Nguyên tắc của việc pha chế môi trường

- Dựa trên cơ sở nhu cầu về các chất dinh dưỡng và khả năng đồng hoá các chất dinh dưỡng của từng loại sinh vật.

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

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

2.3. Các bước pha chế môi trường dinh dưỡng

- Cân, đóng thật chính xác từng thành phần môi trường theo công thức

- Hoà tan các chất vào nước

- Đun sôi hỗn hợp môi trường

- Điều chỉnh pH môi trường:

- + Muốn điều chỉnh pH của môi trường người ta dùng HCl 10 % hay NaCl 10 %. Ngoài ra có thể dùng một số hoá chất khác như: H_3PO_4 , H_2SO_4 , KOH, $NaHCO_3$, Na_2CO_3 ,....

- + Muốn kiểm tra pH của môi trường ta nên dùng máy đo pH (pH - metre). Phương pháp này nhanh nhạy và cho độ chính xác cao. Trong phòng thí nghiệm có thể dùng chỉ thị màu xanh bromotomol hay giấy quỳ để đo pH. Phương pháp này tiện lợi, nhanh nhưng không cho độ chính xác cao.

- Phân phối môi trường vào dụng cụ:

- + Môi trường cần được đun cho hoá chất lỏng rồi đổ qua phễu thủy tinh vào các dụng cụ

- + Tay trái giữ dụng cụ chứa môi trường

- + Tay phải kẹp nút bông và kéo ra

- + Nhanh tay rót môi trường vào dụng cụ và đập nút bông lại

- * *Chú ý:*

- Đối với ống nghiệm: Nếu dùng môi trường làm thạch nghiêng thì lượng môi trường cần được phân phối chiếm 1/4 thể tích của ống nghiệm. Nếu làm thạch đứng thì lượng môi trường cần được phân phối từ 1/2 - 1/3 thể tích ống nghiệm.

- Đối với bình tam giác, lượng môi trường được phân phối chiếm 1/2 - 1/3 thể tích của bình.

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

3. Chuẩn bị nước cất để pha loãng mẫu thí nghiệm

Hút chính xác vào các ống nghiệm đã vô trùng mỗi ống 9 ml nước cất. Đậy chặt bằng nút bông không thấm nước. Dùng ống đong loại 100 ml hoặc

pipet loại 20 ml cho vào bình tam giác (loại 250 ml) có nút bông đã vô trùng mỗi bình 99 ml nước cất.

4. Khử trùng môi trường, làm thạch nghiêng và thạch đĩa

- Tất cả các ống nghiệm chứa môi trường, nước cất và các bình tam giác chứa môi trường được đem khử trùng trong nồi hấp áp lực (Autoclave) ở nhiệt độ 120°C trong 25 phút. Lấy ra để nguội các ống nghiệm, bình tam giác chứa nước cất, sau đó đưa vào tủ lạnh hoặc tủ vô trùng bảo quản để sử dụng cho các bài tiếp theo.

- Các ống nghiệm chứa môi trường đặc thì được làm thạch nghiêng để cấy chuyển vào bảo quản giống.

** Cách làm thạch nghiêng:*

+ Các ống nghiệm sau khi khử trùng xong được đặt ở tư thế nghiêng góc sao cho mặt nghiêng và phần thạch sâu đạt yêu cầu.

+ Để yên cho đến khi môi trường đông đặc lại. Bề mặt thạch nghiêng phải bằng phẳng, không gồ ghề, nhẵn và liên tục.

** Cách làm thạch đĩa:*

- Phân phối môi trường vào đĩa petri bằng cách rót trực tiếp môi trường từ bình tam giác ra đĩa, thường rót vừa tráng mặt đĩa là đủ. Lưu ý nắp đĩa petri chỉ được mở một phần khi cho môi trường vào đĩa để hạn chế nhiễm tạp khuẩn.

- Đậy nắp lại, xoay đĩa theo chiều kim đồng hồ một cách nhẹ nhàng để tránh môi trường văng lên thành và nắp đĩa.

- Để yên cho đến khi môi trường nguội và đông đặc lại.

- Các đĩa petri đem bao gói lại, lật ngược và bảo quản trong tủ vô trùng.

** Yêu cầu:*

- Việc phân phối môi trường vào đĩa petri phải được thực hiện trong tủ cấy vô trùng. Đĩa petri phải hoàn toàn vô khuẩn.

- Thao tác rót môi trường phải hết sức khắt khe và khéo léo để hạn chế sự nhiễm khuẩn.

Bài 3

PHÂN LẬP VÀ TUYỂN CHỌN GIỐNG NẤM MEN

Mục tiêu: Sau khi học xong bài này, sinh viên có khả năng:

- Trình bày được quy trình phân lập giống vi sinh vật thuần khiết;
- Mô tả được phương pháp pha loãng mẫu theo dãy thập phân;
- Trình bày được quy trình tiến hành tạo khuẩn lạc đơn bằng kỹ thuật hộp trải, hộp đổ và hộp ria;
- Nêu được các tiêu chí tuyển chọn khuẩn lạc nấm men có hoạt lực mạnh;
- Tiến hành các thao tác phân lập giống vi sinh vật thuần khiết theo đúng trình tự và yêu cầu kỹ thuật;
- Thực hiện thao tác tạo khuẩn lạc đơn bằng kỹ thuật hộp trải, hộp đổ và hộp ria đúng yêu cầu;
- Tuân thủ nội quy của phòng thí nghiệm và đảm bảo vô trùng.

Thời gian thực hành: 5 giờ

Nhóm thực hành: 15 - 20 học sinh/sinh viên

Địa điểm thực hành: Phòng thí nghiệm Công nghệ vi sinh

Nội dung bài thực hành:

1. Nguyên liệu, hoá chất và dụng cụ

- Nguyên liệu, hoá chất, dụng cụ đã chuẩn bị ở bài 1 và 2.
- Mẫu vật dùng để phân lập: có thể sử dụng các loại hoa quả chín như: nho, dâu tây, táo,... hoặc bánh men rượu, bánh men thuốc bắc,...

2. Phương pháp phân lập

2.1. Sơ đồ phân lập (hình 1)

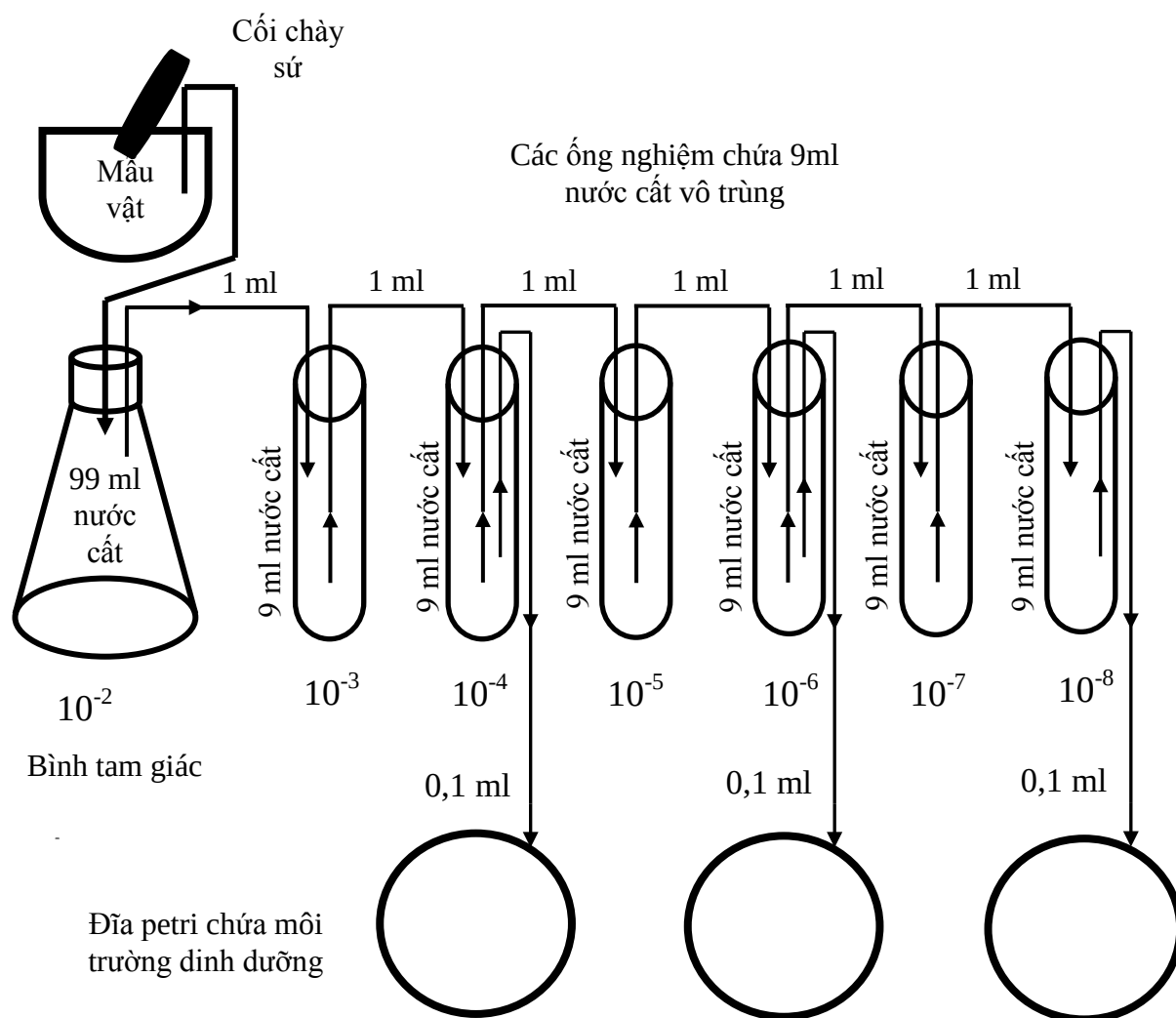
2.2. Phương pháp phân lập vi sinh vật thuần khiết

Với hầu hết các loại mẫu nghiên cứu, quá trình phân lập vi sinh vật ở dạng thuần khiết gồm các bước cơ bản sau:

- Tạo ra các khuẩn lạc riêng rẽ từ quần thể vi sinh vật ban đầu
- Phân lập vi sinh vật thuần khiết
- Kiểm tra độ tinh khiết của các khuẩn lạc

* **Yêu cầu:**

- Nếu mẫu ban đầu ở dạng rắn phải đưa về dạng lỏng bằng cách:
 - + Nghiền mẫu
 - + Hoà tan mẫu trong nước cất vô trùng
 - + Tiếp tục pha loãng ở nồng độ cần thiết.
 - + Cấy mẫu trên môi trường đặc trưng của nó.



Hình 1. Sơ đồ phân lập giống vi sinh vật thuần khiết

Cách pha loãng mẫu theo dãy thập phân

- Chuẩn bị hai bình tam giác có dung tích 250 ml: bình thứ nhất chứa 99 ml nước cất vô trùng, bình thứ hai cũng vô trùng nhưng không chứa gì.
- Vô khuẩn còi và chày sứ bằng cách cho vào một ít cồn rồi đốt lên. Sau đó để nguội.
- Cân 1g mẫu cho vào còi sứ và nghiền mịn mẫu. Thực hiện dưới ngọn lửa đèn cồn, trong điều kiện vô trùng.
- Dùng toàn bộ nước ở bình thứ nhất để chuyển toàn bộ mẫu sang bình thứ hai. Thêm nước cất vô trùng để điều chỉnh thể tích mẫu về 100 ml. Có thể chuyển toàn bộ mẫu từ còi sứ sang bình tam giác chứa 99 ml nước cất vô trùng như trên sơ đồ ở hình 1. Lắc 5 phút, để lắng 30 giây rồi tiếp tục rồi tiếp tục pha loãng mẫu như trên sơ đồ.
- Dùng pipet loại 1ml hút 1ml mẫu ở bình tam giác cho vào ống nghiệm chứa nước cất vô trùng thứ nhất, có độ pha loãng 10^{-3} . Trộn đều dung dịch bằng cách hút lên rồi thổi xuống 3 - 5 lần nhờ bóp cao su gắn trên đầu pipet.

- Dùng pipet loại 1ml hút 1ml mẫu ở ống nghiệm thứ nhất cho vào ống nghiệm chứa nước cất vô trùng thứ hai, có độ pha loãng 10^{-4} . Trộn đều như trên.

- Tiếp tục thao tác tương tự để có các độ pha loãng 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} .

** Phương pháp tạo khuẩn lạc đơn*

Có nhiều kỹ thuật ria khác nhau để thực hiện hộp ria và tạo khuẩn lạc đơn. Một số kỹ thuật ria thường dùng là kỹ thuật ria chữ T, kỹ thuật ria bốn góc, kỹ thuật ria tia và kỹ thuật ria liên tục.

Thao tác kỹ thuật tạo khuẩn lạc đơn được thực hiện như sau:

- Kỹ thuật hộp ria

+ Dùng que cấy vòng thao tác vô trùng thu giống.

+ Ria các đường trên đĩa petri chứa môi trường thích hợp (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.

+ Bao gói đĩa petri, ủ ở nhiệt độ và thời gian thích hợp trong tủ ẩm.

- Kỹ thuật hộp trải

+ Dùng pipetman và đầu tip vô trùng, thao tác vô trùng chuyển 0,1ml dịch chứa giống vi sinh vật lên bề mặt môi trường trong đĩa petri.

+ Nhúng đầu thanh gạt (que trải) vào cồn 70° , hơ qua ngọn lửa để khử trùng. Để đầu thanh gạt nguội trong không gian vô trùng của ngọn lửa.

+ Mở đĩa petri, đặt nhẹ nhàng thanh gạt lên bề mặt thạch của đĩa petri. Dùng đầu thanh gạt xoay, trải đều dịch giống lên bề mặt thạch. Trong khi trải, thực hiện xoay đĩa một vài lần, mỗi lần khoảng $1/2$ chu vi đĩa tạo điều kiện cho thanh gạt trải dịch giống đều khắp bề mặt môi trường.

+ Rút thanh gạt khỏi đĩa, đập đĩa, gói và ủ ở nhiệt độ và thời gian thích hợp trong tủ ẩm.

- Kỹ thuật hộp đổ

+ Dùng pipetman và đầu tip vô trùng, thao tác vô trùng chuyển 1ml dịch chứa giống vi sinh vật lên bề mặt môi trường trong đĩa petri.

+ Đổ khoảng 15 - 20ml môi trường đã đun chảy và để nguội đến $45 - 55^{\circ}\text{C}$ vào đĩa petri đã cấy mẫu.

+ Xoay nhẹ đĩa petri cùng chiều và ngược chiều kim đồng hồ vài lần để dung dịch giống được trộn đều trong môi trường cấy.

+ Đậy nắp đĩa petri, để đông tự nhiên.

- Ghi vào nắp đĩa petri các thông tin:

+ Nồng độ pha loãng tương ứng

+ Ngày cấy mẫu

+ Nhóm thực hành

- Dùng giấy báo gói các đĩa, rồi đem lật ngược và nuôi trong tủ ẩm ở 32⁰C, sau khoảng 24 - 48 giờ.

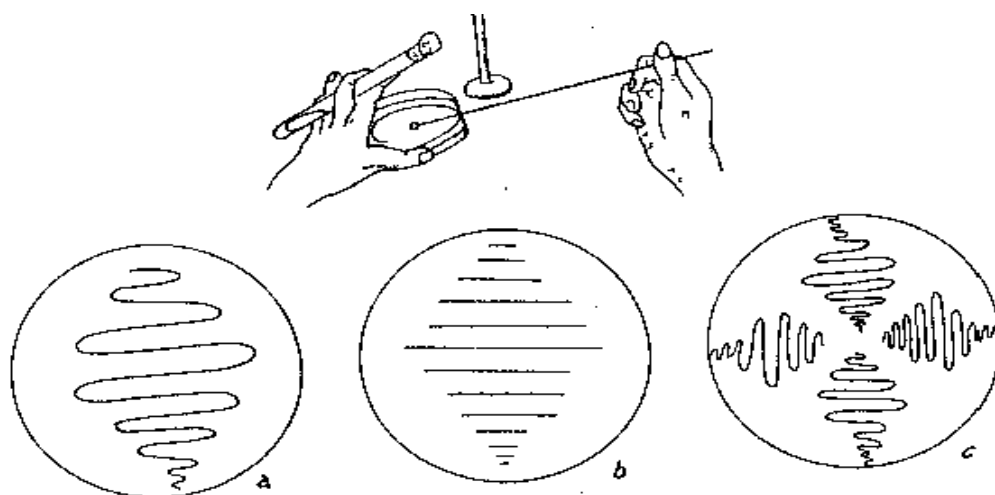
* *Chú ý:* Để có được chủng thuần, cần tiến hành lặp lại nhiều lần các kỹ thuật pha loãng nêu trên cho đến khi tất cả các khuẩn lạc xuất hiện trên môi trường đều đồng nhất.

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

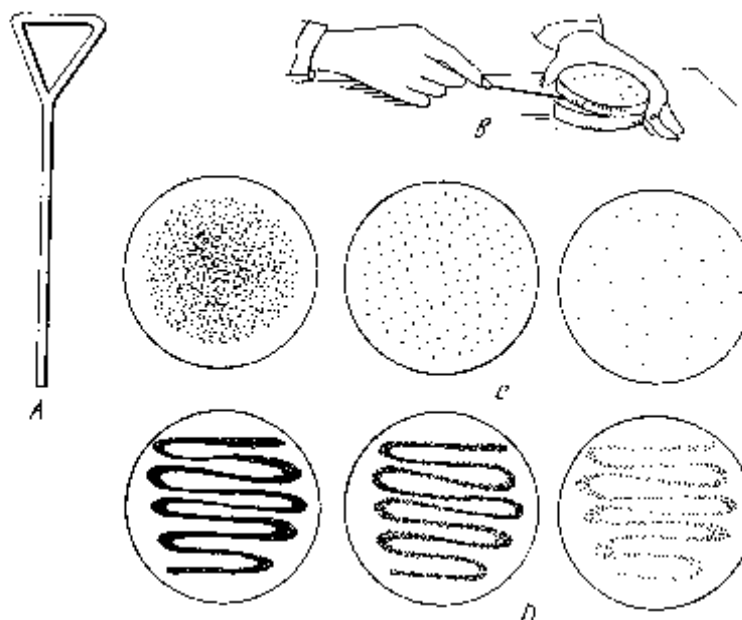
- Việc tạo hợp rìa từ một khuẩn lạc đơn của chủng thuần chỉ tạo ra một loại khuẩn lạc duy nhất trên bề mặt môi trường có hình thái giống với khuẩn lạc của chủng ban đầu.

- Mỗi khuẩn lạc đơn chỉ chứa một loại tế bào có hình thái giống nhau trong quan sát dưới kính hiển vi.

Trong thao tác tạo khuẩn lạc đơn cần lưu ý hạn chế thấp nhất nguy cơ bị nhiễm bằng cách thực hiện nghiêm túc các yêu cầu của thao tác vô trùng.



Hình 2. Các kiểu cấy trên thạch



Hình 3. Cách dàn vi sinh vật trên bề mặt môi trường

3. Tuyển chọn giống nấm men

Sau khi nuôi mẫu trên đĩa petri trong tủ ấm ở 32°C , qua 24 - 48 giờ thì các khuẩn lạc xuất hiện. Tiến hành lựa chọn các khuẩn lạc nấm men mọc tách biệt, có kích thước lớn tiến hành cấy chuyển vào các ống thạch nghiêng để tạo ống giống thuần chủng sử dụng cho các nghiên cứu tiếp theo.

Bài 4

CÂY CHUYỀN GIỐNG NẤM MEN, XÁC ĐỊNH ĐẶC ĐIỂM SINH LÝ, SINH HÓA CỦA NẤM MEN

Mục tiêu: Sau khi học xong bài này, sinh viên có khả năng:

- Nêu được nguyên tắc của phương pháp xác định hoạt tính catalase và kiểu hô hấp của nấm men;
- Trình bày được quy trình xác định định hoạt tính catalase và kiểu hô hấp của nấm men;
- Tiến hành các thao tác xác định định hoạt tính catalase và kiểu hô hấp của nấm men theo đúng trình tự và yêu cầu kỹ thuật;
- Giải thích được hiện tượng, nhận xét và đánh giá kết quả;
- Trình bày được quy trình cấy chuyen giống vi sinh vật trên ống thạch nghiêng;
- Thực hiện các thao tác cấy chuyen giống vi sinh vật trên ống thạch nghiêng theo đúng trình tự và yêu cầu kỹ thuật;
- Tuân thủ nội qui của phòng thí nghiệm và đảm bảo vô trùng.

Thời gian thực hành: 5 giờ

Nhóm thực hành: 15 - 20 học sinh/sinh viên

Địa điểm thực hành: Phòng thí nghiệm Công nghệ vi sinh

Nội dung bài thực hành:

1. Nguyên liệu, hoá chất và dụng cụ

Nguyên liệu, hoá chất, dụng cụ đã chuẩn bị ở bài 1, 2, 3.

2. Cây chuyen giống nấm men

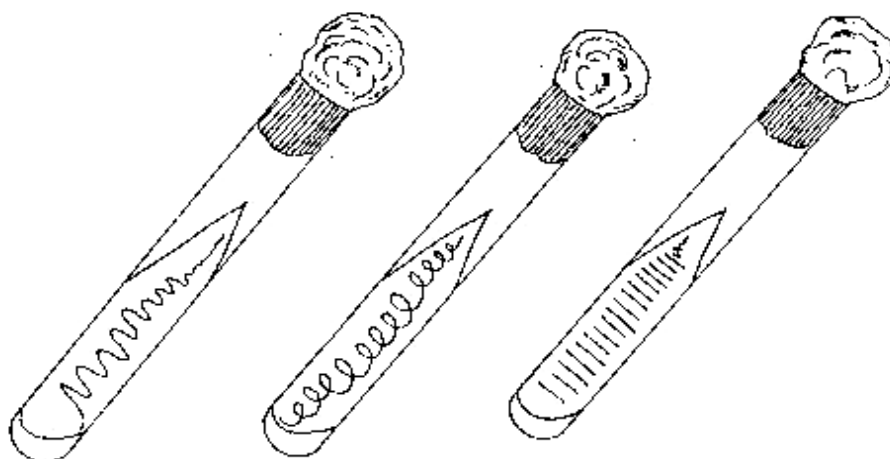
2.1. Cây chuyen giống sang ống thạch nghiêng

- Bật đèn tử ngoại trong tủ cấy vô trùng khoảng 30 - 60 phút (thao tác này lặp lại trước mỗi lần cấy chuyen).
- Đốt đỏ que cấy trên ngọn lửa đèn cồn.
- Dùng tay trái hé mở nắp đĩa petri vừa đủ cho que cấy vào, tay phải cầm que cấy chạm vào bề mặt thạch cho nguội đi và lấy một ít giống trên vòng que cấy. Đậy nắp đĩa petri lại.
- Tay trái cầm ống nghiệm thạch nghiêng, tay phải mở nút bông bằng các kẽ ngón tay và hơi miệng ống nghiệm trên ngọn lửa đèn cồn, đưa que cấy có giống vào tận đáy ống nghiệm. Nhẹ nhàng để đầu que cấy tiếp xúc với bề mặt thạch rồi đưa từ dưới lên trên theo đường dích dắc hoặc cấy thành vệt thẳng. Thao tác phải nhanh, chính xác.
- Hơi lại miệng ống nghiệm và nút bông trên ngọn lửa đèn cồn và đậy nút bông lại.

- Đốt lại que cấy trên ngọn lửa đèn cồn.
- Ghi tên mẫu, ngày cấy chuyển, nhóm thực hiện trên giấy bao gói nút bông của ống nghiệm.
- Chuyển các ống nghiệm vào nuôi trong tủ ẩm 32°C , sau 24 - 48 giờ giống phát triển tốt đem bảo quản trong tủ lạnh ($5 - 6^{\circ}\text{C}$).

2.2. Cấy chuyển giống từ ống nghiệm này sang ống nghiệm khác

- Tay trái cầm hai ống nghiệm với độ nghiêng vừa phải (ống giống ở ngoài, ống môi trường ở trong), lòng bàn tay hướng lên trên.
- Dùng các ngón tay phải xoay lỏng nút bông. Tay phải cầm que cấy và đốt nóng vô trùng trên ngọn lửa đèn cồn. Sau đó rút các nút bông bằng các kẽ ngón tay phải, hơ nóng các miệng nút bông và ống nghiệm trên ngọn lửa đèn cồn.
- Đưa que cấy vào lấy một ít giống trên vòng que cấy, rồi chuyển sang cấy ở ống môi trường, tiến hành cấy như trên. Chú ý trước khi lấy giống cần đặt vòng que cấy vào bề mặt thạch chỗ không có giống vì sinh vật phát triển để làm nguội đầu que cấy và khi đã lấy giống đầu que cấy không để chạm vào thành ống nghiệm.
- Hơ lại miệng các ống nghiệm và nút bông trên ngọn lửa đèn cồn và đậy nút bông lại.
- Đốt lại que cấy trên ngọn lửa đèn cồn.
- Ghi tên mẫu, ngày cấy chuyển, nhóm thực hiện trên giấy bao gói nút bông của ống nghiệm.
- Chuyển các ống nghiệm vào nuôi trong tủ ẩm 32°C , sau 24 - 48 giờ giống phát triển tốt và đem bảo quản trong tủ lạnh.



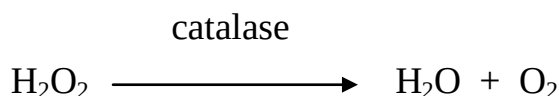
Hình 4. Một số kiểu cấy chuyển trên ống thạch nghiêng

3. Xác định các đặc điểm sinh lý, sinh hóa của nấm men

3.1. Hoạt tính catalase

** Nguyên tắc*

Hoạt tính catalase là một đặc điểm của đa số các vi sinh vật hiếu khí. Vi sinh vật kỵ khí bắt buộc và nhiều loại vi khuẩn không sinh catalase. Catalase phân hủy H_2O_2 và tạo thành oxy theo phản ứng sau:



** Cách tiến hành*

- Nấm men được nuôi cấy trên môi trường Hansen cho phát triển thành khuẩn lạc.

- Cho 1 giọt dung dịch H_2O_2 10% lên trên khuẩn lạc, nếu thấy xuất hiện O_2 qua việc tạo thành các bọt khí thì chứng tỏ có enzym catalase trong tế bào.

3.2. Quan hệ với oxy

** Nguyên tắc*

Căn cứ vào quan hệ đối với oxy, người ta chia vi sinh vật ra làm 4 nhóm, bao gồm: hiếu khí bắt buộc, vi khuẩn kỵ khí, kỵ khí không bắt buộc và kỵ khí bắt buộc.

** Cách tiến hành*

- Cho môi trường Hansen vào 4 ống nghiệm (khoảng 1/3 chiều cao mỗi ống), khử trùng ở 1 atm.

- Dùng que cấy đầu nhọn cấy theo kiểu chích sâu trên thạch đứng.

** Nhận xét*

- Vi sinh vật hiếu khí bắt buộc sinh trưởng trên bề mặt môi trường.

- Vi sinh vật vi khuẩn kỵ khí sinh trưởng cách bề mặt môi trường một chút.

- Vi sinh vật kỵ khí không bắt buộc phát triển dọc theo cả chiều dày môi trường.

- Vi sinh vật kỵ khí bắt buộc chỉ phát triển ở đáy môi trường.

Bài 5

QUAN SÁT ĐẶC ĐIỂM HÌNH THÁI CỦA TẾ BÀO NẤM MEN

Mục tiêu: Sau khi học xong bài này, sinh viên có khả năng:

- Trình bày được quy trình tiến hành làm tiêu bản tạm thời và tiêu bản cố định;
- Mô tả được cách sử dụng kính hiển vi để quan sát tế bào nấm men;
- Thực hiện các thao tác làm tiêu bản tạm thời và tiêu bản cố định theo đúng trình tự và yêu cầu kỹ thuật;
- Sử dụng được kính hiển vi, quan sát và vẽ được hình dạng tế bào nấm men ở dạng tế bào sinh dưỡng và nảy chồi.

Thời gian thực hành: 5 giờ

Nhóm thực hành: 15 - 20 học sinh/sinh viên

Địa điểm thực hành: Phòng thí nghiệm Công nghệ vi sinh

Nội dung bài thực hành:

1. Phương pháp làm tiêu bản tạm thời

1.1. Cách làm tiêu bản giọt ép

- Dùng que cấy hoặc ống hút lấy giống vi sinh vật để làm vết bôi.
- Đặt lá kính lên giọt canh trường thật nhẹ nhàng tránh không tạo thành bọt khí. Muốn vậy để một mép lá kính tiếp xúc với phiến kính rồi từ từ hạ lá kính xuống.
- Đưa tiêu bản lên quan sát trên kính hiển vi.

1.2. Cách 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 phiến kính đặc biệt có phần lõm hình tròn ở giữa.
- Bôi vazơlin quanh phần lõm của phiến kính.
- Cho 1 giọt canh trường lên giữa lá kính.
- Thận trọng xoay ngược lá kính cho giọt canh trường xuống phía dưới rồi đặt lên phần lõm của phiến kính.

1.3. Cách làm tiêu bản tạm thời có nhuộm màu

** Nguyên tắc*

Phương pháp này sử dụng thuốc nhuộm không hoặc ít độc với vi sinh vật và được pha loãng ở nồng độ đảm bảo cho tế bào vi sinh vật vẫn sống và hoạt động sau khi nhuộm màu.

** Cách nhuộm*

- Nhỏ 1 giọt thuốc nhuộm xanh methylen 0,001% lên phiến kính.
- Nhỏ 1 giọt canh trường vi sinh vật với thuốc nhuộm.

- Đậy lá kính lên giọt dịch.
- Quan sát tiêu bản ở vật kính (x 10) rồi (x 40)

2. Phương pháp làm tiêu bản cố định

2.1. Các bước tiến hành làm tiêu bản cố định

- Làm vết bôi
- Cố định vết bôi
- + Cố định bằng nhiệt
- + 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. Người ta thường dùng các hoá chất là rượu etylic và aceton để cố định vết bôi.

- Cách cố định: Có thể thực hiện một trong những cách sau:

- + Nhúng vết bôi vào rượu. Với rượu 95⁰ ngâm vết bôi từ 5 - 15 phút.

Với rượu methylic ngâm khoảng 2 - 5 phút.

- + Ngâm vết bôi vào dung dịch aceton trong 5 phút.

+ Nhỏ vài giọt rượu 90 - 95⁰ lên vết bôi. Đốt cháy và dập tắt ngay. Làm như vậy vài lần rồi để khô.

2.2. Nhuộm màu tiêu bản cố định

** Nguyên tắc*

- Sử dụng thuốc nhuộm có khả năng thẩm thấu qua màng tế bào và kết hợp với thành phần khác nhau của tế bào thành những hợp chất màu đặc trưng bền vững.

- Tùy theo mục đích nghiên cứu và khả năng bắt màu khác nhau của các thành phần tế bào mà chọn loại thuốc nhuộm và cách nhuộm cho phù hợp.

- Có 2 cách nhuộm chính

- + Nhuộm đơn: Chỉ dùng 1 loại thuốc nhuộm trên 1 tiêu bản.

+ Nhuộm kép: Dùng đồng thời 2 hay nhiều loại thuốc nhuộm trên 1 tiêu bản.

** Cách nhuộm*

- Đặt tiêu bản lên khay.

- Nhỏ vào vết bôi vài giọt Fuchsin Ziehl, để yên từ 1 - 2 phút.

- Rửa vết bôi bằng cách nghiêng phiến kính, dùng bình xịt cho dòng nước chảy nhẹ qua vết bôi đến khi nước chảy ra không còn màu nữa.

- Dùng giấy thấm khô tiêu bản hoặc hơi nhẹ tiêu bản trên đèn cồn

- Quan sát tiêu bản ở vật kính (x 40) rồi chuyển sang vật kính (x 100) dùng dầu soi.

3. Quan sát đặc điểm sinh học của nấm men

- Làm tiêu bản nhuộm đơn nấm men cấy trong môi trường dịch thể với xanh methylen Loeffler.

- Hình thái, kích thước tế bào nấm men.
- Sự nảy chồi của nấm men

Bài 6

CÁC PHƯƠNG PHÁP NHUỘM VI SINH VẬT

Mục tiêu: Sau khi học xong bài này, sinh viên có khả năng:

- Trình bày được quy trình kỹ thuật nhuộm tế bào, tiên mao và bào tử vi sinh vật;
- Pha chế được các loại dung dịch sử dụng trong kỹ thuật nhuộm tế bào, tiên mao và bào tử vi sinh vật;
- Thực hiện các thao tác nhuộm màu vi sinh vật theo đúng trình tự và yêu cầu kỹ thuật;
- Sử dụng thành thạo kính hiển vi, quan sát và đọc đúng kết quả.
- Tuân thủ nội quy của phòng thí nghiệm và đảm bảo an toàn.

Thời gian thực hành: 5 giờ

Nhóm thực hành: 15 - 20 học sinh/sinh viên

Địa điểm thực hành: Phòng thí nghiệm Công nghệ vi sinh

Nội dung bài thực hành:

1. Phương pháp nhuộm Gram

1.1. Nguyên tắc

Khi nhuộm theo phương pháp này tế bào vi khuẩn Gram dương có lớp vỏ dày tạo bởi peptidoglycan sẽ giữ được phức chất tạo thành giữa tím gentian và iod có màu tím. Vi khuẩn Gram âm có lớp vỏ mỏng hơn, không giữ được phức chất trên sẽ có màu hồng.

1.2. Hóa chất

- | | | |
|----------------|------------------------|-------|
| - Dung dịch A: | Tím gentian | 1g |
| | Rượu etylic 96% | 10 ml |
| - Dung dịch B: | Phenol đã tinh chế lại | 5g |
| | Nước cất | 100ml |

Trộn 2 dung dịch A và B với nhau, giữ 48 giờ rồi lọc. Bảo quản trong lọ tối, sử dụng vài tháng.

- Dịch lugol:

KI	2g
Iod tinh thể	1g

Hòa 2g KI vào 5ml nước cất, sau đó thêm 1g iod, chờ cho iod tan hết mới thêm nước cho đủ 300ml.

- Thuốc nhuộm:

+ Lấy 1ml thuốc nhuộm fuchsin trộn với 9ml nước cất

+ Có thể không dùng fuchsin mà dùng dung dịch đỏ trung tính 1% hay dung dịch safranin.

1.3. Cách tiến hành

- Chuẩn bị bản mẫu từ ống giống vi khuẩn đã nuôi cấy 24 giờ. Chiều dày của vết bôi không nên vượt quá chiều dày của một tế bào vi khuẩn. Cố định bản mẫu trên ngọn lửa đèn cồn.

- Nhỏ thuốc nhuộm tím gentian lên trên vết bôi vi sinh vật, giữ khoảng 1-2 phút.

- Đổ thuốc nhuộm thừa trên phiến kính đi, không rửa nước, nhỏ dịch lugol lên chỗ vết bôi, giữ 1 phút rồi đổ đi.

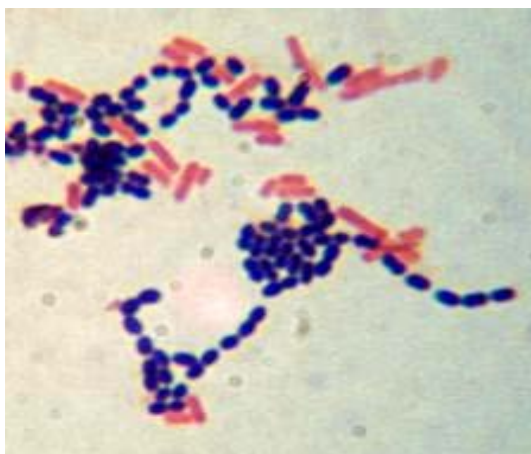
- Nhúng bản mẫu vào rượu etylic 95% trong 0,5-1 phút.

- Rửa nước

- Nhỏ thuốc nhuộm bổ sung lên chỗ vết bôi và giữ 1-2 phút.

- Rửa nước, đợi khô, sau đó đem quan sát dưới kính hiển vi.

Kết quả: tế bào vi khuẩn Gram dương bắt màu tím và Gram âm bắt màu thuốc nhuộm bổ sung (màu đỏ).



Hình 1. Vi khuẩn G(+) và G(-)

2. Phương pháp nhuộm tiên mao

2.1. Vật liệu, hoá chất

- Dung dịch A:
- Acid tannic 5g
 - FeCl₃ 1,5g
 - Formalin 2ml
 - NaOH 1% 1ml
 - Nước cất 100ml

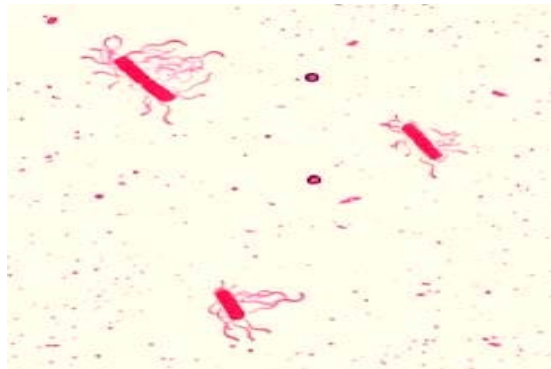
- Dung dịch B: 2 g AgNO₃ hoà tan trong 100 ml nước cất, lấy 10 ml để riêng. Nhỏ dung dịch NH₄OH đậm đặc vào 90 ml còn lại, thấy hình thành tủa rất đặc, tiếp tục nhỏ NH₄OH vào cho đến khi tan hết tủa. Lấy 10ml AgNO₃ đã bỏ ra ban đầu nhỏ từ từ vào dung dịch, thấy xuất hiện vẩn mỏng, tiếp tục nhỏ vào cho đến khi vừa tan hết vẩn thì thôi.

- Chuẩn bị phiên kính: rửa thật sạch, ngâm trong cồn, đốt cháy hết cồn rồi mới sử dụng.

2.2. Cách tiến hành

- Hoạt hoá vi khuẩn 2-3 lần trước khi tiến hành nhuộm.
- Dùng que cấy vô trùng lấy vi khuẩn từ mặt thạch (mới cấy 18-24 giờ) hoà vào 1 giọt nước cất đặt giữa phiên kính, để nghiêng cho chảy về một phía, làm khô trong không khí.
- Cố định tế bào: hơ nhanh trên ngọn lửa đèn cồn 2-3 lần.
- Nhỏ dịch A lên vết bôi, giữ 10 phút, rửa bằng nước cất.
- Dùng dịch B cho chảy qua để loại hết nước. Nhuộm bằng dung dịch B trong 30-60 giây. Hơ nóng, để nguội rồi rửa lại bằng nước cất.
- Soi kính: dùng vật kính dầu (x100).

Kết quả: Tế bào vi khuẩn bắt màu nâu thẫm, tiên mao bắt màu nâu.



Hình 2. Kết quả nhuộm tiên mao của tế bào vi khuẩn

3. Phương pháp nhuộm bào tử

3.1. Nhuộm Lục Malachit (Phương pháp Schaeffer-Fulton)

3.1.1. Vật liệu và hoá chất

- Dung dịch Lục Malachite (Malachite green) bão hoà (khoảng 7,6%)
- Dung dịch Safranin 0,5%

3.1.2. Cách tiến hành

- Làm vết bôi và cố định tế bào như đối với nhuộm Gram.
- Nhuộm bằng dung dịch Lục Malachite trong 10 phút, rửa nước.
- Nhuộm lại bằng dung dịch Safranin trong 30 giây, rửa nước, thấm khô.
- Soi kính: dùng vật kính dầu (x100)

Kết quả: Bào tử có màu lục, tế bào có màu đỏ.

* Chú ý: phân biệt bào tử với các hạt dị nhiễm cũng bắt màu lục

3.2. Nhuộm Carbollic Fuchsin

3.2.1. Vật liệu và hoá chất

- Dung dịch A:

+ 10 ml dung dịch Fuchsin kiềm bão hoà trong etanol (khoảng 10%)

+ 100 ml dung dịch acid carbolic (phenol) 5% (trong nước).

Trộn đều với nhau (chuẩn bị trước khi dùng)

- Dung dịch B:

100 ml Etanol 95%

3 ml HCl đậm đặc

- Dung dịch C:

+ 30 ml dung dịch Xanh metylen (Methylene blue) bão hoà trong etanol (khoảng 2%)

+ 100 ml dung dịch KOH 0,01% trong nước.

Trộn đều với nhau, để càng lâu càng tốt.

3.2.2. Cách tiến hành

- Làm vết bôi trên phiến kính, cố định tế bào.

- Nhỏ dung dịch A lên vết bôi, hơi nóng nhẹ bên dưới để bay hơi, tránh để sôi. Thêm dần dần thuốc nhuộm để không bị khô cạn, giữ trong 5 phút. Đợi nguội, đổ thuốc nhuộm đi.

- Dùng dịch B rửa cho đến khi vừa thấy vừa hết màu đỏ, rửa nước.

- Nhuộm lại bằng dung dịch B trong 2-3 phút, rửa nước, thấm khô.

- Soi kính: dùng vật kính dầu (x100).

Kết quả: Bào tử bắt màu đỏ, tế bào bắt màu xanh

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. Bài giảng thực hành hệ cao đẳng (2011), *Vi sinh thực phẩm*, Đại học công nghệ Sài Gòn.
- [2]. TS. Nguyễn Hoài Hương (2009), *Bài giảng thực hành vi sinh ứng dụng*, trường đại học kỹ thuật công nghiệp TP. Hồ Chí Minh.
- [3]. Nguyễn Đức Lượng (chủ biên), Phan Thị Huyền, Nguyễn Ánh Tuyết (2003), *Thí nghiệm công nghệ sinh học tập 2*, Nhà xuất bản Đại học Quốc gia, Thành phố Hồ Chí Minh.
- [4]. Nguyễn Đức Lượng (2002), *Công nghệ vi sinh tập 1, 2*, Nhà xuất bản Đại học Quốc gia, Thành phố Hồ Chí Minh.
- [5]. Nguyễn Văn Minh, Dương Nhật Linh (2008), *Giáo trình thực tập vi sinh cơ sở*, Trường Đại học mở TP. Hồ Chí Minh.