

**PHẦN II:
THÍ NGHIỆM
VI SINH VẬT HỌC**

BÀI 1 : THỰC HÀNH LÀM MÔI TRƯỜNG DINH DƯỠNG

I. Khái niệm:

- 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 gồm các chất dinh dưỡng và các chất có nhiệm vụ duy trì thế oxi hoá khử, áp suất thẩm thấu của tế bào và sự ổn định độ pH của môi trường.

- Yêu cầu của môi trường dinh dưỡng: Có đủ các chất dinh dưỡng cần thiết; Có độ pH thích hợp; Có độ nhớt nhất định; Không chứa các yếu tố độc hại ; Hoàn toàn vô trùng.

- Phân loại môi trường dinh dưỡng: Người ta dựa trên các cơ sở khác nhau để phân loại môi trường

II. Phương pháp làm môi trường

Làm 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.

2.1. Nguyên tắc của việc chế tạo 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.

2.2. Các bước chế tạo môi trường dinh dưỡng:

1. Pha chế:

+ Cân, đong thật chính xác từng thành phần môi trường và pha chế theo đúng trình tự hướng dẫn trong tài liệu.

+ Môi trường lỏng: Cân, đong các chất rồi cho hoà tan vào nước.

+ Môi trường đặc:

- Cân agar rồi ngâm vào nước
- Cân hoá chất rồi hoà tan trong nước.

- Vớt agar ra, vắt khô, bỏ vào xoong môi trường để đun.

2. Làm trong môi trường:

Việc làm trong môi trường sẽ giúp ta dễ dàng quan sát sự phát triển của vi sinh vật. Có thể làm bằng một trong các cách sau:

+ Cách 1: Lọc bằng bông, vải thưa hay giấy lọc

+ Cách 2: Lọc bằng lòng trắng trứng gà.

- Cú 1 lít môi trường dùng lòng trắng của 1 quả trứng.
- Lấy lòng trắng trứng + lượng nước bằng lượng lòng trắng đánh tan cho sủi bọt.
- Đổ hỗn hợp trứng và nước trên vào môi trường.
- Trộn đều, đun sôi 10 - 15 phút.
- Để lắng rồi mới lọc.

3. Điều chỉnh độ pH của môi trường:

+ Muốn điều chỉnh độ 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 độ 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.

4. Phân phối môi trường vào dụng cụ:

Người ta thường phân phối môi trường vào ống nghiệm, đĩa petri, bình tam giác. Trình tự phân phối gồm các bước sau:

+ Môi trường cần được đun cho hoá chất lỏng rồi đổ qua phễu thuỷ 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 cầu hay 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.

- Khử trùng môi trường:

Tùy theo tính chất và điều kiện cụ thể của từng loại môi trường mà có chế độ và phương pháp khử trùng khác nhau.

6. Làm thạch nghiêng, thạch đứng, đổ thạch vào đĩa petri:

+ Làm thạch nghiêng: Cần tiến hành ngay sau khi khử trùng môi trường vừa kết thúc và môi trường chưa đông đặc.

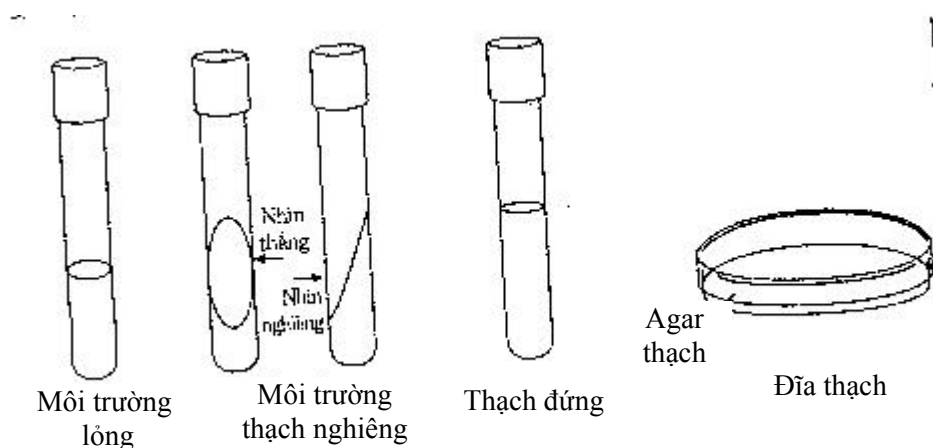
+ Làm thạch đứng: Đặt các ống nghiệm đã có môi trường làm thạch đứng vào giá , để yên cho đến khi môi trường nguội và đông đặc.

+ Đổ thạch vào đĩa petri:

- Toàn bộ quy trình đổ thạch vào đĩa petri đều thực hiện trong tủ cấy vô trùng

*** Chú ý:**

- Thao tác đổ thạch phải hết sức khẩn trương và khéo léo để hạn chế sự nhiễm khuẩn.
- Mặt thạch phải phẳng, nhẵn, có độ dày khoảng 2mm. Thông thường cứ 1/4 lít môi trường có thể phân phối được 22 - 25 đĩa petri.
- Sau khi đổ môi trường vào đĩa petri, 1 - 2 ngày sau khi kiểm tra lại xem môi trường có bị nhiễm khuẩn không rồi mới sử dụng để cấy hai phân lập.
- Nhớ viết vào nhãn: Tên môi trường
Khử trùng ngày tháng năm
- Để vào nơi cất giữ môi trường để tiện cho việc theo dõi, sử dụng và bảo quản.



Hình 1.1. Một số dạng môi trường trong ống nghiệm và hộp pêtiri

7. Bảo quản và kiểm tra môi trường:

+ Môi trường chưa dùng cần được bảo quản ở chỗ mát, hạn chế tác dụng của ánh sáng, nhiệt độ từ $0 - 5^{\circ}\text{C}$ và không để môi trường bị khô.

+ Trước khi sử dụng, để kiểm tra độ vô khuẩn của môi trường, người ta thường đặt chúng vào tủ ấm 37°C , trong 48 - 72h. Sau lấy ra quan sát, loại bỏ các ống có vi sinh vật phát triển và chỉ sử dụng những ống nghiệm, những đĩa pêtiri có môi trường đạt yêu cầu.

BÀI 2 : CÁC PHƯƠNG PHÁP PHÂN LẬP VI SINH VẬT

I. Khái niệm :

Phân lập vi sinh vật là quá trình tách riêng các loài vi sinh vật từ quần thể ban đầu và đưa về dạng thuần khiết.

Đây là một khâu có ý nghĩa rất quan trọng trong việc nghiên cứu và ứng dụng vi sinh vật.

Vi sinh vật ở dạng thuần khiết là giống vi sinh vật được tạo ra từ 1 tế bào ban đầu.

- Trong thiên nhiên hoặc trong các vật phẩm nghiên cứu, vi sinh vật thường tồn tại ở dạng hỗn hợp gồm nhiều loài khác nhau. Muốn nghiên cứu về hình thái, sinh lý, lý hoá hoặc sử dụng vào thực tiễn một loài nào đó thì cần phải đưa chúng về dạng thuần khiết.

- **Nguyên tắc:** Tách rời các tế bào vi sinh vật; Nuôi cấy các tế bào trên trong môi trường dinh dưỡng đặc trưng để cho khuẩn lạc riêng rẽ, cách biệt nhau.

II. Phương pháp phân lập vi sinh vật thuần khiết:

Quá trình phân lập vi sinh vật ở dạng 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.

2.1. Tạo ra các khuẩn lạc riêng rẽ từ quần thể vi sinh vật trên các môi trường phân lập

a. 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.

Sau thực hiện như mẫu là dạng lỏng.

- + Tiếp tục pha loãng ở nồng độ cần thiết.
- + Cấy mẫu trên môi trường đặc trưng của nó.

- 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 hộp ria 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.

b. 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: kỹ thuật ria chữ T, kỹ thuật ria bốn góc, kỹ thuật ria tia, kỹ thuật ria liên tục

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

1. 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.

2. Kỹ thuật hộp trái:

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

- Nhúng đầu thanh gạt (que trái) thủy tinh vào cồn 70⁰, 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.

3. Kỹ thuật hộp đổ:

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

- Đổ khoảng 15 - 20 ml môi trường đã đun chảy và để nguội đến 45 - 55⁰C 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.

2.2. Phân lập các vi sinh vật trên môi trường đặc ở đĩa petri

a. Phân lập vi sinh vật hiếu khí:

+ Hút 0,1 ml dịch mẫu đã pha loãng cho vào đĩa petri có môi trường thích hợp.

+ Dùng que gạt thủy tinh phân phối dịch mẫu trải đều khắp mặt thạch.

+ Tiếp tục sử dụng que gạt này gạt mẫu cho đều khắp mặt thạch đĩa petri thứ 2 rồi đĩa thứ 3.

+ Đặt các đĩa petri 1, 2, 3 trên vào tủ ấm ở nhiệt độ thích hợp sau một thời gian nhất định tùy giống vi sinh vật ta sẽ nhận được các khuẩn lạc riêng rẽ từ các đĩa thứ 2 và 3.

b. Phân lập vi sinh vật kỵ khí:

+ Dùng môi trường đặc trong ống nghiệm đem chung cách thủy để loại bỏ không khí trong môi trường.

+ Để nguội môi trường còn 45 - 50⁰C.

+ Hút 0,1 ml dịch nghiên cứu cho vào ống môi trường, đậy nút lại, lắc tròn quanh trục ống nghiệm.

+ Rót nhanh môi trường ở ống nghiệm vào nắp dưới của đĩa petri và đậy thật nhanh nắp trên lại, sao cho giữa mặt nắp và môi trường không còn không khí.

+ Dùng parafin hàn kín phần tiếp xúc giữa 2 nắp của đĩa petri và ủ ở nhiệt độ thích hợp.

+ Sau khi vi sinh vật phát triển, chọn các khuẩn lạc riêng rẽ trong khối môi trường, dùng que cấy cắt cả khối môi trường rồi cấy vào môi trường lỏng thích hợp.

2.3. Kiểm tra độ tinh khiết của giống mới phân lập

Có nhiều cách kiểm tra:

1. Kiểm tra vết cấy:

Quan sát sự sinh trưởng của vi sinh vật qua vết cấy trên môi trường đặc.

+ Nếu vết cấy có bề mặt và màu sắc đồng đều, thuần nhất chứng tỏ giống mới phân lập tinh khiết thì giữ lại.

- + Nếu vết cấy không thuần nhất thì loại bỏ.
- 2. Kiểm tra lại độ thuần chủng của các loại khuẩn lạc:
 - + Chọn các khuẩn lạc riêng rẽ trên môi trường thạch nghiêng.
 - + Tách các khuẩn lạc này ra và hoà tan, pha loãng ở nồng độ cần thiết trong nước cất vô trùng.
 - + Nhỏ 1 giọt dịch trên vào đĩa pêttri có môi trường.
 - + Dùng 1 que gạt phân phối giọt dịch đều khắp mặt thạch đĩa pêttri thứ nhất, rồi đĩa thứ 2, thứ 3.
 - + Đặt các đĩa pêttri trên vào tủ ẩm với nhiệt độ và thời gian thích hợp tùy loại vi sinh vật.
 - + Sau lấy ra quan sát các khuẩn lạc riêng rẽ. Sự thuần khiết của khuẩn lạc là biểu hiện sự thuần khiết của giống.

III. Thực hành phân lập vi sinh vật từ các loại canh trường khác nhau

3.1. Phân lập vi khuẩn *Bacillus subtilis*:

- Cỏ khô cắt nhỏ, cho vào 1 bình tam giác.
- Bổ sung thêm:
 - + Một chút phân
 - + Nước sạch đổ ngập cỏ.
- Đun sôi 15 phút để diệt các tế bào sinh dưỡng và các tế bào không sinh bào tử.
- Đậy nút bông, để tủ ẩm ở nhiệt độ 25 - 26 °C trong 48 - 72 h.
- Kết quả:
 - + Xuất hiện lớp váng xám có nhiều vi khuẩn *Bacillus subtilis* vì cỏ khô bao giờ cũng có bào tử của vi khuẩn này.
 - + Soi kính hiển vi : Tế bào *Bac. subtilis* có hình que, dài, bào tử hình ôvan nằm ở xa tâm hay gần tâm khuẩn lạc. Tế bào có kích thước (3 - 5 x 0,6) µm.

3.2. Phân lập nấm mốc *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus niger* và *Mucor*:

- Có thể phân lập các loài nấm mốc này trên cơm nguội, xôi làm mốc tương, bánh mì để khô ít ngày.
 - Thông qua màu sắc của mốc để nhận diện.
 - + Mốc có màu trắng: Có thể là *Mucor* hay *Rhizopus*.
 - + Mốc có màu đen là *Aspergillus niger*.
 - + Mốc có màu xanh lục là *Penicillium italicum*.
- Loại mốc này thường có trên vỏ cam, chanh để lâu ngày

- Dùng que cấy đầu hình thước thợ lấy một ít sợi nấm cấy vào môi trường thạch nghiêng thích hợp (Czapek).

3.3. Phân lập nấm men:

- Có thể phân lập nấm men dễ dàng từ các môi trường như:

+ Bề mặt trái cây và dịch ép một số trái cây như táo, lê, nho, dâu, mơ, dứa, ...

+ Trong rượu nếp, trong các bánh men rượu, trong bia, trong nước mía, trong hạt kêphia.

- Nấm men này khi quan sát trên kính hiển vi thường có dạng hình cầu hay hình trứng. Tế bào có kích thước lớn, có khả năng nảy chồi. Khuẩn lạc cho màu trắng sữa

- Chọn các khuẩn lạc nấm men riêng rẽ và cấy vào môi trường thích hợp (ng khoai tây - đường cám hay môi trường Sabouraud).

BÀI 3 : CÁC PHƯƠNG PHÁP NUÔI CÂY VÀ BẢO QUẢN VI SINH VẬT

I. Các phương pháp gieo cấy:

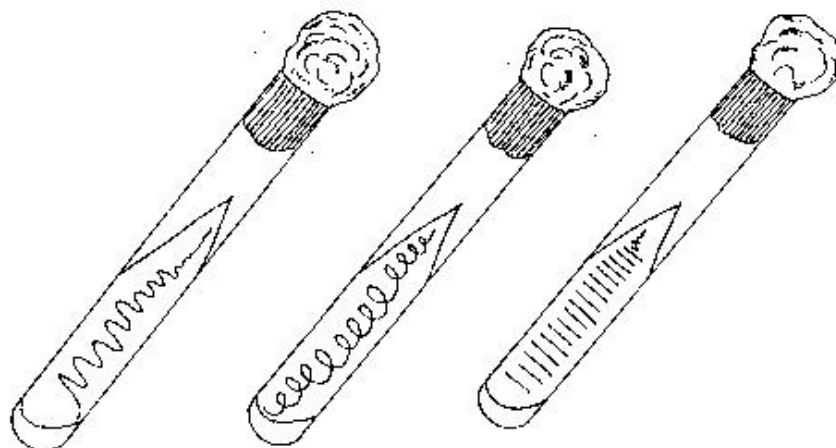
1.1 *Cấy truyền từ ống nghiệm này sang ống nghiệm khác:*

- Dán nhãn ghi $\left\{ \begin{array}{l} \text{Tên giống vi sinh vật} \\ \text{Ngày cấy} \end{array} \right.$
vào thành ống nghiệm, dưới nút bông một chút.
- Tay trái cầm 2 ống nghiệm: 1 ống giống
1 ống môi trường
- Tay phải cầm que cấy và khử trùng trên ngọn đèn cồn cho đến khi nóng đỏ dây cấy
- Dùng ngón út và ngón áp út kẹp nút bông vào lòng bàn tay xoay nhẹ, kéo nút ống giống ra
- Hơ nóng để khử trùng không khí ở miệng 2 ống nghiệm
- Đợi khi que cấy vừa nguội, khéo léo đưa que cấy tiếp xúc với khuẩn lạc trong ống giống.
- Rút que cấy ra, không để que cấy chạm vào thành ống nghiệm và đưa ống vào môi trường để thực hiện các thao tác cấy truyền.
- Khử trùng lại phần không khí nơi miệng 2 ống nghiệm rồi đậy nút bông
- Khử trùng lại que cấy sau khi đã sử dụng xong
- Chú ý:
 - Nếu ống giống là canh trường lỏng có vi sinh vật thì dùng pipet hút canh trường thay que cấy.
 - Thao tác khử trùng ống hút bắt đầu thực hiện ở đầu nhỏ ống hút sau khi đã tháo giấy bao gói.
 - Sử dụng xong cắm ống hút vào dung dịch crômíc để khử trùng.

1.2. *Phương pháp cấy trên thạch nghiêng:*

- Phương pháp này dùng để cấy truyền các vi sinh vật hiếu khí.
- Sử dụng que cấy đầu tròn tiến hành các thao tác theo đúng trình tự nói trên
 - Thực hiện việc cấy giống vào ống thạch nghiêng bằng các thao tác tiếp theo:
 - + Hoà giống ở đầu que cấy vào giọt nước ở đáy ống nghiệm.
 - + Nhẹ nhàng lướt que cấy trên mặt thạch theo các kiểu (hình 3.1)

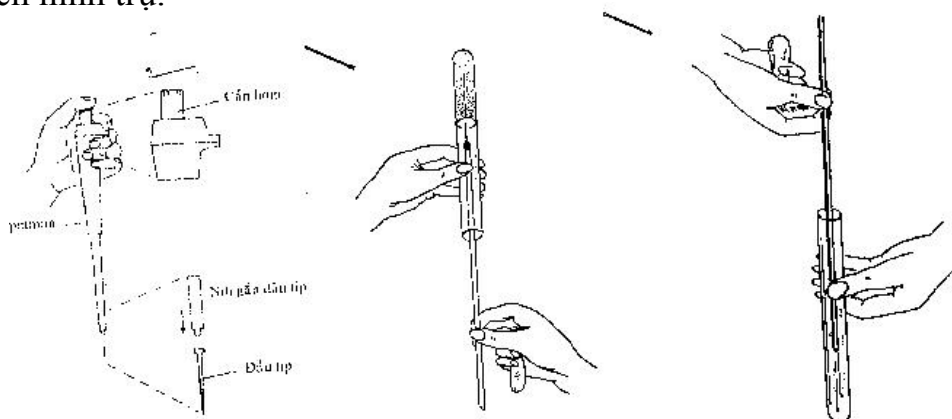
- Hình chữ chi
- Hình vòng xoắn
- Hình vạch ngang song song



Hình 3.1 : Một số kiểu cấy trên ống thạch nghiêng

1.3 Phương pháp cấy trên thạch đứng: Phương pháp này dùng để cấy các vi sinh vật kỵ khí.

- Sử dụng que cấy hình kim
- Sau khi lấy giống vi sinh vật, dùng que cấy này đâm sâu vào phần khối thạch hình trụ.



Hình 3.2 : Cách sử dụng Pipetmain (a) Cây bằng que cấy đầu nhọn (b)
Cách cấy vi sinh vật kỵ khí bằng que cấy hình kim (c)

- Đâm sát đáy ống nghiệm và đâm thành 3 đường: 1 đường chính giữa, 2 đường sát thành ống tùy yêu cầu.
- Đường cấy phải thẳng, nhẹ nhàng để không gây nứt, vỡ môi trường (hình 3.2).

1.4. Phương pháp cấy trên đĩa pêttri:

Có thể cấy trên đĩa pêttri theo 1 trong 2 cách sau:

* Dùng que cấy đầu tròn và thực hiện theo trình tự sau:

- Để đĩa pêttri lên bàn.
- Dùng que cấy lấy canh trường vi sinh vật theo thứ tự và yêu cầu ở phương pháp chung.

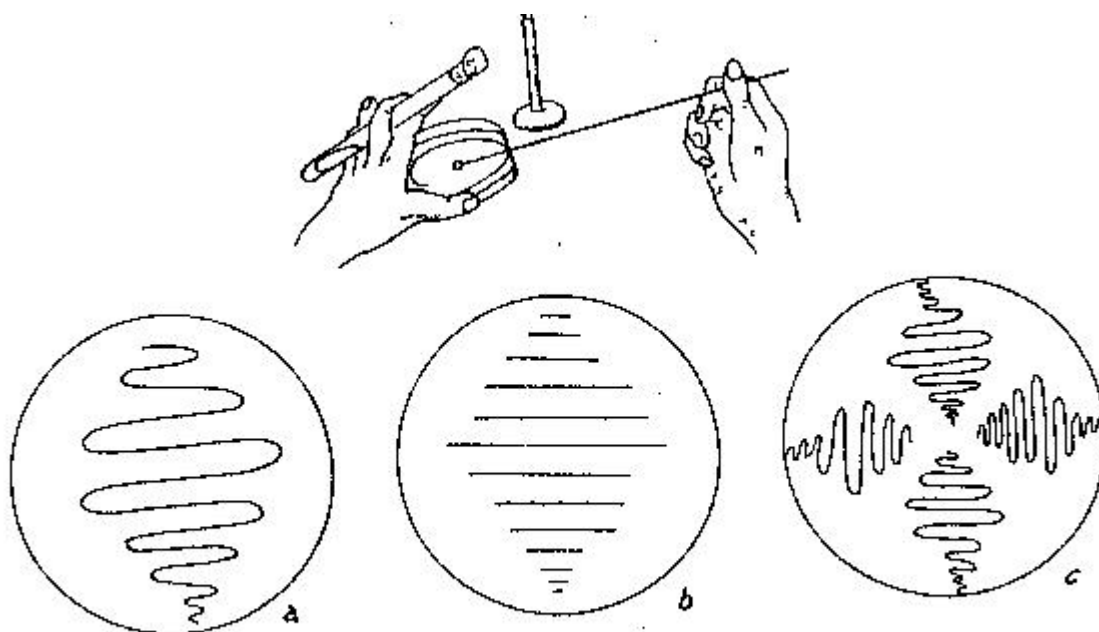
- Tay trái hé mở nắp đĩa pêttri vừa đủ để cho que cấy vào.

- Nhẹ nhàng và nhanh chóng lướt que cấy lên mặt thạch theo một trong các kiểu sau:

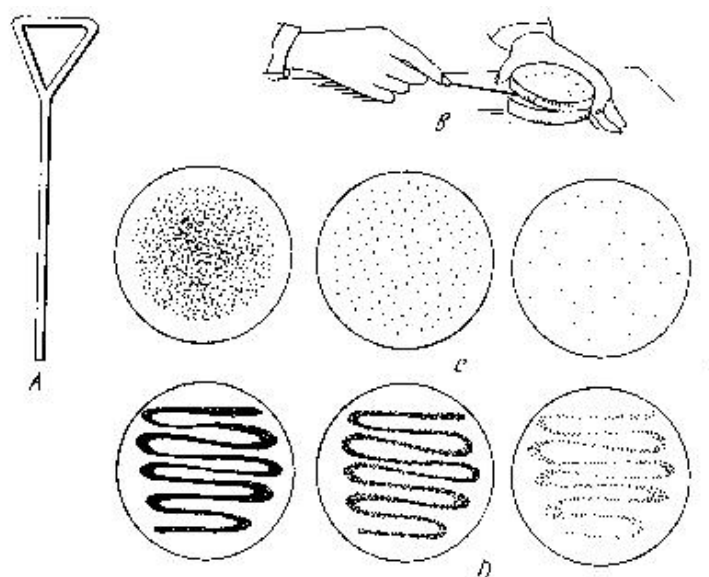
+ Theo hình chữ chi trên toàn bộ mặt thạch (hình 3.3a)

+ Theo những đường song song (hình 3.3b)

+ Theo 4 hình chữ chi 4 góc (hình 3.3c)



Hình 3.3 : Các kiểu cấy trên thạch đĩa



Hình 3.4 : Cách dàn vi sinh vật trên bề mặt môi trường.

A – Que gạt Drigalxki; B – Dàn bằng que gạt; C: Sự sinh trưởng của VSV sau khi dàn đều bằng que gạt; D : Sự sinh trưởng của VSV sau khi dàn bằng que cây

* Dùng pipet: Thường áp dụng để định lượng vi sinh vật và cấy một lượng khá nhiều giống. Có 2 cách:

- Cách 1:

+ Trộn dịch cấy vào thạch bằng cách hút 0,1 ml dịch nghiên cứu cho vào ống nghiệm có môi trường thạch ở nhiệt độ 50⁰C.

+ Đậy nút bông lại, lắc nhẹ cho vi sinh vật phân phối đều trong môi trường.

+ Đổ thạch này vào đĩa pêttri đã khử trùng.

+ Xoay tròn đĩa pêttri cho thạch dàn đều ở đáy hộp.

+ Để yên cho thạch đông đặc lại và đặt vào tủ ấm ở nhiệt độ thích hợp.

- Cách 2:

+ Hút 0,1 ml dịch cấy, nhỏ vào đĩa pêttri có môi trường đặc.

+ Dùng que gạt phân phối giọt dịch đều khắp mặt thạch đĩa.

+ Cất vào tủ ấm với nhiệt độ và thời gian thích hợp tùy loài vi sinh vật.

III. Các phương pháp nuôi vi sinh vật :

Để đảm bảo sự phát triển của vi sinh vật, sau khi cấy xong phải quan tâm đến các điều kiện nuôi dưỡng chúng. Các điều kiện đó bao gồm:

- *Nhiệt độ*: Tùy loài vi sinh vật khác nhau, chọn nhiệt độ tối thích cho sự phát triển của chúng và duy trì sự ổn định nhiệt độ đó.

- *Độ ẩm*: Để duy trì độ ẩm trong quá trình nuôi cần:

- Đảm bảo đủ lượng nước khi làm môi trường.

- Trong điều kiện cần thiết có thể phun nước vô khuẩn vào phòng nuôi hoặc để nước bốc hơi trong tủ ẩm.

- *Ôxi (O_2)*:

- Đối với vi sinh vật hiếu khí:

+ Cung cấp thường xuyên và đầy đủ O_2 .

+ Lớp môi trường nuôi cấy có độ dày vừa phải.

+ Các bình chứa môi trường được lắc thường xuyên trong quá trình nuôi để cung cấp thêm oxi cho vi sinh vật.

+ Nếu nuôi cấy trong môi trường có khối lượng lớn phải tiến hành sục khí thường xuyên hay định kỳ.

- Đối với vi sinh vật kỵ khí: Hạn chế sự tiếp xúc với oxi bằng cách; Đổ lên bề mặt môi trường parafin, dầu vazolin; Cấy trích sâu vào môi trường đặc. Nuôi cấy trong bình hút chân không. Nuôi trong ống nghiệm đặc biệt sau khi rút hết không khí và hàn kín lại. Đun sôi môi trường một thời gian để loại hết O_2 . Để nguội $45^{\circ}C$. Dùng ống hút cấy vi sinh vật vào đáy ống nghiệm. Làm nguội thật nhanh rồi đổ vazolin lên bề mặt để hạn chế sự tiếp xúc với O_2 .

- Kết quả của việc nuôi cấy:

Sau khi nuôi ở thời gian và nhiệt độ thích hợp cho mỗi loại vi sinh vật ta thấy:

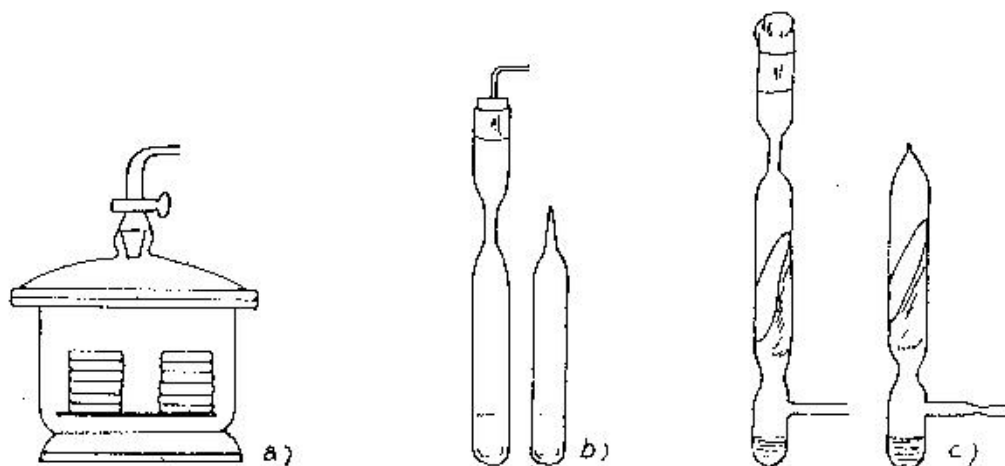
- Trong môi trường lỏng: Vi khuẩn phát triển sẽ làm đục môi trường.

- Trong môi trường đặc ở thạch nghiêng:

+ Nấm men, vi khuẩn phát triển sẽ tạo nên vệt nổi trên mặt thạch trong hay trắng đục.

+ Nấm mốc sẽ tạo nên những sợi mảnh từ vết cấy.

- Trong môi trường thạch đứng: Các vi khuẩn kỵ khí phát triển ở đáy của cột môi trường.



Hình 3.5 : Các dụng cụ nuôi yếm khí
 a. Bình hút ẩm chân không
 b. và c. Các kiểu ống nghiệm hàn kín

IV. BẢO QUẢN CÁC CHỦNG VI SINH VẬT THUẦN KHIẾT

4.1. Các phương pháp bảo quản giống vi sinh vật

1. Phương pháp cấy truyền định kỳ lên môi trường mới:

- Phương pháp này áp dụng để bảo quản tất cả các loại vi sinh vật.
- Ưu điểm: Phương pháp này đơn giản, dễ làm, thời gian bảo quản không lâu.

- Nhược điểm: Tốn môi trường, công sức và thời gian. Phẩm chất ban đầu của giống có thể bị thay đổi do nhiều nguyên nhân khó xác định cụ thể trong quá trình cấy truyền.

2. Phương pháp giữ giống trên môi trường thạch có lớp dầu khoáng:

- Yêu cầu của phương pháp này là sử dụng dầu khoáng như parafin lỏng hay vazolin phải trung tính, có độ nhớt cao, không chứa các sản phẩm độc với vi sinh vật và vô trùng.

- Cách bảo quản:

- + Khử trùng dầu khoáng bằng cách hấp ở 121°C trong 2h. Sau đó sấy khô ở tủ sấy (170°C) trong 1 - 2h; để nguội

- + Đối với vi sinh vật kỵ khí :

- + Hạn chế sự tiếp xúc với ôxi bằng cách :
 - * Đổ lên bề mặt môi trường parafin, dầu vazolin
 - * Cấy trích sâu vào môi trường đặc.
 - * Nuôi cấy trong bình hút chân không (hình 3.5)
 - * Nuôi trong ống nghiệm đặc biệt sau khi hút lên không và hàn kín lại (hình 3.5).

* Đun sôi môi trường một thời gian để loại hết O_2 . Để nguội $45^\circ C$. Dùng ống hút cấy vi sinh vật vào đáy ống nghiệm. Làm nguội thật nhanh rồi đổ vazolin lên bề mặt để hạn chế sự tiếp xúc với O_2 .

+ Đổ lên bề mặt môi trường có vi sinh vật phát triển tốt một lượng dầu cách mép trên ống nghiệm 1 cm.

+ Dùng parafin đặc hàn kín miệng ống, bình nuôi VSV.

- Ưu điểm: Phương pháp này đơn giản nhưng hiệu quả cao nhờ khả năng làm chậm quá trình biến dưỡng và hô hấp nên vi sinh vật phát triển chậm lại. Môi trường không bị mất nước và khô.

3. Phương pháp giữ giống trên đất, cát, hạt

* *Trên đất, cát*: Dùng để bảo quản các chủng tạo bào tử tiềm sinh (hoặc bào tử vô tính) với thời gian bảo quản từ một đến nhiều năm.

- Cách bảo quản:

+ Đất, cát đem rây để lấy hạt đều và ngâm trong HCl hay H_2SO_4 đậm đặc 8 - 12h để loại bỏ các axit hữu cơ trong cát.

+ Rửa kỹ và giữ ở điều kiện vô trùng.

+ Sấy khô và giữ ở điều kiện vô trùng

+ Đổ đầy cát vào ống nghiệm có vi sinh vật phát triển trên môi trường thạch và lắc thật đều.

+ Rót toàn bộ cát lẫn vi sinh vật vào 1 ống nghiệm khác.

+ Hàn kín miệng ống nghiệm này sẽ bảo quản được rất lâu.

* *Trên hạt*: Dùng để bảo quản các chủng có dạng hình sợi sinh bào tử hoặc không. Thời gian bảo quản có thể tới 1 năm.

- Cách bảo quản:

+ Hạt ngũ cốc (lúa, bobo) được rửa sạch.

+ Nấu cho hạt vừa nứt, để ráo nước.

+ Cho vào các ống nghiệm các hạt ngũ cốc nói trên.

+ Phủ trên mặt các hạt này một lớp bông thấm nước nấu hạt ngũ cốc.

- + Cây giống vi sinh vật trên lớp bông cho mọc thật dày.
- + Giữ ở nhiệt độ 15 - 20⁰C.

4. Phương pháp đông khô:

Phương pháp này làm cho tế bào mất nước ở trạng thái tự do. Đồng thời làm giảm, thậm chí làm ngừng hẳn quá trình phân chia của vi sinh vật. Nhờ đó chúng có khả năng chịu được nhiều tác động của ngoại cảnh.

- Phương pháp này dùng nhiều trong sản xuất, thời gian bảo quản lên tới vài chục năm.

*** Chú ý:**

Để việc bảo quản vi sinh vật có kết quả cần phải đảm bảo chọn giống thuần khiết, chưa bị biến đổi các đặc tính do đột biến ngẫu nhiên đồng thời còn phải chọn giai đoạn tối ưu trong chu trình sống để bảo quản.

BÀI 4 : CÁC PHƯƠNG PHÁP NHUỘM MÀU VÀ QUAN SÁT HÌNH THÁI VI SINH VẬT

I. 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 vazolin 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

a. 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.

b. Cách nhuộm :

- + Nhỏ 1 giọt thuốc nhuộm xanh mêtylen 0,001% lên phiến kính.
- + Nhỏ 1 giọt canh trường vi sinh vật với thuốc nhuộm.
- + Đặt lá kính lên giọt dịch.
- + Quan sát tiêu bản ở vật kính (x 10) rồi (x 40)

II. Phương pháp làm tiêu bản cố định :

2.1. Các bước tiến hành làm tiêu bản cố định

1. Làm vết bôi :

2. Cố định vết bôi :

Các cách cố định :

+ *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 và axêton 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 mêtylic ngâm khoảng 2 - 5 phút.
 - Ngâm vết bôi vào dung dịch axêton 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.

2.3. Nhuộm màu tiêu bản cố định

a. 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.

- Tuỳ 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.

b. Cách nhuộm :

- Đặt tiêu bản lên cầu thuỷ tinh (đặt nằm ngang miệng một khay nhân, hoặc thuỷ tinh).

- 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.

III. Quan sát đặc điểm sinh học của các nhóm vi sinh vật :

3.1. Quan sát đặc điểm sinh học của vi khuẩn (*Bacteria*).

Người ta thường làm tiêu bản giọt ép và giọt treo để quan sát hình thái vi khuẩn sau khi nuôi cấy chúng ở nhiệt độ 37⁰C sau 24 - 48h

3.2. Quan sát đặc điểm sinh học của xạ khuẩn (*Actinomycetes*)

Các đặc điểm sinh học đặc trưng cần quan sát

- Hình dạng bào tử
- Đặc điểm cuống sinh bào tử.
- Phương thức hình thành chuỗi bào tử

Cách quan sát

- Làm tiêu bản giọt ép với *Streptomyces griseus* cấy trên thạch nghiêng.

3.3. 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: Màu sắc, có vách ngăn hay không có vách ngăn.
- Đặc điểm của cơ quan sinh sản: hình dạng, cách sắp xếp các bộ phận của cơ quan sinh sản.
- Hình dạng, cấu tạo, cách sắp xếp của bào tử.

Cách quan sát:

- Làm tiêu bản nấm mốc không nhuộm màu
- Vẽ hình và nhận xét về hình dạng chung của sợi nấm; vị trí, hình dạng, cách sắp xếp của bào tử, thể bình, cuống thể bình, cuống bào tử đính của 2 giống nấm mốc trên.
- Thao tác sử dụng kính hiển vi soi nổi
- Làm tiêu bản nấm mốc nhuộm màu:

3.4. Quan sát đặc điểm sinh học của nấm men (*Yeasts*)

Những đặc điểm sinh học đặc trưng cần quan sát.

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

- Hình dạng, số lượng bào tử trong 1 túi bào tử.

Cách quan sát:

- Làm tiêu bản nhuộm đơn nấm men cấy trong môi trường dịch thể với xanh mêtylen Loeffler.
- Quan sát sự nảy chồi của nấm men.

IV. PHƯƠNG PHÁP NHUỘM KÉP - QUAN SÁT CẤU TẠO TẾ BÀO VI SINH VẬT

4.1 Các phương pháp nhuộm kép - Quan sát cấu tạo tế bào sinh vật:

- Nhuộm kép là phương pháp nhuộm trong đó người ta sử dụng 2 hay nhiều loại thuốc nhuộm trên 1 tiêu bản.
- Nguyên tắc của việc nhuộm kép
 - + Các cấu trúc khác nhau, thậm chí các phần khác nhau của một cấu trúc thường có tính chất lý học, hoá học cũng như khả năng bắt màu khác nhau.
 - + Việc sử dụng đồng thời các loại thuốc nhuộm trên cùng một tiêu bản cho phép ta có thể quan sát và phân biệt các cấu trúc dễ dàng hơn.

1. Phương pháp nhuộm Gram :

a. Nguyên tắc :

- Dựa trên khả năng bắt màu của tế bào chất và màng tế bào với thuốc nhuộm tím kết tinh và iôt mà hình thành nên hai loại phức chất khác nhau.
- + Loại phức chất thứ nhất vẫn giữ nguyên màu của thuốc nhuộm nên không bị rửa trôi khi xử lý bằng cồn. Vi sinh vật có phức chất này thuộc loại gram dương.
- + Loại phức chất thứ hai không còn giữ được màu của thuốc nhuộm nên mất màu khi xử lý bằng cồn và bắt màu của thuốc nhuộm bổ sung.

Vi sinh vật có phức chất này thuộc loại gram âm.

b. Cách tiến hành :

- Làm tiêu bản :
 - + Dùng que cấy lấy nước vô trùng để làm 3 vết bôi trên phiến kính (hai đầu và giữa phiến kính).
 - + Dùng que cấy lấy một chút khuẩn lạc của chúng làm vết bôi theo thứ tự sau:
 - Bên trái phiến kính là *Bacillus subtilis*
 - Bên phải phiến kính là *Escherichia coli*

- Ở giữa phiến kính là *Bac.subtilis* trộn lẫn với *E. coli*
- + Để khô vết bôi trong không khí hoặc cố định nhẹ trên ngọn đèn cồn.
- Nhuộm tiêu bản
- + Đặt 3 miếng giấy lọc lên 3 vết bôi.
- + Nhuộm tiêu bản bằng thuốc nhuộm tím kết tinh qua giấy lọc trong 1 phút (hình 50)
- + Nhuộm lugol trong 1 phút.
- + Rửa nước.
- + Tẩy bằng cồn trong 30 giây, để nghiêng tiêu bản nhỏ từ từ từng giọt cồn cho đến khi tan hết màu.
- + Rửa nước.
- + Nhuộm bổ sung Fuchsin hay Safranin từ 10 - 30 giây
- + Làm khô và soi tiêu bản với vật kính dầu.
- Kết quả:
- + Vết bôi của *Bac. subtilis* màu tím - gram dương.
- + Vết bôi của *Bac. subtilis* + *E.Coli* có màu hồng lẫn màu tím.
- + Vết bôi của *E.Coli* màu hồng - gram âm.

4.2. Phương pháp nhuộm bào tử của tế bào vi khuẩn

- Sự hình thành bào tử là một hình thức đổi mới tế bào khi gặp những điều kiện không thuận lợi trong chu trình sống
- Nguyên tắc nhuộm : Dựa trên cấu trúc đặc biệt của màng bào tử : dày, chắc, khó bắt màu, chứa nhiều lipid. Trước hết xử lý để tế bào chất bào tử dễ bắt màu bằng nhiệt và axit. Nhuộm màu cả tế bào chất của bào tử và tế bào bằng thuốc nhuộm có hoạt tính mạnh. Tẩy màu tế bào chất tế bào đi và nhuộm nó bằng thuốc nhuộm khác bổ sung. Nhờ đó tế bào chất của bào tử và tế bào chất tế bào bắt màu phân biệt.

Phương pháp Ôgietska :

- Làm vết bôi với *Bac. subtilis* đã nuôi cấy 2 tuần tuổi trên ống thạch nghiêng và để vết bôi khô tự nhiên.
- Nhỏ vài giọt HCl 0,5% lên vết bôi, hơi nóng trên ngọn đèn cồn cho bốc hơi, giữ 2 phút rồi rửa nước.
- Đặt lên vết bôi miếng giấy lọc rồi nhỏ Fuchsin Ziehl, hơi nóng cho đến khi bốc hơi. Nếu thuốc nhuộm cạn phải bổ sung ngay và giữ trong 5 phút.

- Bỏ giấy ra và rửa lại vết bôi bằng nước.
- Tẩy màu bằng cách nhúng phiến kính vào dung dịch H₂SO₄ 1% trong 2 phút.
- Rửa vết bôi bằng nước.
- Nhuộm vết bôi bằng xanh metylen Loeffler trong 5 - 15 phút.
- Rửa nước, để khô tự nhiên vết bôi.
- Quan sát tiêu bản trên kính hiển vi với vật kính đầu.
- Kết quả : Bào tử màu đỏ, tế bào chất màu xanh.

4.3. Phương pháp nhuộm nhân (chất nhân) của vi sinh vật

Ở các vi sinh vật bậc thấp, nhân chưa có cấu tạo điển hình (chất nhân chưa được bao bọc bởi màng nhân).

Ở các vi sinh vật bậc cao, nhân có cấu tạo điển hình (có màng nhân bao xung quanh chất nhân).

Thành phần hoá học của cá nhân và chất nhân đều là ADN, chỉ ở một số rất ít loài vi sinh vật là ARN.

- *Nguyên tắc :*

Do tính chất bắt màu của ADN trong nhân và ARN trong tế bào chất tương tự nhau.

Dùng HCl để làm tan ARN trong tế bào chất rồi mới tiến hành nhuộm màu ADN trong nhân.

- *Cách tiến hành :*

+ Làm tiêu bản từ ống thạch nghiêng cấy vi khuẩn sau 24h hoặc cấy nấm men sau 48h.

+ Để khô tự nhiên rồi cố định tiêu bản bằng hơi dung dịch axit osmic 2% trong 2 - 3 phút (có thể thay axit này bằng axit axêtic).

+ Đặt tiêu bản vào cốc thủy tinh có HCl 1N, đun cốc axit này ở 60⁰C và giữ trong 3 - 5 phút.

+ Rửa ngay tiêu bản bằng nước cất.

+ Nhỏ lên tiêu bản dung dịch Formalin 1%, giữ trong 1 - 2 phút.

+ Rửa lại tiêu bản bằng nước cất.

+ Nhuộm vết bôi bằng dung dịch 0,5 - 1% Fuchsin và giữ trong 1 - 2 phút.

+ Rửa thật sạch lớp thuốc nhuộm trên tiêu bản bằng nước cất.

+ Để khô, quan sát tiêu bản với vật kính dầu trên kính hiển vi.

* *Kết quả* :

- Nhân màu nâu đỏ thẫm, tế bào chất màu hồng.

BÀI 5 : CÁC PHƯƠNG PHÁP XÁC ĐỊNH SỐ LƯỢNG TẾ BÀO VI SINH VẬT

Trong bất kỳ một loại mẫu vật nào, muốn biết số lượng chung của các nhóm vi sinh vật cũng như số lượng riêng của mỗi nhóm thành phần, đều cần phải đếm số lượng tế bào của chúng.

Để xác định số lượng vi sinh vật trong đất, nước, không khí và dịch nuôi cấy ... người ta có thể sử dụng nhiều phương pháp khác nhau. Trong đó có 2 phương pháp dưới đây được dùng nhiều hơn cả :

- Phương pháp xác định trực tiếp số lượng tế bào bằng phiến kính có khung đếm Goriaep (phòng đếm hồng cầu).

- Phương pháp xác định gián tiếp số lượng tế bào bằng cách đếm số lượng khuẩn lạc mọc trên môi trường thạch.

Nói chung cả 2 phương pháp trên đều phải tiến hành theo 2 bước sau đây :

I. Chuẩn bị mẫu :

Để xác định gián tiếp hoặc trực tiếp tế bào vi sinh vật

1.1. Lấy mẫu :

Tùy theo loại vật phẩm cần xác định mà ta lấy mẫu để nghiên cứu với số lượng và khối lượng khác nhau cho phù hợp. Yêu cầu của việc lấy mẫu.

- Lấy mẫu có tính chất đại diện.

- Lượng mẫu lấy vừa phải, đủ để phân tích các đặc tính lý, hoá, sinh học.

- Dụng cụ lấy mẫu, chứa mẫu phải vô trùng.

- Lấy mẫu xong phải phân tích ngay và không được để quá 24h.

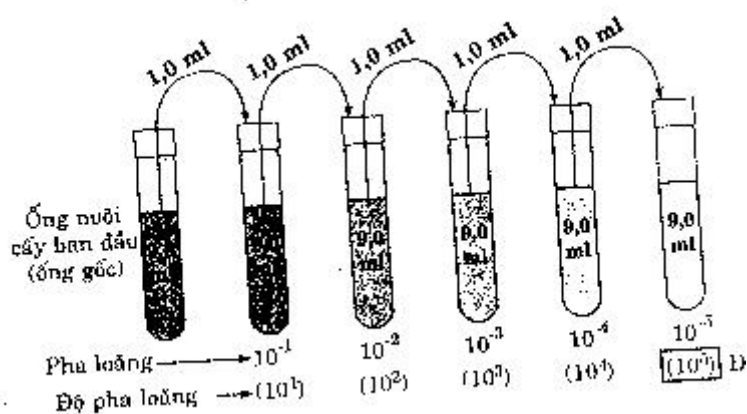
- Mẫu lấy phải có nhãn ghi ký hiệu và ghi vào sổ những đặc điểm của mẫu và nơi thu mẫu.

1.2. Pha loãng mẫu :

Chuẩn bị một số bình tam giác chứa 90ml nước cất vô trùng, một số ống nghiệm chứa 9ml nước cất vô trùng và một số ống hút (1ml) vô trùng.

a. Mẫu ở trạng thái lỏng :

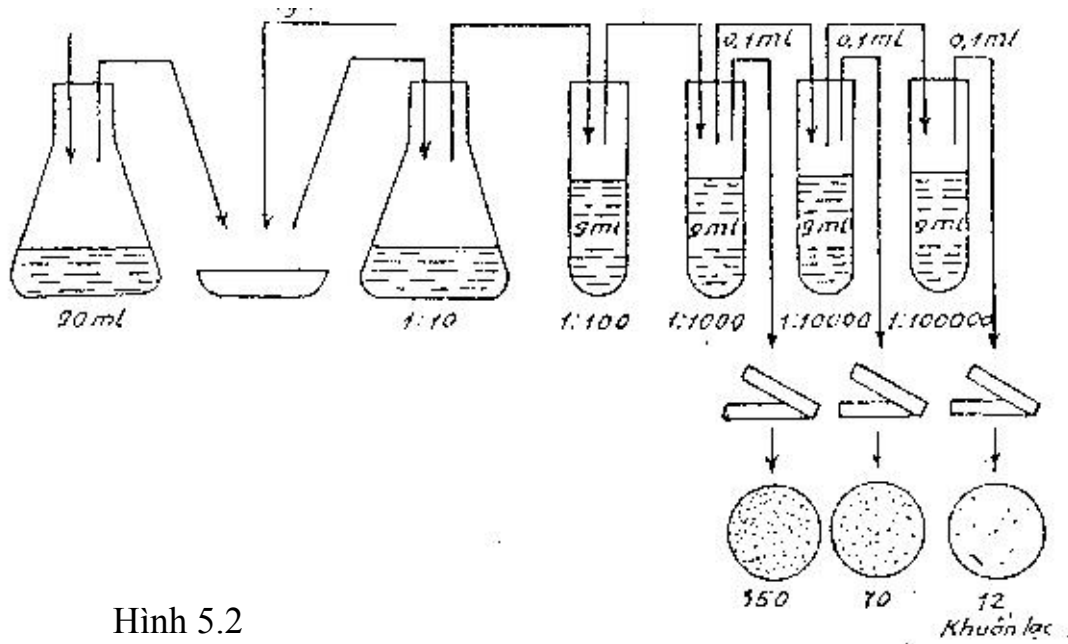
- Pha loãng mẫu theo dãy thập phân



Hình 5.1 : Phương pháp pha loãng mẫu theo dãy thập phân

b. Nếu mẫu nghiên cứu ở trạng thái đặc (như đất, lương thực, thực phẩm)

- Chuẩn bị 2 bình hình nón có dung tích 250 ml
- + Bình 1 chứa 90ml nước cất vô trùng
- + Bình 2 đã vô trùng và không chứa gì
- Khử trùng cối chày sứ bằng cách cho một ít cồn vào và đốt lên. Sau đó để nguội.
- Cân 1 g đất (hoặc mẫu) cho vào cối sứ và nghiền nát mẫu.
- Dùng toàn bộ nước ở bình 1 để chuyển toàn bộ mẫu sang bình 2.
- Lắc 5 phút, để lắng 30 giây rồi tiếp tục pha loãng mẫu như mẫu ở trạng thái lỏng.
- Tùy theo sự ước đoán số lượng vi sinh vật trong mẫu mà pha loãng nhiều hay ít



Hình 5.2

II. Phương pháp định lượng vi sinh vật :

Sự hiện diện của vi sinh vật có thể được 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) ...

2.1 Phương pháp định lượng trực tiếp :

Mật độ vi sinh vật đơn bào có kích thước lớn như nấm men, tảo ... có thể được xác định bằng cách đếm trực tiếp bằng buồng đếm trên kính hiển vi .Quy trình đếm trực tiếp cho phép xác định nhanh chóng mật độ vi sinh vật trong mẫu nhưng phương pháp này có một số nhược điểm là không phân biệt giữa tế bào sống và tế bào chết, dễ nhầm lẫn tế bào vi sinh vật với các hạt vật thể khác trong mẫu, khó đạt được độ chính xác cao, không thích hợp cho huyền phù vi sinh vật có mật độ thấp.

1. Đếm trực tiếp bằng buồng đếm hồng cầu :

Buồng đếm hồng cầu thường là một phiến kính dày 2 - 3 mm có một vùng đĩa đếm nằm giữa phiến kính và được bao quanh bởi một rãnh. Đĩa đếm thấp hơn bề mặt của phiến kính khoảng 1/10 mm, có hình tròn vì thế khi được phủ lên bằng một lá kính thì độ sâu của đĩa đếm sẽ đồng đều nhau. Vùng đĩa đếm có diện tích 1mm^2 và được chia thành 25 ô vuông lớn có diện tích mỗi ô là $1/25\text{mm}^2$ và 400 ô vuông nhỏ hơn, mỗi ô có diện tích $1/400\text{mm}^2$.

Khi thực hiện quan sát và đếm vi sinh vật, cho thêm vài giọt formalin vào trong mẫu, trộn đều. Pha loãng mẫu cần đếm sao cho trong mỗi ô nhỏ của buồng đếm có khoảng 5 - 10 tế bào vi sinh vật. Để đạt được độ pha loãng như vậy cần phải ước lượng được số lượng vi sinh vật trong mẫu, đồng thời phải thử vài lần trong quá trình pha loãng. Mẫu phải được pha loãng bằng dung dịch pha loãng chứa 0,1% pepton và 0,1% laurylsulphate và 0,01% methyl blue. Tất cả các dung dịch pha loãng đều cần phải được lọc trước khi sử dụng. Đặt một giọt mẫu được pha loãng vào vùng đếm trên buồng đếm ở khu vực buồng đếm. Chính thị trường sao cho một thị trường chứa trọn một ô lớn ($4 \times 4 = 16$ ô nhỏ). Đếm số tế bào hiện diện trong 1 ô lớn. Sau đó, chính thị trường tìm 1 ô lớn khác. Đếm số tế bào của ít nhất 5 ô lớn. Lấy trị số trung bình.

Cách tính mật độ tế bào như sau : thể tích của một ô lớn là $1/25\text{mm}^2 \times 1/10\text{m} = 1/250\text{mm}^3$ hay $1/250 \times 10^3\text{cm}^3 = 4 \times 10^{-6}$ ml. Như vậy, mật độ tế bào của huyền phù mẫu là : $N/\text{ml} = 0,25a \times 10^6$ tế bào/ml (trong đó a là số tế bào bình quân trong một ô lớn)

2.2. Phương pháp cấy gạt :

a. Phương pháp cấy gạt (hộp trái)

- Tiến hành pha loãng mẫu theo phương pháp đã nêu trên.
- Ghi vào đáy đĩa Petri có môi trường thạch các thông tin :
 - . Nồng độ pha loãng.
 - . Ngày cấy.
- Dùng pipet đã vô khuẩn lấy 0,1 ml dịch huyền phù cho vào mỗi đĩa thạch (tương đương với 2 giọt dịch). Số tế bào cấy trên bề mặt thạch phải được dàn đều và không nên vượt quá vài trăm.

Lưu ý : có thể dùng thể tích mẫu cấy từ 0,05 - 0,5 ml. Tuy nhiên, thể tích mẫu cấy càng nhỏ thì sai số có thể xảy ra càng lớn.

Khi tất cả các thể tích 0,1 ml tế bào ở các độ pha loãng khác nhau đều đã được chuyển lên bề mặt thạch của đĩa Petri, sử dụng que cấy gạt bằng thủy tinh để dàn đều các tế bào trên bề mặt thạch. Lưu ý rằng que cấy gạt thủy tinh phải được vô khuẩn trước khi được đưa vào đĩa Petri tiếp theo, bằng cách nhúng vào trong cồn, vẩy nhẹ để loại đi lượng cồn dư bám bằng que cấy, đốt cháy phần cồn còn lại trên que cấy trên ngọn lửa đèn cồn. Làm nguội que cấy bằng cách nhẹ nó vào bề mặt thạch, rồi dàn đều lượng chất lỏng chứa tế bào trên đó. Nếu thể tích chất lỏng đem cấy quá nhiều, các tế bào sẽ trôi dạt trong chất lỏng, và sau khi tế bào phân

chia, hai khuẩn lạc xuất phát từ một tế bào có thể hình thành. Các đĩa thạch được chuẩn bị một ngày trước khi cấy thường hấp thu nhanh lượng chất lỏng đem cấy. Lớp chất lỏng trên thạch càng mỏng, sự hấp thu xảy ra càng nhanh.

Dưới đây là phần thực nghiệm định lượng số tế bào vi sinh vật có trong mẫu bằng phương pháp đếm số khuẩn lạc trên thạch đĩa.

Cách tiến hành :

- Cho một ít giống vi sinh vật vào ống nghiệm chứa 1 ít nước cất vô khuẩn nhờ que cấy vòng để tạo huyền phù tế bào. Cán bộ hướng dẫn có thể chuẩn bị trước các dịch huyền phù tế bào có nồng độ nằm trong khoảng xác định.

- Pha loãng dịch huyền phù tế bào ở các nồng độ thích hợp như : 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} ... tiến hành cấy mẫu ở các độ pha loãng khác nhau vào các đĩa Petri (lập ba, tức là cấy mẫu ở mỗi độ pha loãng vào 3 đĩa Petri) theo hai phương pháp trên. Lưu ý rằng ở phương pháp cấy gạt, chỉ cấy 0,1 ml dịch mẫu lên môi trường thạch rắn đã đổ sẵn, còn đối với phương pháp đổ đĩa thì cấy 1 ml dịch mẫu vào đĩa trước khi thêm môi trường thạch lỏng đã nguội vào.

- Đặt các đĩa thạch vừa cấy vào tủ ẩm cài ở nhiệt độ 30°C và ủ trong 48 giờ.

- Kết thúc thời gian ủ, lấy các đĩa thạch ra, tiến hành đếm khuẩn lạc và tính số lượng tế bào trong 1ml mẫu theo công thức đã nêu trên.

Mật độ tế bào vi sinh vật trong mẫu ban đầu tính từ số liệu của độ pha loãng D_1 được tính theo công thức là :

$$M_1 (\text{CFU/ml}) = A_i \times D_i / V$$

Trong đó : A_i là số khuẩn lạc trung bình/ đĩa

D_i là độ pha loãng

V là dung tích huyền phù tế bào cho vào mỗi đĩa (ml)

Mật độ tế bào trung bình M_1 trong mẫu ban đầu là trung bình cộng của M_i ở các nồng độ pha loãng khác nhau.

2.3. Phương pháp định lượng bằng cách thống kê VSV bằng phương pháp pha loãng tới hạn:

Phương pháp MPN (Most Probable Number)

Phương pháp MPN (phương pháp có số xác suất cao nhất ; số tối khả) 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 số lượng vi sinh vật có xác suất lớn nhất hiện diện trong một đơn vị thể tích mẫu. Đây là phương pháp định lượng dựa trên kết quả định tính của một loạt thí nghiệm được lặp lại ở một số độ pha loãng khác nhau. Thông thường, việc định lượng này được thực hiện lặp lại 3 lần ở 3 độ pha loãng bậc 10 liên tiếp, tổng cộng $3 \times 3 = 9$ ống nghiệm.

Quy trình thực hiện định lượng theo phương pháp này là như sau :

Cho vào các ống nghiệm có chứa môi trường thích hợp cho sự tăng trưởng của đối tượng vi sinh vật cần định lượng một thể tích chính xác dung dịch mẫu ở 3 nồng độ pha loãng bậc 10 liên tiếp (ví dụ 1/10, 1/100, 1/1000). Ủ ở nhiệt độ và thời gian thích hợp. Dựa vào kết quả biểu kiến chứng minh sự tăng trưởng của vi sinh vật cần kiểm định trong từng ống nghiệm (thường là các hiện tượng như sinh hơi, đổi màu, đục ...), ghi nhận số lượng các ống nghiệm dương tính ở từng độ pha loãng. Sử dụng các số liệu này và dựa vào bảng Mac Crady suy ra mật độ vi sinh vật được trình bày dưới dạng số MPN/100ml hay số MPN/1g mẫu. Độ chính xác của trị số MPN phụ thuộc vào số lượng ống nghiệm lặp lại trong mỗi độ pha loãng ;

Bảng 5.1: Bảng tra mpn dùng cho loạt 3 ống nghiệm ở 3 nồng độ pha loãng liên tiếp

Số lượng ống dương tính			Số MPN/100 ml	Số lượng ống dương tính			Số MPN/100 ml
Số mo mẫu sử dụng				Số mo mẫu sử dụng			
10	1	0,1		10	1	0,1	
0	0	0	-	2	0	0	9
0	0	1	3	2	0	1	14
0	0	2	6	2	0	2	20
0	0	3	9	2	0	3	26
0	1	0	3	2	1	0	15
0	1	1	6	2	1	1	20
0	1	2	9	2	1	2	27

0	1	3	12	2	1	3	34
0	2	0	6	2	2	0	21
0	2	1	9	2	2	1	28
0	2	2	12	2	2	2	35
0	2	3	16	2	2	3	42
0	3	0	9	2	3	0	29
0	3	1	13	2	3	1	36
0	3	2	16	2	3	2	44
0	3	3	19	2	3	3	53
1	0	0	4	2	0	0	23
1	0	1	7	3	0	1	39
1	0	2	11	3	0	2	64
1	0	3	15	3	0	3	95
1	1	0	7	3	1	0	43
1	1	1	11	3	1	1	75
1	1	2	15	3	1	2	120
1	1	3	19	3	1	3	160
1	2	0	11	3	2	0	93
1	2	1	15	3	2	1	150
1	2	2	20	3	2	2	210
1	2	3	24	3	2	3	290
1	3	0	16	3	3	0	240
1	3	1	20	3	3	1	460
1	3	2	24	3	3	2	1100
1	3	3	29	3	3	3	-

Bảng 5.2 : Bảng tra mpn dùng cho loạt 5 ống nghiệm ở 3 nồng độ pha loãng liên tiếp

Số lượng ống dương tính			Số MPN/100 ml	Số lượng ống dương tính			Số MPN/1 00 ml
Số mo mẫu sử dụng				Số mo mẫu sử dụng			
10	1	0,1	10	1	0,1		
0	0	0	0	4	0	2	20
0	0	1	2	4	0	3	25
0	0	2	4	4	1	0	17
0	1	0	2	4	1	1	20
0	1	1	4	4	1	2	25
0	1	2	6	4	2	0	20
0	2	0	4	4	2	1	25
0	2	1	6	4	2	2	30
0	3	0	6	4	3	0	25
1	0	0	2	4	3	1	35
1	0	1	4	4	3	2	40
1	0	2	6	4	4	0	35
1	0	3	8	4	4	1	40
1	1	0	4	4	4	2	45
1	1	1	6	4	5	0	40
1	1	2	8	4	5	1	50
1	2	0	6	4	5	2	55
1	2	1	8	4	0	3	25
1	2	2	10	5	0	4	30
1	3	0	8	5	0	0	45
1	3	1	10	5	0	3	60
1	4	0	11	5	0	4	75
2	0	0	5	5	1	0	35
2	0	1	7	5	1	1	45
2	0	2	9	5	1	2	65
2	0	3	12	5	1	3	85
2	1	0	7	5	1	4	115
2	1	1	9	5	2	0	50
2	1	2	12	5	2	1	70

2	2	0	9	5	2	2	95
2	2	1	12	5	2	3	120
2	2	2	14	5	2	4	150
2	3	0	12	5	2	5	175
2	3	1	14	5	3	0	80
2	4	0	15	5	3	1	110
3	0	0	8	5	3	2	140
3	0	1	11	5	3	3	175
3	0	2	13	5	3	4	200
3	1	0	11	5	3	5	250
3	1	1	14	5	4	0	130
3	1	2	17	5	4	1	170
3	1	3	20	5	4	2	225
3	2	0	14	5	4	3	275
3	2	1	17	5	4	4	350
3	2	2	20	5	4	5	425
3	3	0	17	5	5	0	250
3	3	1	20	5	5	1	350
3	4	0	20	5	5	2	550
3	4	1	25	5	5	3	900
3	5	0	25	5	5	4	1600
4	0	0	13	5	5	5	1800
4	0	1	17	-	-	-	-

BÀI 6 : XÁC ĐỊNH KHẢ NĂNG PHÂN GIẢI CÁC CHẤT HỮU CƠ KHÔNG CHỨA NITƠ CỦA VSV

I. XÁC ĐỊNH KHẢ NĂNG LÊN MEN (RƯỢU ETYLIC) CỦA NẤM MEN

1.1. Tiến hành quá trình lên men rượu

- Làm môi trường lên men từ nước ép trái cây : nho, dâu, dứa, mơ v.v... hoặc từ nước mạch nha.

- Điều chỉnh độ pH = 4 - 6

- Thanh trùng dịch ép trái cây theo phương pháp Tyndal hoặc khử trùng bằng nồi hấp ở áp suất 0,75 atm trong 20 phút.

- Để môi trường nguội tới 30°C thì cấy men giống vào với tỉ lệ 2 - 5% thể tích dịch lên men. Đậy nút bình lên men.

- Đặt bình có dịch lên men vào tủ ấm ở 28 - 30°C, sau 1-2 ngày lấy ra.

1.2. Xác định các đặc trưng của quá trình.

a. Xác định các đối tượng vi sinh vật tham gia:

- Làm tiêu bản giọt ép, giọt treo hay nhuộm đơn để thấy được hình dạng tế bào nấm men

- Yêu cầu : quan sát tiêu bản ở vật kính (x40) trên kính hiển vi. Chú ý nhận biết các dấu hiệu đặc trưng về hình thái của mỗi loài.

b. Xác định chất lượng men giống trước khi cho lên men:

- Xác định tỉ lệ tế bào nảy chồi trong dịch men giống bằng phương pháp đếm số lượng tế bào nảy chồi trên khung đếm Goriaep.

- Xác định tỉ lệ tế bào sống và chết bằng tiêu bản nhuộm sống nấm men (để phân biệt 2 loại tế bào này).

- Xác định số lượng tế bào/1ml dịch men giống bằng phương pháp đếm số lượng tế bào trên khung đếm Goriaep.

c. Xác định tốc độ quá trình lên men thông qua lượng CO₂ tạo thành :

* Nguyên tắc :

- Dựa vào phương trình tổng quát của quá trình lên men :



- Lượng đường phân giải trong quá trình lên men càng nhiều thì lượng CO₂ tạo ra càng lớn.

- Tốc độ quá trình lên men chính là lượng CO₂ bay ra từ 1 thể tích môi trường nhất định trong 1 khoảng thời gian xác định.

*** Cách tiến hành :**

- Để xác định lượng CO_2 tạo ra trong quá trình lên men, người ta sử dụng một dụng cụ chế tạo theo nguyên tắc của bình lên men Smith

- Dụng cụ này gồm các bộ phận sau :

+ Một bình cầu chứa 50ml dịch lên men và 10ml dịch men giống.

+ Miệng hình cầu có đậy bằng 1 nút cao su.

+ Bình cầu được nối với 1 lọ thủy tinh miệng rộng qua 1 ống thủy tinh uốn cong. Một đầu ống thủy tinh nằm ở phần trên dịch lên men trong bình cầu. đầu kia của ống nhúng vào 1 ống nghiệm chứa đầy nước ép ngược trong lọ thủy tinh (hình 6.1).



)2

- Đặt dụng cụ lên men này vào tủ ấm có nhiệt độ $32 - 35^\circ\text{C}$.

- Sau một thời gian, quan sát thấy bọt khí CO_2 thoát ra theo ống thủy tinh và đẩy mực nước trong ống nghiệm xuống.

- Lượng nước bị đẩy xuống càng nhiều chứng tỏ lượng CO_2 tạo ra càng lớn.

- Có thể xác định được thể tích lượng CO_2 này bằng cách thay ống nghiệm thường bằng ống nghiệm có vạch chia từ 1 - 25ml.

- Căn cứ vào thể tích mực nước hạ xuống ta biết được thể tích CO_2 được tạo thành trong quá trình lên men tại các thời điểm cần xác định. (Sau khi lên men 24h, 48h...). Phương pháp này dùng để định lượng CO_2 trong quá trình lên men.

d. Định tính CO_2 được tạo ra:*** Nguyên tắc :**

- Dựa trên phản ứng khi cho CO_2 đi qua dung dịch $\text{Ba}(\text{OH})_2$ hoặc nước vôi trong sẽ làm cho dung dịch này bị đục.

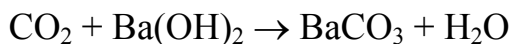
*** Cách tiến hành :**

- Cho vào ống nghiệm :

+ 5ml dịch lên men.

+ 1ml dung dịch $\text{Ba}(\text{OH})_2$ 10%

- Dùng kẹp gỗ kẹp ống nghiệm và đun nhẹ trên ngọn đèn cồn.
- Để lắng ta sẽ thấy có kết tủa trắng do BaCO_3 được tạo thành theo phản ứng:



e. Các phản ứng định tính rượu êtylic:

** Nguyên tắc chung :*

Dựa vào các phản ứng đặc trưng của rượu êtylic với các chất để xác định sự có mặt của rượu trong quá trình lên men.

** Cách tiến hành :*

- Phản ứng tạo thành indoform:
- + Cho vào ống nghiệm các chất sau :
 - . 5ml dịch lên men.
 - . 5ml NaOH
 - . 0,1 g iôt tinh thể dạng bột.
- + Đun nóng ống nghiệm hay ngâm ống nghiệm vào nồi cách thủy ở 60°C cho đến khi iốt tan hết và mất màu.
- + Để nguội sẽ xuất hiện tinh thể indoform màu vàng (CHI_3). Sự tạo thành CHI_3 do sự có mặt của rượu êtylic trong dịch lên men

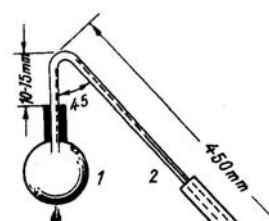
- Phản ứng với $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$:

- + Cho vào ống nghiệm 1 (thí nghiệm) :
 - . 2ml dịch lên men.
 - . Thêm 1-2 ml H_2SO_4 đậm đặc
 - . Nhỏ từng giọt $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 1% cho đến khi xuất hiện màu xanh lục.
- + Cho vào ống nghiệm 2 (đối chứng):
 - . 2ml dịch chưa lên men
 - . 1-2ml H_2SO_4 đậm đặc
 - . Nhỏ từng giọt $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 1%

Quan sát sự chuyển màu của 2 ống nghiệm trên vào giải thích kết quả.

** Các bước phân tích :*

Trong bình định mức loại 100ml, ta cho 20ml dịch nuôi cấy đã được tách bỏ các tế bào bằng cách để lắng, lọc hoặc ly tâm. Bổ sung nước



cất cho tới 100ml, khuấy trộn và lấy ra 10ml cho vào bình cầu đáy tròn loại có dung tích 50 - 75ml. Trong bình nhận loại có 3 chỗ phình hình cầu, ta rót 25ml dung dịch bicromat và 10ml H₂SO₄ đặc. Đậy bình cầu bằng nút cao su có gắn với một ống dẫn mà đầu cuối thót lại của nó phải chạm tới đáy của bình nhận (hình 6.2). Sau đó trong 10 - 15 phút cất 2/3 dung tích bình. Dung dịch bicromat trong thời gian đó sẽ chuyển từ màu da cam sang màu nâu bản.

Sau khi cất, để tránh cho các chất dịch từ bình nhận không trào trở lại, ta tháo bình nhận ra rồi mới bỏ đèn đi.

Dem chất dịch trong bình nhận chuyển vào một bình định mức

II. XÁC ĐỊNH KHẢ NĂNG LÊN MEN LACTIC CỦA VI KHUẨN LACTIC

2.1. Tiến hành quá trình lên men lactic

* Cách 1:

- Nguyên liệu:	Dưa cải	0,5 kg
	Nước muối 3 - 3,5%	500 ml
	Đường	2 thìa cà phê

- Cách làm:

+ Dưa cải bẹ để héo, rửa sạch, cắt khúc, để ráo.
+ Pha 500ml dung dịch NaCl 3 - 3,5% và bổ sung thêm vào đó 2 thìa cà phê đường.

+ Xếp dưa vào lọ thuỷ tinh và ém chặt.

+ Đê nước muối từ từ cho ngập dưa.

+ Lên men ở nhiệt độ 28 - 30⁰C trong 2 - 3 ngày.

+ Vi khuẩn lactic sống trên bề mặt rau quả là tác nhân của quá trình này.

* Cách 2:

+ Cho vào bình tam giác - 150 ml sữa tươi đã khử trùng.

- 3 thìa cà phê sữa chua đã khuấy cho thật nhuyễn

+ Lắc bình để men giống tan đều

+ Để ủ ấm 30 - 35⁰C trong 3 - 4h ta được sữa (chua) đã đông tụ.

2.2. Xác định các đặc trưng của quá trình

a. Xác định các đối tượng vi sinh vật tham gia:

- Làm tiêu bản giọt ép từ nước dưa cải chua để quan sát được hình dạng, sự sắp xếp tế bào của các vi khuẩn lên men lactic.

- Làm tiêu bản giọt treo để quan sát sự chuyển động của những vi khuẩn lactic từ dịch trong của sữa chua.

- Yêu cầu nhận biết được 2 dạng cầu khuẩn và trực khuẩn của các vi khuẩn lên men lactic.

b. Xác định sự có mặt của axit lactic trong quá trình lên men bằng các phản ứng định tính

* Nguyên tắc chung:

- Dựa trên các phản ứng màu đặc trưng của axit lactic với một số hợp chất khác nhau để xác định sự có mặt của chúng trong quá trình lên men lactic.

* Cách tiến hành:

- Phản ứng chuyển axit lactic thành axêtaldehyt:

+ Cho vào ống nghiệm:

- 5 ml dịch lên men.
- 1 ml H₂SO₄ 10%.
- Đun sôi
- Thêm từng giọt KMnO₄ 2%

+ Trước khi đun để 1 miếng giấy lọc tẩm dung dịch AgNO₃ trong amôniắc.

Nếu trong dịch nghiên cứu có axit lactic thì axit này sẽ được chuyển thành axêtaldehyt và làm đen miếng giấy lọc.

- Định lượng axit lactic bằng phương pháp chuẩn độ:

+ Cho vào ống nghiệm:

- 10 ml nước dưa.
- 20 ml nước cất
- 1 - 2 giọt phenolphtalêin.
- Lắc thật kỹ để trộn đều các chất.

+ Chuẩn độ dung dịch bằng NaOH 0,1N.

+ Cách tính:

Khối lượng axit lactic (trong 10 ml dịch lên men)

= Số ml dung dịch NaOH 0,1n (dùng để chuẩn độ) x 0,009g
(1 ml dung dịch NaOH tương đương 0,009g axit lactic)

III. XÁC ĐỊNH QUÁ TRÌNH LÊN MEN ACETIC CỦA VI SINH VẬT:

3.1. Tiến hành thí nghiệm lên men acetic

- Cho vào dụng cụ thủy tinh có miệng rộng, thể tích 100ml.
 - + 30 - 40 ml bia.
 - + 0,5ml rượu êtylic (chất giàu năng lượng).
 - + 3 - 5ml axit axêtic 1N để axit hoá môi trường.
- Để dụng cụ này ngoài không khí vài giờ rồi đậy bằng vải màn mỏng, cho vào tủ ấm 25 - 30°C.
- Sau 2 - 3 ngày trên miệng dụng cụ sẽ thấy xuất hiện 1 lớp váng vi khuẩn axêtic trên bề mặt môi trường.

3.2. Xác định các đặc trưng của quá trình lên men axêtic

a. Xác định thành phần loài vi sinh vật tham gia

- Làm tiêu bản để quan sát vi khuẩn acetic từ lớp màng trắng của dấm.
- Tiến hành nhuộm đơn tiêu bản bằng xanh mêtylen hoặc Fuchsin, Lugol.
- Quan sát tiêu bản bằng vật kính dầu (x 100).

b. Các phản ứng định tính axit axêtic:

* Nguyên tắc:

Dựa vào những phản ứng đặc trưng của axit axêtic với các chất khác nhau để xác định sự có mặt của axit này trong quá trình lên men.

* Cách tiến hành:

- Phản ứng tạo thành êtyl axêtat:
 - + Cho vào ống nghiệm các chất sau:
 - 5 ml dịch lên men.
 - 0,5 ml rượu êtylic 96%.
 - 3 ml H₂SO₄ đậm đặc.

+ Đun nóng ống nghiệm trên đèn cồn và thấy mùi thơm bay ra do êtyl axêtat tạo thành. Điều này chứng tỏ trong thành phần dịch lên men có axit axêtic.

- Phản ứng tạo thành sắt axêtat:
 - + Cho vào ống nghiệm các chất sau:

- 3 ml dịch lên men
- 1 ml NaOH 20%
- Vài giọt dung dịch FeCl_3 5%

+ Lắc đều ống nghiệm và đun nóng trên ngọn đèn cồn. Nếu dung dịch có axit axêtic thì sẽ có màu đỏ thẫm do sắt axêtat được tạo thành.

c. Phản ứng định lượng axit axêtic

+ Cho vào bình tam giác có thể tích 100 ml

10 ml dịch lên men

1 - 2 giọt dung dịch phenolphthalêin 0,1%

+ Chuẩn độ bằng dung dịch NaOH 0,1N

+ Tính số gam axit axêtic trong 10 ml dịch lên men (Biết rằng 1ml NaOH 0,1N tương đương với 0,006g axit axêtic).

IV. XÁC ĐỊNH QUÁ TRÌNH PHÂN GIẢI XENLULOZA CỦA VI SINH VẬT

4.1. Tiến hành quá trình phân giải hiếu khí xenlulôza

- Cho vào ống nghiệm 4 - 5 ml môi trường Vinogradski có thành phần sau (g):

KNO_3	2,5g
KH_2PO_4	1,0g
MgSO_4	0,5g
NaCl	0,5g
FeSO_4	0,01g
$\text{Mn}_2(\text{SO}_4)_3$	0,01g
Nước cất	200 ml

- Nhúng vào dung dịch trong ống nghiệm một dải giấy lọc (20 x 1,5 cm)

- Dùng kẹp sắt kẹp một đầu dải giấy vào miệng ống nghiệm.

- Cho vào ống nghiệm một cục đất nhỏ (nguồn vi sinh vật) rồi đặt ống nghiệm vào tủ ấm, giữ ở 30°C trong 7 - 15 ngày.

- Các vi sinh vật phân giải xenlulôza phát triển, tiết ra men xenlulaza làm cho giấy bị phân huỷ, hoá nhày có màu vàng, hồng, lục, chất nhày có màu sắc đó chính là khuẩn lạc của vi khuẩn.

- Xác định các đối tượng vi sinh vật tham gia quá trình phân giải xenlulôza hiếu khí

Để quan sát hình thái các vi sinh vật hiếu khí tham gia vào quá trình phân giải này ta làm tiêu bản từ các chất nhày trên bề mặt giấy lọc

- Nhuộm đơn vết bôi bằng Fuchsin.
- Quan sát tiêu bản dưới kính hiển vi với vật kính dầu (x 100).

4.2. Tiến hành quá trình phân giải kỵ khí xenlulôza

- Cho vào ống nghiệm 10ml môi trường có thành phần như sau (%):

KNH_4PO_4	-	0,2%
KH_2PO_4	-	0,1%
CaCl_2	-	0,03%
Peptôn	-	0,1%
MgSO_4	-	0,05%
CaCO_3	-	0,5%

- Cho một dải giấy lọc (10 cm x 1,5 cm) ngập trong ống nghiệm có môi trường.

- Đun sôi nhẹ ống nghiệm và bỏ vào một cục đất nhỏ để cấy nguồn vi sinh vật có bào tử.

- Để ủ ấm ở 30°C và 60°C trong 1 - 2 tuần.

- Vi khuẩn phân giải Xenluloza kỵ khí phát triển ở 60°C sẽ làm cho môi trường đục lên, phiến giấy lọc có màu vàng, nhày và nát vụn dần ra.

- Xác định thành phần loài vi sinh vật phân giải Xenluloza kỵ khí

- Làm tiêu bản từ chỗ nhày của giấy và nhuộm đơn bằng Fuchsin.

- Quan sát tiêu bản dưới kính hiển vi với vật kính dầu (x 100).

BÀI 7 : XÁC ĐỊNH KHẢ NĂNG PHÂN GIẢI CÁC CHẤT HỮU CƠ CHỨA NITƠ CỦA VI SINH VẬT

I. Xác định khả năng phân giải protein của vi sinh vật.

1.1. Thực hiện quá trình amôn hoá prôtít

- Cho vào bình tam giác có thể tích 100 - 150ml
 - + 3 - 5g thịt
 - + 20 - 30ml nước cất
 - + Một cục đất nhỏ đã nghiền ra để cung cấp nguồn vi sinh vật.
- Đun nóng bình tam giác ở nhiệt độ 80 - 90⁰C để diệt các tế bào sinh dưỡng và giữ lại những tế bào mang bào tử.
- Để bình vào tủ ấm ở nhiệt độ 27 - 28⁰C trong 7 ngày.
- Kẹp một miếng giấy quỳ đỏ trên miệng ống nghiệm để xác nhận NH₃ được giải phóng ra trong quá trình phân giải prôtít.

1.2. Xác định các đặc trưng của quá trình

a. Xác định thành phần loài vi sinh vật tham gia:

- Làm tiêu bản từ dịch phân giải prôtít sau 2 - 4 ngày.
- Nhuộm Gram hay nhuộm đơn vết bôi.
- Quan sát tiêu bản bằng vật kính dầu (x 100) trên kính hiển vi.

b. Các phản ứng định tính một số sản phẩm chủ yếu của quá trình phân giải prôtít

* Nguyên tắc:

Dựa trên những phản ứng màu, phản ứng kết tủa đặc trưng của các sản phẩm trong quá trình phân giải prôtít với các hoá chất khác nhau để xác nhận sự có mặt của chúng trong các quá trình này.

* Cách tiến hành:

- Xác định sự có mặt của prôtít trong quá trình amôn hoá prôtít bằng phản ứng màu:

- + Cho vào ống nghiệm:
 - 5ml dung dịch lên men thối.
 - 1ml dung dịch NaOH 30%
 - 0,5ml dung dịch CuSO₄ 1%

+ Đun nhẹ ống nghiệm cho tới sôi

+ Kết quả: Dung dịch có màu xanh tím nếu trong đó có prôtít. Dung dịch có màu hơi đỏ nếu trong đó có peptôn.

- Phản ứng định tính NH_3

Có thể phát hiện NH_3 theo cách sau:

- Cho dịch lên men thổi vào 1 bình tam giác.
- Đặt giấy quỳ đã tẩm nước lên miệng bình nhưng không được để giấy quỳ chạm vào dịch lên men.
- Đậy nút vào miệng bình và dùng nilon bao ngoài cho kín phần nút lại.

* Kết quả: Nếu có NH_3 bay ra thì giấy quỳ đỏ sẽ chuyển thành màu xanh. ngược lại nếu dung dịch lên men không có NH_3 bay ra thì giấy quỳ vẫn giữ nguyên màu đỏ của nó.

- Phản ứng định tính indol:

Indol là sản phẩm được hình thành khi vi sinh vật phân huỷ các axit amin có vòng benzen (như triptophan).

Có thể phát hiện indol bằng cách sau:

Cho vào ống nghiệm:

3 - 4 ml dịch lên men sau 24 - 48h.

Nhỏ vài giọt thuốc thử Ehrlich vào.

* Kết quả: Dung dịch tạo thành có màu đỏ của Rosindol do sự có mặt của indol trong dịch lên men.

+ Cách 2:

Cho vào ống nghiệm:

5ml dịch lên men

0,5ml H_2SO_4 10%

Lắc kỹ rồi cho thêm:

0,5ml KNO_2 0,01%

* Kết quả: Màu đỏ của Nitritindol được tạo thành do trong dịch lên men có mặt indol.

- Phản ứng định tính H_2S :

H_2S được hình thành khi vi sinh vật phân prôtít có chứa lưu huỳnh.

Có thể thử khả năng tạo H_2S bằng 1 trong các cách sau:

+ Cách 1:

- Cho vào ống nghiệm hay bình tam giác dịch lên men.
- Kẹp vào miệng bình (hay miệng ống nghiệm) 1 tờ giấy lọc tẩm axetat chì).
- Kết quả: Giấy lọc chuyển sang màu đen do trong dịch lên men có mặt H_2S .

+ Cách 2:

- Đổ vào ống nghiệm môi trường thạch chì (môi trường thạch có 0,1% axetat chì) và để ở dạng ống thạch đứng.
- Dùng que cấy nhọn lấy sinh khối vi khuẩn amôn hoá prôtít và cấy trích sâu vào môi trường thạch từ 2 - 3 đường cấy.
- Nuôi các vi khuẩn này ở nhiệt độ thích hợp trong 20 - 41h.
- Sau đó lấy ống nghiệm ra quan sát:
Nếu các đường cấy có màu đen chứng tỏ có H_2S sinh ra trong môi trường.
Nếu các đường cấy có màu không thay đổi chứng tỏ không có H_2S sinh ra trong môi trường.

BÀI 8 : PHƯƠNG PHÁP XÁC ĐỊNH KHẢ NĂNG TẠO SẢN PHẨM BẬC HAI Ở VI SINH VẬT

I. Xác định khả năng sinh kháng sinh của vi sinh vật

1.1. Phân lập giống vi sinh vật

- Cân 1g đất
- Nghiền đất trong cối sứ
- Hoà đất với 10ml nước vô khuẩn
- Cho vào bình tam giác dung tích 200ml với 90ml nước vô khuẩn
- Tiến hành pha loãng cho tới khi tách được từng tế bào riêng biệt.
- Tách tế bào trên môi trường thạch đĩa bằng phương pháp cấy gạt - Ủ thạch đĩa ở 37⁰C trong 1-2 ngày
- Khi khuẩn lạc nhỏ hình thành, phân lập và nuôi trên môi trường thạch nghiêng.
- Dùng các giống đã phân lập, nuôi chúng trong môi trường lỏng ở máy lắc, nhiệt độ phòng.
- Xác định hoạt tính chất kháng sinh
- Xác định hoạt tính chất kháng sinh được tạo ra trong dung dịch lên men như trình bày dưới đây.

1.2. Xác định hoạt tính chất kháng sinh

a/ Phương pháp kiểm tra sơ bộ (phương pháp Kolmen và Boerner)

- Trên môi trường thạch đĩa , cấy vi sinh vật kiểm tra theo một đường thẳng.
- Ủ trong điều kiện nhiệt độ bình thường
- Sau đó cấy vi khuẩn có khả năng bị ức chế bởi kháng sinh nghiên cứu
- Đem ủ ở nhiệt độ tương tự như trên
- Sau 3-4 ngày, nhận xét và ghi kết quả. Nếu vi sinh vật có khả năng ức chế thì sẽ xuất hiện vùng vô khuẩn – vùng không có sự phát triển của vi sinh vật.

b/ Phương pháp thổi thạch

- Nuôi cấy vi sinh vật vào thạch đĩa
- Dùng cái đột nút cao su, ấn nhẹ lên thổi thạch và lấy thổi thạch ra.
- Dùng kẹp vô khuẩn ấn thổi thạch vào đĩa thạch đã nuôi vi sinh vật kiểm định và đặt thổi thạch vào chỗ cũ. Nuôi chúng trong điều kiện phòng thí nghiệm, sau đó lấy ra đo vòng vô khuẩn xung quanh lỗ đục.

c/ Phương pháp dùng ống thép không gỉ

- Cấy vi sinh vật kiểm định vào đĩa petri với môi trường thạch dinh dưỡng theo phương pháp đổ đĩa

- Khi thạch đông, dùng kẹp vô khuẩn gấp 6 ống thép không gỉ đặt nhẹ nhàng vào 6 vị trí đều nhau trên mặt thạch. Ống thép không gỉ có chiều cao 0,1mm, đường kính bên ngoài 8mm, đường kính trong 6mm. Nếu không có ống thép không gỉ có thể sử dụng ống bằng sứ hoặc thủy tinh.

- Dùng một ống nhỏ giọt có chứa chất kháng sinh cho vào ống thép.

- Đặt các đĩa thạch vào tủ ẩm trong thời gian 3-4 giờ.

- Xác định độ lớn vòng vô khuẩn.

d/ Phương pháp dùng khoan giấy lọc

- Dùng giấy lọc và cắt chúng ra thành những hình tròn có đường kính 6mm

- Khử trùng giấy lọc (bằng nhiệt khô)

- Tẩm dung dịch chứa chất kháng sinh cần nghiên cứu

- Sấy miếng giấy này ở 40⁰C trong 1 giờ.

- Dùng kẹp vô trùng đặt miếng giấy này vào đĩa petri đã nuôi sẵn vi sinh vật kiểm định sao cho những miếng giấy này có một khoảng cách đều nhau.

- Đặt đĩa petri có những miếng giấy trên vào tủ ẩm 37⁰C trong thời gian 16-18 giờ.

- Lấy ra đo vòng vô khuẩn.

BÀI 9 : PHƯƠNG PHÁP THU NHẬN VÀ XÁC ĐỊNH HOẠT TÍNH ENZYM TỪ VI SINH VẬT

I. THU NHẬN CHẾ PHẨM ENZYM VI SINH VẬT THÔ TỪ PHƯƠNG PHÁP NUÔI CÂY BỀ MẶT

1.1. Nguyên tắc

Trong quá trình phát triển của vi sinh vật, enzym luôn luôn được tổng hợp để tham gia vào quá trình đồng hoá và quá trình dị hoá.

Dưới đây là phần thực nghiệm được tiến hành để thu nhận chế phẩm enzym thô.

1.2. Nguyên liệu và hoá chất

1. Giống vi sinh vật được dùng trong thí nghiệm là nấm sợi *Aspergillus oryzae*. Nấm sợi này có thể sinh tổng hợp enzym amylase, protease và cả cellulase tùy theo cơ chất cảm ứng mà ta đưa vào.

2. Môi trường bán rắn cơ bản gồm:

- Cám 70%

- Trấu 25%

- Các nguyên liệu chứa cơ chất cảm ứng để tổng hợp ra enzym tương ứng 5%

- Độ ẩm môi trường là 60 - 65%

3. Thiết bị tiệt trùng

4. Các dụng cụ thuỷ tinh dùng trong nuôi cấy gồm đĩa Petri, bình tam giác 250 ml, bình tam giác 1000 ml.

5. Khay hoặc các dụng cụ đan bằng tre.

6. Tủ ẩm

1.3. Cách tiến hành

1. Chuẩn bị 50g môi trường cơ bản trên trong mỗi bình tam giác có dung tích 250 ml, hoặc 10g môi trường trên vào các hộp Petri. Nếu cần có hàm lượng protease cao, cho thêm 5% bột đậu nành, nếu cần có hàm lượng pectinase cao cho thêm 5% bột cà rốt, ... để làm cơ chất cảm ứng.

2. Dùng nước máy tạo ra độ ẩm môi trường từ 60 - 65%, đem tiệt trùng ở 121°C trong 30 phút.

3. Chuẩn bị 3 - 5 ống nghiệm nước vô khuẩn.

4. Bằng thao tác vô trùng, thực hiện trong tủ cấy vô trùng, đổ 10ml nước vô trùng này vào các ống nghiệm giống.

5. Dùng đĩa thủy tinh vô khuẩn khuấy nhẹ để bào tử nấm sợi *Aspérgilles* hoà đều trong nước.

6. Dùng pipet vô khuẩn hút lấy 2 ml cho vào đĩa Petri có chứa môi trường đã được vô khuẩn và để nguội, hoặc đổ toàn bộ 10 ml nước đã hoà đều bào tử vào bình tam giác có môi trường đã thanh trùng và làm nguội.

7. Lắc đều để môi trường trong bình tam giác trộn đều với bào tử hoặc xoay đều để môi trường trong đĩa Petri trộn đều với bào tử.

8. Bao gói đĩa Petri hoặc đậy nút bông bình tam giác và để vào tủ ẩm có nhiệt độ ổn định 37⁰C. Nuôi trong thời gian 36 giờ.

9. Nếu thí nghiệm được thực hiện với mục đích kiểm tra khả năng sinh tổng hợp enzym thì sau 36 giờ nuôi cấy, ta thu được chế phẩm enzym thô.

10. Nếu thí nghiệm được thực hiện với mục đích thu nhận lượng chế phẩm thô nhiều hơn ta có thể nuôi chúng trong những bình tam giác 1000 ml với lượng môi trường là 200 - 250g. Hoặc ta sẽ nuôi chúng trong những khay bằng nhôm hoặc các dụng cụ được đan bằng tre, nứa. Chiều dày của môi trường khi nuôi trên khay khoảng 3 - 5 cm là tốt nhất.

11. Khi nấm sợi bắt đầu chớm tạo ra bào tử là thời gian enzym được tạo ra nhiều nhất. Ta nên thu nhận chế phẩm thô ở giai đoạn này.

12. Chế phẩm thô sau khi thu nhận được đem sấy ở nhiệt độ dưới 40⁰C có quạt thông gió để bảo quản và dùng lâu dài.

1.4. Đánh giá chất lượng chế phẩm enzym thô

Chế phẩm enzym thô được xác định hoạt tính chung và hoạt tính riêng theo những phương pháp tương ứng với từng loại enzym được trình bày ở cuối chương này.

II. THU NHẬN CHẾ PHẨM ENZYM VI SINH VẬT THÔ TỪ PHƯƠNG PHÁP NUÔI CẤY CHÌM

2.1. Nguyên tắc

Phương pháp nuôi cấy chìm là phương pháp vi sinh vật phát triển, sinh sản và trao đổi chất trong lòng môi trường. Môi trường dùng trong nuôi cấy chìm thường là môi trường lỏng.

2.2. Nguyên liệu, dụng cụ và hoá chất

- Giống vi sinh vật được sử dụng là vi khuẩn *Bacillus subtilis* có khả năng sinh tổng hợp enzym protease và amylase.
- Môi trường nuôi cấy là môi trường Edwards: M40.
- Bình tam giác 250 ml.
- Các hoá chất cần thiết để kiểm tra hoạt tính protease (xem phương pháp xác định hoạt tính protease ở cuối chương).

2.3. Cách tiến hành

- Chuẩn bị 50 ml môi trường trong bình tam giác 250 ml. Đem tiệt trùng ở 121⁰C trong 30 phút và để nguội.
- Chuẩn bị ống nghiệm có 10 ml nước cất vô khuẩn đã làm nguội.
- Cho 10 ml nước cất đã vô khuẩn và làm nguội này vào trong ống nghiệm giống. Dùng que thuỷ tinh khuấy nhẹ để các tế bào và bào tử *Bacillus subtilis* hoà lẫn trong nước. Tất cả các thao tác này được thực hiện trong tủ cấy vô trùng.
- Đổ toàn bộ 10 ml dịch trong ống nghiệm này vào trong bình tam giác 250 ml có 50 ml môi trường đã khử trùng và để nguội. Thao tác này cũng phải được thực hiện trong tủ cấy vô trùng.
- Đặt các bình tam giác vào máy lắc có tốc độ 160 - 300 rpm. Nuôi ở nhiệt độ phòng.
- Sau khi nuôi xong, đem ly tâm, thu lấy dịch. Dịch thu được gọi là chế phẩm enzym thô.

2.4. Đánh giá chất lượng chế phẩm enzym

Chế phẩm enzym thô được xác định hoạt tính enzym chung và hoạt tính enzym riêng theo những phương pháp xác định hoạt tính enzym được trình bày ở cuối chương này.

III. THU NHẬN CHẾ PHẨM ENZYME BÁN TINH KHIẾT

3.1. Nguyên tắc:

Trong nhiều trường hợp ứng dụng, người ta dùng chế phẩm enzym thô và trong nhiều trường hợp người ta dùng chế phẩm enzyme bán tinh khiết và chế phẩm enzyme tinh khiết. Chế phẩm bán tinh khiết là chế phẩm trong đó người ta đã loại ra được nước, các thành phần môi trường, sinh khối vi sinh vật và các

chất hoà tan. Trong đó chế phẩm này còn chứa 1 lượng protein không hoạt động và 1 số thành phần rất nhỏ khác.

Để thu nhận được chế phẩm enzyme bán tinh khiết (còn gọi là chế phẩm enzyme dạng tủa), người ta thường dùng các tác nhân gây tủa protein.

Như vậy, thành phần tủa thu được gồm có cả protein không hoạt động và protein enzyme. Trong protein enzyme chứa enzyme ta cần thu nhận và cả enzyme không cần thu nhận.

3.2 Nguyên liệu, dụng cụ và hoá chất:

- Chế phẩm enzyme thô (thu được từ nuôi cấy theo phương pháp bề mặt và nuôi cấy theo phương pháp chìm).

- Cồn 96%.

- Các dụng cụ để nghiền chế phẩm thô, lọc.

- Tủ lạnh.

- Đũa, thuỷ tinh, cốc thuỷ tinh, phễu lọc.

- Lò sấy.

3.3 Cách tiến hành:

1. Để kết tủa enzyme, người ta có thể dùng các loại dung môi như cồn, aceton, muối trung tính (như ammonium sulphate),.... Trong thí nghiệm này, ta dùng cồn như 1 tác nhân tạo tủa vì cồn dễ kiếm và cũng cho kết quả rất tốt. Cồn được giữ trong tủ lạnh 4⁰C trước khi làm kết tủa enzyme.

2. Chế phẩm enzyme thô từ canh trường nuôi cấy theo phương pháp bề mặt được nghiền mịn trong máy nghiền bi. Nếu không có máy nghiền bi người ta có thể giã bằng cối, chày sứ với sự trợ giúp của cát thạch anh hoặc bột thuỷ tinh. Cát thạch anh hoặc bột thuỷ tinh được rửa sạch và sấy thật khô trước khi sử dụng, cho vào giã cùng với canh trường nuôi cấy bề mặt. Cát hay bột thuỷ tinh làm tăng khả năng phá vỡ tế bào của vi sinh vật mà không làm thay đổi bản chất enzyme nên thường sử dụng trong các thí nghiệm thu nhận enzyme từ canh trường nấm sợi. Sau khi nghiền canh trường nuôi cấy bề mặt, cho vào đó 1 lượng nước gấp 4-5 lần khối lượng canh trường trên để hoà tan protein - enzyme từ khối canh trường. Tiến hành lọc và thu dịch lọc. Bảo quản dịch lọc trong tủ lạnh 4⁰C.

4. Lấy cồn từ tủ lạnh đổ từ từ vào dịch lọc enzyme đã làm lạnh, khuấy rất nhẹ để cồn hoà đều với dịch enzyme. Sau đó, để hỗn hợp này vào tủ lạnh. Lượng cồn dùng để kết tủa enzyme thường gấp 2 - 2,5 lần lượng dịch enzyme. Sau 15 - 24 giờ, hỗn hợp sẽ phân thành 2 lớp. Đem ly tâm hoặc lọc để thu protein - enzyme dạng tủa. Protein - enzyme dạng tủa này còn chứa nhiều nước. Nước

tồn tại trong đó sẽ làm giảm hoạt tính enzyme. Do đó, cần phải loại nước bằng cách sấy khô ở nhiệt độ $< 40^{\circ}\text{C}$. Không nên sấy ở nhiệt cao hơn làm như vậy, enzyme rất dễ mất hoạt tính.

3.4. Đánh giá chất lượng chế phẩm enzyme:

Chế phẩm enzyme bán tinh khiết được xác định hoạt tính chung và hoạt tính riêng theo phương pháp xác định hoạt tính enzyme trình bày ở cuối chương này.

IV. CÁC PHƯƠNG PHÁP KIỂM TRA HOẠT TÍNH ENZYME VI SINH VẬT.

4.1 PHƯƠNG PHÁP KIỂM TRA HOẠT TÍNH AMYLASE

Phương pháp Wolhgemuth:

Phương pháp này xác định lượng enzyme ít nhất có thể phân giải hoàn toàn lượng tinh bột với chất chỉ thị màu iodine.

Một đơn vị Wolhgemuth là lượng enzyme ít nhất mà sau 30 phút ở 30°C , khi có ion clorua, có thể phân giải 1mg tinh bột đến các sản phẩm không tạo màu với iodine.

Hoạt tính của enzyme được biểu diễn bằng số đơn vị Wolhgemuth trên 1ml dịch môi trường hoặc 1ml dung dịch chiết enzyme .

a. Thiết bị, vật liệu và hoá chất:

- Bình tam giác hay bình cầu.
- Ống nghiệm.
- Máy ly tâm hay máy lọc .
- Pipet tự động.

- Dung dịch enzyme : nghiền cẩn thận phần môi trường thạch có chứa vi sinh vật, cân 20 - 100g cho vào bình tam giác hay bình cầu, thêm 500 - 1000ml dung dịch NaCl 1%, lắc liên tục từ 1-2 giờ trên máy lắc ở nhiệt độ phòng. Lọc hay ly tâm để thu được dịch chiết trong suốt. Nếu môi trường nuôi cấy là dịch thể, chỉ cần ly tâm sinh khối rồi sử dụng phần chất lỏng trong suốt thu được để phân tích.

- Dung dịch tinh bột 0,1% (R48).
- Dung dịch NaCl 0,02% (R49).

b. Cách tiến hành:

Chuẩn bị 10 ống nghiệm, cho vào mỗi ống 1ml dung dịch NaCl 0,1%. Thêm vào ống thứ nhất 1 ml enzyme rồi lắc đều, lấy 1ml chuyển sang ống thứ 2, lại lắc đều và lấy 1ml chuyển sang ống thứ 3 ... Cứ thế cho đến ống thứ 10. Sau cùng, lấy 1ml ở ống thứ 10 bỏ đi. Cho vào mỗi ống 2ml dung dịch tinh bột

0,1%, lắc đều, giữ ở 30°C trong 30 phút. Làm lạnh, cho vào 1 giọt dung dịch iodine 0,02N. Ghi nhận ống có độ pha loãng của dung dịch enzyme trong ống thứ 4, 2 là số mg tinh bột trong mỗi ống nghiệm.

4.2 PHƯƠNG PHÁP KIỂM TRA HOẠT TÍNH PROTEASE

1. Xác định hoạt độ của chế phẩm protease từ vi sinh vật (phương pháp anson cải tiến)

Hoạt độ riêng của chế phẩm được biểu diễn bằng đơn vị hoạt động thủy phân của chế phẩm trên 1mmg protein.

a. Thiết bị, vật liệu và hoá chất

- Máy đo mật độ quang.
- Máy lắc ống nghiệm (vortex mixer).
- Ống nghiệm.
- Dung dịch Na₂CO₃ 6%.
- Dung dịch acid trichloroacetic 5%.
- Dung dịch hemoglobin biến tính 2% (R54) hoặc dung dịch casein 2% (R55).
- Thuốc thử Folin - Ciocalteu (R56).
- Dung dịch tyrosine chuẩn 1 (mol/ml (R57)).

b. Cách tiến hành:

1. Chuẩn bị các dung dịch tyrosine có nồng độ từ 0,01 đến 0,05 (mol/ml bằng cách pha loãng dung dịch tyrosine chuẩn 1 (mol/ml với dung dịch HCL 0,2N. Lập đồ thị đường chuẩn biểu diễn sự phụ thuộc của sự hấp thu theo lượng tyrosine (tính bằng (mol) như sau: cho 1ml dung dịch tyrosine đã pha loãng vào các ống nghiệm (số ống nghiệm bằng số dung dịch tyrosine đã pha loãng), thêm 4ml dung dịch Na₂CO₃ 6%, lắc đều, thêm 1ml thuốc thử Folin đã pha loãng 5 lần, lắc đều, để 30 phút nhiệt độ phòng rồi đem so màu ở bước sóng 750nm. Sử dụng cuvette dày 1cm.

2. Chuẩn bị 2 ống nghiệm sạch: ống thí nghiệm và ống kiểm tra.

- Cho vào ống thí nghiệm 2ml dung dịch hemoglobin 2% hay casein 2%, để yên từ 5 - 10 phút để dung dịch này đạt 30°C. Cho vào ống 1ml dung dịch enzyme có nhiệt độ 30°C. Giữ ống ở 30°C trong 10 phút. Khi đã đúng 10 phút, cho ngay vào 5ml acid trichloroacetic 5%, lắc đều, giữ 30 phút ở 30°C. Lọc. Lấy 1ml dung dịch lọc cho vào 1 ống nghiệm khác, thêm 4ml dung dịch Na₂CO₃ 6%, lắc đều, thêm 1ml thuốc thử Folin đã pha loãng 5 lần, lắc đều, để 30 phút ở nhiệt độ phòng rồi đem so màu với bước sóng 750nm. Sử dụng cuvette dày 1cm.

- Đối với ống kiểm tra: cho vào nghiệm 2ml dung dịch hemoglobin 2% hay casein 2% (sử dụng dùng loại cơ chất với ống thí nghiệm), cho 5ml acid trichloroacetic 5% vào ngay, lắc đều rồi mới cho 1ml enzyme vào. Tiến hành các bước tiếp theo tương tự như trên.

Lấy hiệu số của giá trị độ hấp thụ quang giữa mẫu thí nghiệm và mẫu kiểm tra, đối chiếu với đồ thị chuẩn, tính ra số (mol tyrosine tương ứng).

Tính số đơn vị hoạt động thủy phân (HP) của 1ml dung dịch enzyme đã đem phân tích để xác định hoạt động theo công thức:

$$\text{HP/ml} = (\text{số (mol tyrosine} \times 8) / t \text{ (đơn vị)})$$

Trong đó, 8 là thể tích toàn bộ hỗn hợp phản ứng (2ml dung dịch cơ chất, 1ml dung dịch enzyme và 5ml dung dịch acid trichloroacetic), còn t là thời gian ủ enzyme với cơ chất (10 phút).

Tính hoạt độ thủy phân của chế phẩm:

$$\text{HP/glucoamylase chế phẩm} = (\text{HP/ml} \times 1000) / a \text{ (đơn vị)}$$

Trong đó : a - số mg chế phẩm đem phân tích.

2. Phương pháp chuẩn độ formol

Phương pháp này căn cứ vào sự tăng của 1 trong các nhóm carboxyl hay amyl tự do trong dung dịch thủy phân protein. Protein bị thủy phân càng nhiều thì số nhóm carboxyl hay amyloxy do trong dung dịch càng tăng.

Trong phương pháp này, formol được sử dụng để khóa các nhóm amyl, còn các nhóm carboxyl được chuẩn độ bằng dung dịch kiềm có nồng độ xác định. Từ đó tính ra số mg đạm amyl tương ứng trên cơ sở lượng kiềm đã sử dụng.

Hoạt độ của enzyme được tính bằng số mg đạm amyl được tạo thành sau 1h ở điều kiện nhiệt độ và pH thích hợp.

a. *Vật liệu, hoá chất:*

- Bể điều nhiệt hay ủ ấm (40°C).
- Bình tam giác dung tích 100ml.
- Dung dịch đệm có pH thích hợp cho hoạt động của enzyme .
- Dung dịch gelatin 2% (R60).
- Hỗn hợp formol (R61).
- Dung dịch NaOH 0,1 N.

b. *Cách tiến hành:*

- Chuẩn bị hai bình tam giác sạch dung tích 100ml.
- Cho vào bình thứ nhất (bình thí nghiệm) 10 ml dung dịch gelatin 2% trong dung dịch đệm có pH thích hợp, 5 ml dung dịch enzyme, lắc đều, giữ ở

40⁰C trong 1h trong bể điều nhiệt, lấy bình ra, thêm 10 ml hỗn hợp formol và chuẩn độ bằng dung dịch NaOH 0,1 N cho đến khi xuất hiện màu xanh da trời.

- Cho vào bình thứ hai (bình kiểm tra) tương tự như trên nhưng cho hỗn hợp formol vào với gelatin, lắc đều rồi mới cho dung dịch enzyme vào. Ở điều kiện này, enzyme bị kiềm hãm hoàn toàn.

Tiến hành chuẩn độ song song với bình thí nghiệm cho đến khi xuất hiện màu xanh da trời.

Hoạt độ phân giải protein của 1ml dung dịch enzyme được tính như sau:

$$H = [(a - b) \times 1,42] / t \times v \text{ đơn vị}$$

Trong đó:

a - số ml dung dịch NaOH 0,1 N dùng để chuẩn độ bình thí nghiệm;

b - số ml dung dịch NaOH 0,1 N dùng để chuẩn độ bình kiểm tra;

t - thời gian tác dụng enzyme (h);

v - thể tích dung dịch enzyme đã sử dụng (ml) ;

1,42 - số mg đạm amyl tương ứng với 1ml dung dịch NaOH 0,1 N .

4.3 PHƯƠNG PHÁP KIỂM TRA HOẠT TÍNH CELULASE

Cellulase là enzyme xúc tác cho quá trình chuyển hoá Cellulose thành các sản phẩm hoà tan. Hai enzyme chính của phức hệ enzyme phân giải Cellulase là enzyme C₁ enzyme C_x.

1. Xác định hoạt độ của cellulase dựa vào lượng đường khử tạo thành

Tuỳ theo yêu cầu của từng thí nghiệm và mức độ hoạt động của enzyme mà có thể sử dụng các phương pháp định lượng đường khử khác nhau.

Hoạt động của enzyme được tính bằng đơn vị/ml môi trường hoặc g chế phẩm. Một đơn vị hoạt động là lượng enzyme phân giải cơ chất tạo thành 1mg glucose sau 1h tác dụng ở nhiệt độ 40⁰C, pH = 5,0.

a. Hoá chất:

- Ống nghiệm.
- Tủ ấm hay bể điều nhiệt, 40⁰C.
- Dung dịch Na - CM - cellulose (3 ml dung dịch chứa 50mg Na - CM - cellulose).
- Sợi bông hay cellulose .
- Dung dịch đệm acetate 0,5 M, pH =5,0.
- Dung dịch đệm acetate 0,2 M, pH =5,6.
- Mecthilate.

- Các thiết bị, vật liệu và hoá chất sử dụng định lượng đường khử theo phương pháp Nelson.

b. Cách tiến hành:

Với enzyme CX: cho 3 ml dung dịch có chứa 50 mg Na - CM - cellulose vào ống nghiệm thêm 1ml dung dịch acetate 0,5 M, pH =5,0 và 1ml dung dịch enzyme , nâng nhiệt lên đến 40⁰C và giữ trong 1 h. Lấy ra 1ml cho vào ống nghiệm khô, sạch, thêm ngay các hoá chất để định lượng đường khử theo phương pháp Nelson. Tiến hành mẫu kiểm tra theo cách tương tự, nhưng sau khi trộn lẫn enzyme với cơ chất, lấy ngay 1ml để xác định đường khử.

Hoạt động enzyme được tính bằng số lượng đường khử (tính theo glucose)giữa bình thí nghiệm và bình kiểm tra. Từ đó tính ra đơn vị hoạt động của 1ml dịch môi trường hoặc 1 g chế phẩm.

Lưu ý: phương pháp này sẽ không chính xác nếu lượng được khử tạo thành trong 5 ml hỗn hợp phản ứng vượt quá 0,7mg.

Với enzyme C1: cho vào ống nghiệm (đường kính khoảng 3cm) 150mg sợi bông đã loại tạp chất (hoặc 100mg cellulose), thêm 5ml dung dịch enzyme , 10ml dung dịch đệm acetate 0,2 M pH = 5,6 5ml nước cất. 50ppm mecthiolate, giữ 24h ở 40⁰C trên máy lắc, ly tâm, tách lấy glucose còn lại. Lấy 1ml dịch lọc để định lượng đường khử theo phương pháp Nelson. Mẫu kiểm tra cũng được giữ cùng điều kiện như trên.

2. Xác định hoạt độ cellulose bằng cách đo đường kính vòng thủy ngân

Khi enzyme cellulase tác dụng lên cơ chất cellulose trong môi trường thạch, cơ chất bị phân giải làm cho độ đục của môi trường bị giảm đi, môi trường trở nên trong suốt. Độ trong suốt được tạo ra của môi trường tỉ lệ với độ hoạt động của enzyme .

a. Thiết bị, vật liệu và hoá chất:

- Tủ âm, Đĩa Petri., Na -CM – cellulose, Thước đo mm, Thạch.
- Dung dịch đệm citrate phosphate, pH = 5,0.

b. Cách tiến hành: Chuẩn bị môi trường có chứa 2% thạch, 0,5% Na -CM - cellulose trong dung dịch đệm citrate phosphate, pH = 5,0 rồi phân phối vào đĩa Petri. Sau khi thạch đông, khoét những lỗ nhỏ trên mặt thạch, cho vào 0,1 – 0,5 ml dung dịch enzyme , giữ ở 40⁰C. Sau 24giờ, đo đường kính phần môi

trường trong suốt ở chỗ enzyme tác dụng. Biểu diễn hoạt độ của enzyme bằng số mm đường kính vòng thủy phân.

V. THU NHẬN SINH KHỐI NẤM MEN BÁNH MÌ

5.1. Cách thực hiện

- Chuẩn bị 3 ống nghiệm nước đường có hàm lượng đường 4%. Tiệt trùng, để nguội. Mỗi ống chứa 10ml môi trường.

- Dùng que cấy vô trùng lấy que cấy nấm men từ ống giống chuyển qua các ống nghiệm nước đường trên và nuôi trên máy lắc có tốc độ quay 160rpm.

- Chuẩn bị 3 bình cầu đáy bằng dung tích 150ml chứa 100ml dung dịch môi trường nước đường chứa 4% đường bổ sung 0,15% urea và 0,25%DAP.

- Chuyển toàn bộ số dung dịch trong từng ống nghiệm vào các bình cầu đáy bằng. Đặt các bình này trên máy lắc có tốc độ vòng quay 300rpm. Nuôi ở 30⁰C trong thời gian 16-18 giờ.

- Sau thời gian này tiến hành kiểm tra chất lượng nấm men bánh mì.

5.2. Kiểm tra chất lượng nấm men bánh mì

Đánh giá chất lượng nấm men bánh mì theo các chỉ tiêu sau :

- a/ Tổng số tế bào/ml
- b/ Tỷ lệ tế bào nấm men nảy chồi
- c/ Tỷ lệ tế bào chết/tế bào sống
- d/ Hoạt tính enzyme amylase
- e/ Hoạt lực làm nở bánh

Các chỉ tiêu từ a-d được xác định theo các phương pháp đã trình bày trong các chương trước và chương 9. Riêng chỉ tiêu xác định hoạt lực làm nở bánh (hay hoạt lực lên men) có thể thực hiện theo phương pháp sau :

- Ly tâm dịch nuôi cấy nấm men bánh mì, thu nhận sinh khối dạng paste

- Chuẩn bị một ly nước đường có hàm lượng đường 10%

- Tạo một viên sinh khối nấm men này có kích thước giống như một hạt đậu nành.

- Thả viên sinh khối này vào ly nước đường, xác định thời gian ban đầu, thời gian kết thúc được tính khi viên sinh khối này nổi trên dung dịch nước đường.

- Hoạt lực làm nở bánh càng mạnh khi thời gian làm viên sinh khối nổi trên bề mặt dung dịch nước đường càng ngắn.

BÀI 10 : PHƯƠNG PHÁP XÁC ĐỊNH TỔNG VI KHUẨN HIẾU KHÍ VÀ COLIFORM

I. XÁC ĐỊNH TỔNG SỐ VI KHUẨN HIẾU KHÍ

1.1. Môi trường và hoá chất

- Môi trường sử dụng là Plate Count Agar (PCA) có pH $7,0 \div 0,2$. Môi trường được pha chế, phân phối vào trong các bình thủy tinh hay trong các ống nghiệm và hấp khử trùng ở 121°C trong 15 phút. Các bình hoặc ống nghiệm chứa môi trường chưa sử dụng được bảo quản trong tủ lạnh $2-8^{\circ}\text{C}$. Trước khi sử dụng môi trường phải được đun chảy và làm nguội 45°C trong bể điều nhiệt. Ngoài môi trường trên, còn có thể sử dụng cả môi trường khác như Tryptose Glucose Agar, Nutrient Agar.

- Dung dịch nước muối pepton SPW (Saline Pepton Water) dùng pha loãng chứa 8,5g NaCl và 1g pepton trong 100ml nước. Dung dịch này được chứa trong các bình chứa 0,5-1,0 lít, hấp khử trùng và được phân phối thành các thể tích chính xác 9ml vào trong các ống nghiệm vô trùng.

1.2. Quy trình phân tích

1.2.1. Chuẩn bị mẫu nước trước khi phân tích

Trước khi tiến hành phân tích, thực hiện việc đồng nhất mẫu như sau : đối với mẫu dạng rắn dùng các dụng cụ như kéo, kẹp đã được khử trùng cân chính xác 10g (hay 25g) mẫu vào trong bao PE. Tất cả thao tác tiếp theo cần phải tiến hành trong điều kiện vô trùng. Thêm vào lượng mẫu này 90ml (hay 225ml) dung dịch pha loãng SPW. Thực hiện đồng nhất mẫu bằng máy đập mẫu (stomacher). Thời gian đập mẫu phụ thuộc vào tính chất cơ lý của mẫu, nhưng không quá 2,5 phút. Trong trường hợp không có máy đập mẫu thực hiện thao tác đồng nhất mẫu như sau : xát nhuyễn mẫu trong điều kiện vô trùng. Cân chính xác trong điều kiện vô trùng (225ml) nước SPW đã được hấp khử trùng. Lắc đều trong một thời gian nhất định (ít nhất là 2 phút). Đối với mẫu dạng lỏng, hút 10ml (hoặc 25ml) cho vào bình tam giác chứa 90ml (hay 225ml) nước SPW đã được hấp khử trùng, lắc đều. Sau khi được làm đồng nhất bằng một trong các phương pháp như trên, dung dịch mẫu thu được có độ pha loãng là 10 lần so với ban đầu.

Dịch mẫu đồng nhất được tiếp tục pha loãng theo dãy thập phân bằng cách dùng pipet vô trùng (hoặc pipetman với đầu tip vô trùng) chuyển 1ml dịch mẫu vào ống nghiệm chứa 9ml dung dịch pha loãng. Trộn mẫu trong ống nghiệm cho đồng nhất bằng máy rung (vortex) hay dùng pipet hút đảo dịch mẫu

lên xuống 5-10 lần. Dung dịch mẫu này có độ pha loãng là 10^{-2} . Sau đó sử dụng cùng pipet hoặc pipetman có đầu tip chuyên 1ml dịch mẫu này vào ống nghiệm thứ 2 chứa dung dịch pha loãng và thao tác tương tự để có dịch mẫu với độ pha loãng 10^{-3} . Tiếp tục thực hiện tương tự để có các độ pha loãng thập phân theo cho đến độ pha loãng cần thiết. Lưu ý nếu pipet hoặc đầu tip pipetman nguy cơ bị nhiễm trong quá trình thao tác (chạm tay, chạm mặt ngoài ống nghiệm, mặt ngoài bình chứa...), cần phải thay pipet hoặc đầu tip vô trùng khác.

1.2.2. Cấy mẫu

Chọn 2 hay 3 độ pha loãng liên tiếp dự kiến chứa 25-250 tế bào vi sinh vật trong 1ml để cấy lên đĩa petri. Dùng pipet vô trùng hoặc pipetman với đầu tip vô trùng chuyên 1ml dịch mẫu pha loãng đã chọn vào giữa đĩa petri vô trùng. Tương ứng với mỗi độ pha loãng cấy ít nhất 2-3 đĩa (tức là thực hiện 2-3 lần lặp lại). Sau khi cấy đổ vào mỗi đĩa 10-15 ml môi trường PCA đã được đun chảy và ổn định ở 45°C . Trộn đều dịch mẫu với môi trường bằng cách xoay tròn đĩa petri xuôi và ngược chiều kim đồng hồ, mỗi chiều 3-5 lần ngay sau khi đổ môi trường. Đặt các đĩa trên mặt phẳng ngang cho thạch đông đặc. Lật ngược và ủ các đĩa trong tủ ẩm ở nhiệt độ $30 \pm 10^{\circ}\text{C}$ trong 72 giờ. Nhiệt độ và thời gian ủ có thể thay đổi theo quy định của tiêu chuẩn.

1.2.3. Cách tính kết quả

Đếm tất cả số các khuẩn lạc xuất hiện trên các đĩa sau khi ủ. Chọn các đĩa có số đếm từ 25-250 để tính kết quả. Mật độ tổng vi khuẩn hiếu khí trong 1g hay 1ml mẫu được tính như sau :

$$A \text{ (CFU/g hay CFU/ml)} = \frac{N}{n_1Vf_1 + \dots + n_iVf_i}$$

Trong đó : A : số tế bào (đơn vị hình thành khuẩn lạc) vi khuẩn trong 1g hay 1ml mẫu

N : tổng số khuẩn lạc đếm được trên các đĩa đã chọn

n_i : số lượng đĩa cấy tại độ pha loãng thứ i

V : thể tích dịch mẫu (ml) cấy vào trong mỗi đĩa

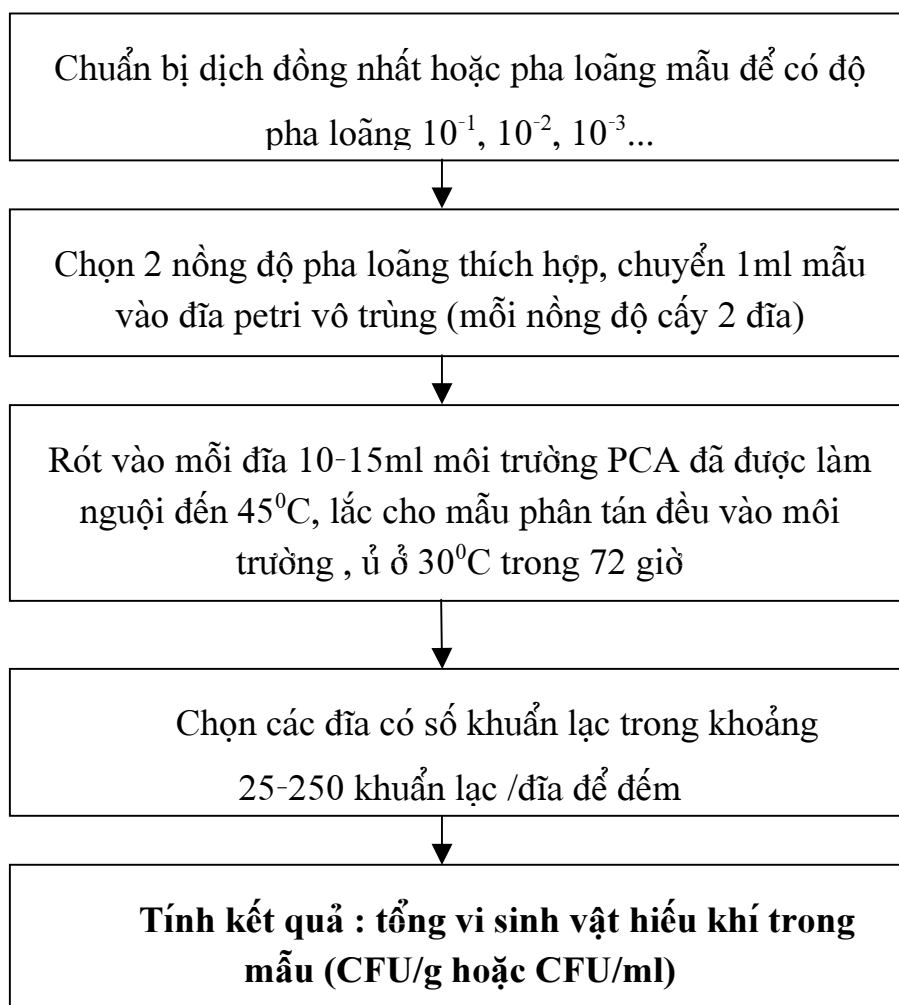
f_i : độ pha loãng tương ứng

Ví dụ : trong 1 trường hợp phân tích 1g mẫu cụ thể nhận được kết quả như sau :

Nồng độ pha loãng		10^{-3}	10^{-4}
Kết quả	Đĩa 1	235	26
	Đĩa 2	246	21
A =		$\frac{235 + 246 + 26}{2 \times 1 \times 0,001 + 1 \times 1 \times 0,0001} = 2,4 \times 10^5 \text{ (CFU/g)}$	

Các kết quả tổng số vi khuẩn hiếu khí thường được biểu diễn dưới dạng số mũ của cơ số thập phân. Trường hợp có khuẩn lạc vi sinh vật mọc loang, mỗi vết loang được tính là một khuẩn lạc. Nếu số khuẩn lạc chiếm hơn 1/3 đĩa thì phải ghi nhận điều này và đánh dấu kết quả nhận được. Nếu ở độ pha loãng cao nhất, số khuẩn lạc đếm được trên đĩa > 250 , ví dụ ở nồng độ 10^{-5} số đếm được lớn hơn 250, kết quả được ghi : $> 2,5 \times 10^7$ CFU/g. Nếu ở độ pha loãng thấp nhất, số khuẩn lạc đếm được trên 1 đĩa < 25 , ví dụ ở nồng độ 10^{-1} số đếm nhỏ hơn 25, kết quả được ghi : $< 2,5 \times 10^2$ CFU/g

Quy trình định lượng tổng vi khuẩn hiếu khí trong thực phẩm được tóm tắt



II. COLIFORMS VÀ ESCHERICHIA COLI

2.1. Định nghĩa Coliforms, Coliforms chịu nhiệt, Coliforms phân và E.coli

- Coliforms là những trực khuẩn gram âm không sinh bào tử, hiếu khí hoặc kỵ khí tùy ý, có khả năng lên men lactose sinh acid và sinh hơi ở 37°C trong 24-48 giờ. Trong thực tế phân tích, Coliforms còn được định nghĩa là các vi khuẩn có khả năng lên men sinh hơi trong khoảng 48 giờ khi được ủ ở 37°C trong môi trường canh Lauryl Sulphate và canh Brilliant Green Lactose Bile Salt. Nhóm

Coliforms được xem là nhóm vi sinh vật chỉ thị : số lượng hiện diện của chúng trong thực phẩm, nước hay các loại mẫu môi trường được dùng để chỉ thị khả năng hiện diện của các vi sinh vật gây bệnh khác. Nhiều nghiên cứu cho thấy rằng khi số Coliforms của thực phẩm cao thì khả năng hiện diện của các vi sinh vật gây bệnh khác cũng cao. Tuy nhiên mối quan hệ giữa vi sinh vật gây bệnh và vi sinh vật chỉ thị này vẫn còn nhiều tranh cãi. Nhóm Coliforms gồm 4 giống là : Escherichia với 1 loài duy nhất là E. coli, Citrobacter, Klebsiella và Enterobacter. Tính chất sinh hoá đặc trưng của nhóm này được thể hiện qua các thử nghiệm Indol (I), Methyl Red (MR), Voges-Proskauer (VP) và Citrate (iC) thường được gọi tắt chung là IMViC.

- Coliforms chịu nhiệt là những Coliforms có khả năng lên men lactose sinh hơi trong khoảng thời gian 24 giờ khi được ủ ở 44°C trong môi trường canh EC.

- Coliforms phân (Faeceal Coliforms hay E. coli giả định) là Coliforms chịu nhiệt có khả năng sinh indole khi được ủ khoảng 24 giờ ở 44,5°C trong canh Trypton. Coliforms phân là một thành phần của hệ vi sinh ruột đường ở người và các động vật máu nóng khác và được sử dụng để chỉ thị mức độ vệ sinh trong quá trình chế biến, bảo quản, vận chuyển thực phẩm, nước uống cũng như để chỉ thị sự ô nhiễm trong mẫu môi trường

- E. coli là Coliforms phân cho kết quả thử nghiệm IMViC là +++- (Indol +, Methyl Red +, Voges-Proskauer -, Citrate -).

2.2. Định lượng Coliforms, Coliforms chịu nhiệt, Coliforms phân và E. coli bằng phương pháp MPN.

2.2.1. Nguyên tắc :

Số lượng Coliforms, Coliforms chịu nhiệt, Coliforms phân và E. coli trong mẫu nước, thực phẩm chứa mật độ thấp của nhóm vi khuẩn này có thể được xác định bằng phương pháp MPN (Most Probable Number). Phương pháp này dựa vào nguyên tắc mẫu được pha loãng thành một dãy thập phân (hai nồng độ kế tiếp nhau khác nhau 10 lần); 3 hoặc 5 mẫu có độ pha loãng thập phân liên tiếp được ủ trong ống nghiệm chứa môi trường thích hợp có ống bẫy khí Durham. Mỗi nồng độ pha loãng được ủ từ 3 đến 5 ống lặp lại. Theo dõi sự sinh hơi và đổi màu để định tính sự hiện diện trong từng ống thử nghiệm ; đây là các ống dương tính. Ghi nhận số ống nghiệm cho phản ứng dương tính ở mỗi nồng độ pha loãng và dựa vào bảng MPN để suy ra số lượng vi sinh vật tương ứng hiện diện trong 1g (hoặc 1ml) mẫu ban đầu.

2.2.2. Môi trường và hoá chất

- Môi trường lỏng Lauryl Sulphate Broth LSB (canh Lauryl Sulphate)
- Môi trường lỏng Brilliant Green Lactose Bila Salt (canh BGBL)
- Môi trường lỏng E. coli (E. coli medium, canh EC)

Các môi trường lỏng trên được chuẩn bị trong các ống nghiệm chứa ống Durham úp ngược. Sau khi khử trùng, chỉ thị sử dụng các ống nghiệm không có bọt khí bên trong ống Durham.

- Canh Tryptone
- Môi trường rắn Simmon Citrate Agar (Thạch simmon Citrate)
- Dung dịch nước muối pepton SPW (Saline Pepton Water)
- Thuốc khử Kovac's
- Canh MR-VP
- Thuốc thử Methyl Red
- Thuốc thử a-naphthol

2.2.3. Quy trình phân tích

Chuẩn bị đồng nhất mẫu hoặc pha loãng mẫu để có dịch mẫu có độ pha loãng 10^{-1} .

a. Định lượng Coliforms

Tuần tự cấy 1ml dịch mẫu đã pha loãng 10^{-1} vào 3 ống nghiệm giống nhau, mỗi ống chứa 10ml canh LSB. Thực hiện tương tự với dịch mẫu pha loãng 10^{-2} và 10^{-3} . Đây là trường hợp xác định MPN bằng hệ số 3 độ nồng độ và 3 ống nghiệm lặp lại (hệ 3 x 3 hay 9 ống nghiệm). Nếu nghi ngờ số lượng Coliforms trong mẫu quá cao, phải sử dụng các mẫu có độ pha loãng cao hơn. Ủ các ống nghiệm ở 37°C trong 48 giờ. Ghi nhận : ống có sinh hơi. Dùng que cấy vòng (khuyên cấy) cấy chuyển dịch mẫu các ống LSB (+) sang các ống chứa canh BGBL và ủ ở 37°C trong 48 giờ. Ghi nhận số ống cho kết quả (+) (có sinh hơi) ứng với mỗi pha loãng.

b. Định lượng Coliforms chịu nhiệt

Dùng que cấy vòng chuyển một vòng dịch mẫu từ các ống canh LSB sang môi trường canh EC, ủ ở $44,5^{\circ}\text{C} \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ trong 24 giờ. Đếm số lượng các ống cho kết quả (+) (sinh hơi) ở mỗi độ pha loãng.

c. Định lượng Coliforms phân

Dùng que cấy vòng rìa dịch mẫu từ các ống (+) trên môi trường canh EC sang môi trường thạch đĩa EMB. Ủ các đĩa này ở 37°C trong 24 giờ. Các khuẩn lạc tròn, dẹt hình đĩa và có ánh kim tím là khuẩn lạc của Coliforms phân hay E. coli giả định. Chọn khuẩn lạc đường kính lớn hơn 1mm và cấy vào canh Trypton,

ủ ở $44,5 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ trong 24 giờ. Nhỏ thuốc thử Kovac's vào các ống nghiệm. Ống nghiệm có sự xuất hiện màu đỏ trong môi trường trong vài phút là ống (+). Thực hiện tương tự cho các ống (-) trên môi trường EC. Ghi nhận số lượng các ống cho kết quả (+) trên môi trường Trypton tương ứng với mỗi độ pha loãng.

d. Định lượng *E.coli*

Trước tiên thực hiện tương tự như trường hợp định lượng Coliforms phân như trên. Dùng que cấy vòng ria dịch mẫu từ các ống (+) trên môi trường canh EC sang môi trường thạch đĩa EMB. Ủ các đĩa này ở 37°C trong 24 giờ để tìm các khuẩn lạc *E. coli* giả định (tròn, dẹt hình đĩa và có ánh kim tím). Chọn khuẩn lạc đường kính lớn hơn 1mm và cấy vào các môi trường MRVP, Simmom Citrate Aga để thực hiện các thử nghiệm IMViC. Khuẩn lạc *E.coli* giả định cho kết quả thử nghiệm IMViC tuần tự là ++-- chính là *E. coli*. Ống nghiệm cho kết quả (+) trong môi trường EC và khuẩn lạc *E.coli* giả định trên môi trường EMB cho kết quả thử nghiệm IMViC như trên là ống nghiệm *E.coli* (+). Thực hiện tương tự cho tất cả các ống nghiệm cho kết quả (+) trong môi trường EC và tạo được khuẩn lạc *E.coli* giả định trên môi trường EMB. Ghi nhận số lượng các ống nghiệm có *E.coli* (+) ở mỗi độ pha loãng của mẫu.

2.2.4. Cách đọc kết quả

Ở tất cả các trường hợp nêu trên, từ số lượng các ống nghiệm có *E.coli* (+) ở mỗi độ pha loãng của mẫu dùng bảng MPN thích hợp (bảng 3x3 tức 9 ống nghiệm) để tính ra mật độ vi sinh vật trong mẫu và biểu diễn dưới dạng trị số MPN/g hay MPN/ml mẫu ban đầu chưa pha loãng.

2.3. Định lượng Coliforms, Coliforms phân bằng phương pháp đếm khuẩn lạc

2.3.1. Nguyên tắc

Mẫu đã được đồng nhất hoá được cấy một lượng nhất định lên môi trường thạch chọn lọc thích hợp chứa lactose. Đếm số khuẩn lạc lên men lactose và sinh acid sau khi ủ ở $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$ trong 24-48 giờ. Ngoài lactose môi trường chọn lọc cho Coliforms còn chứa muối mật ức chế vi khuẩn gram dương và chất chỉ thị pH như neutra red, crystal violet. Trên môi trường này khuẩn lạc Coliforms có màu đỏ đến màu đỏ đậm, đường kính lớn hơn 0,5mm, xung quanh khuẩn lạc có vùng tủa của muối mật. Việc khẳng định được thực hiện bằng cách nuôi cấy trên môi trường canh chọn lọc như BGBL. Để định lượng Coliforms phân, thực hiện tương tự nhưng thay đổi nhiệt độ ủ là 44°C . Mật độ Coliforms hay Coliforms phân được tính dựa trên số lượng khuẩn lạc điển hình đếm được, tỷ lệ khẳng định và độ pha loãng mẫu trước khi cấy vào đĩa.

Để phát hiện được bộ phận tế bào Coliforms bị tổn thương hay bị giảm sức sống do quá trình chế biến hay bảo quản thực phẩm, bộ phận này có thể không tăng trưởng được trong môi trường chọn lọc, trước tiên mẫu được cấy vào trong môi trường không chọn lọc như TSA, trước khi bổ sung môi trường chọn lọc.

2.3.2. Môi trường và hoá chất

- Môi trường Trypton Soya Agar (TSA) được chuẩn bị trong các bình hay chai thuỷ tinh, hấp khử trùng và bảo quản ở 4-8⁰C. Trước khi sử dụng môi trường được đun chảy và làm nguội ở 45⁰C trong bể điều nhiệt.

- Violet Red Bile Agar (VRB) được chuẩn bị trong các chai thuỷ tinh, được đun chảy và làm nguội ở 45⁰C trong bể điều nhiệt trước khi sử dụng. Có thể sử dụng môi trường Desoxycholate Agar thay cho VRB.

- Môi trường canh Brilliant Green Bile Lactose Broth (BGBL) được phân phối 10ml vào mỗi ống nghiệm vô trùng chứa một ống Durham úp ngược. Hấp khử trùng. Sau khi hấp kiểm tra các ống để đảm bảo không có bọt khí trong ống Durham.

- Môi trường canh EC Broth được chuẩn bị tương tự như trường hợp môi trường BGBL.

- Môi trường canh Trypton Broth được phân phối 5ml vào mỗi ống nghiệm hấp khử trùng.

- Thuốc thử Kovac's hay Indol

2.3.3. Quy trình phân tích

Mẫu được đồng nhất hoá và pha loãng tương tự như phần định lượng tổng số vi khuẩn hiếu khí sao cho chứa <100 tế bào Coliforms trong 1ml dung dịch pha loãng. Chuyển 1ml dịch pha loãng mẫu đã chọn vào đĩa petri. Bổ sung vào mỗi đĩa đã cấy mẫu khoảng 5ml môi trường TSA đã được đun chảy và ổn định trong bể điều nhiệt ở 45⁰C. Lắc tròn đĩa petri xuôi và ngược chiều kim đồng hồ, mỗi chiều 3-5 lần để trộn đều dịch mẫu với môi trường. Để ở nhiệt độ phòng trong 1-2 giờ để hồi phục các tế bào bị tổn thương. Bổ sung vào mỗi đĩa 10-15ml môi trường thạch VRB ở nhiệt độ 45⁰C lên trên môi trường TSA. Chờ cho môi trường trong đĩa đông đặc, lật ngược đĩa và ủ ở 37⁰ ± 1⁰C trong 24 -48 giờ. Thực hiện trên mẫu ở 2 nồng độ pha loãng liên tiếp sao cho mỗi đĩa sẽ xuất hiện từ 10-100 khuẩn lạc và lặp lại ít nhất 2 đĩa ứng với nồng độ pha loãng.

- Thử nghiệm khẳng định Coliforms

Trong trường hợp mẫu có chứa các nguồn carbon khác không phải lactose, để tránh các trường hợp vi sinh vật sử dụng các nguồn carbon trong

mẫu lên men và tạo khuẩn lạc có hình dạng tương tự Coliforms cần thực hiện thêm bước khẳng định như sau : chọn ít nhất 5 khuẩn lạc nghi ngờ, dùng que cấy vòng cấy chuyển sang các ống nghiệm chứa môi trường BGBL (trường hợp khẳng định Coliforms tổng số) hoặc môi trường EC (trường hợp khẳng định Coliforms phân). Ủ các ống BGBL ở $37 \pm 10^{\circ}\text{C}$ và các ống EC ở 44°C trong 24-48 giờ. Kết quả khẳng định là (+) khi vi khuẩn tăng làm đục môi trường và sinh hơi trong ống Durham. Tính tỷ lệ khẳng định là tỷ số giữa số khuẩn lạc cho kết quả (+) với số khuẩn lạc được dùng trong thử nghiệm khẳng định Coliforms phân, các khuẩn lạc cho kết quả (+) trên EC cần được thực hiện thử nghiệm indol ở 44°C . Thử nghiệm khẳng định Coliforms phân chỉ được xem là (+) trên thử nghiệm Indol.

2.3.4. Cách tính kết quả

Dựa vào số khuẩn lạc đếm được và tỷ lệ khẳng định, tính mật độ của Coliforms và Coliforms phân theo công thức sau :

$$A \text{ (CFU/g hay CFU/ml)} = \frac{N}{n_1Vf_1 + \dots + n_iVf_i} \times R$$

Trong đó : A : số tế bào (đơn vị hình thành khuẩn lạc) vi khuẩn trong 1g hay 1ml mẫu

N : tổng số khuẩn lạc đếm được

N_i : số lượng đĩa có số khuẩn lạc được chọn tại mỗi độ pha loãng

V : dung dịch mẫu (ml) cấy vào trong mỗi đĩa

F_i : độ pha loãng có số khuẩn lạc được chọn tại các đĩa đếm

R : tỷ lệ khẳng định

2.4. Định lượng E.coli bằng phương pháp đếm khuẩn lạc

2.4.1. Nguyên tắc

Mẫu đã được đồng nhất hoá được cấy một lượng nhất định lên môi trường thạch chọn lọc thích hợp chứa lactose, ủ ở 44°C trong 24 giờ, đếm các khuẩn lạc có hình đặc trưng của Coliforms. Khẳng định các khuẩn lạc đã đếm là E.coli bằng các thử nghiệm IMViC.

2.4.2. Môi trường hoá chất

- Môi trường canh Trypton Soya Agar (VRB) được chuẩn bị tương tự phần định lượng Coliforms

- Môi trường canh Escherichia coli Broth (EC Broth) được phân phối 10ml trong mỗi ống nghiệm chứa ống Durham úp ngược, hấp khử trùng để nguội và kiểm tra không có sự hiện diện của bọt khí trong ống Durham. Các ống EC này được bảo quản ở 2-80C cho đến khi sử dụng .

- Môi trường canh Lactose Trypton Lauryl Sulphate Broth (LST Broth) được chuẩn bị tương tự như môi trường canh EC.

- Môi trường canh Trypton Broth được chuẩn bị tương tự phần định lượng Coliforms.

- Môi trường canh MR-VP Broth được phân phối 5ml vào mỗi ống nghiệm, hấp khử trùng, để nguội và bảo quản ở 1280C cho đến khi sử dụng.

- Môi trường thạch Simmon Citrate được chuẩn bị dưới dạng các ống thạch nghiêng có màu xanh lục.

- Thuốc thử Kovac's.

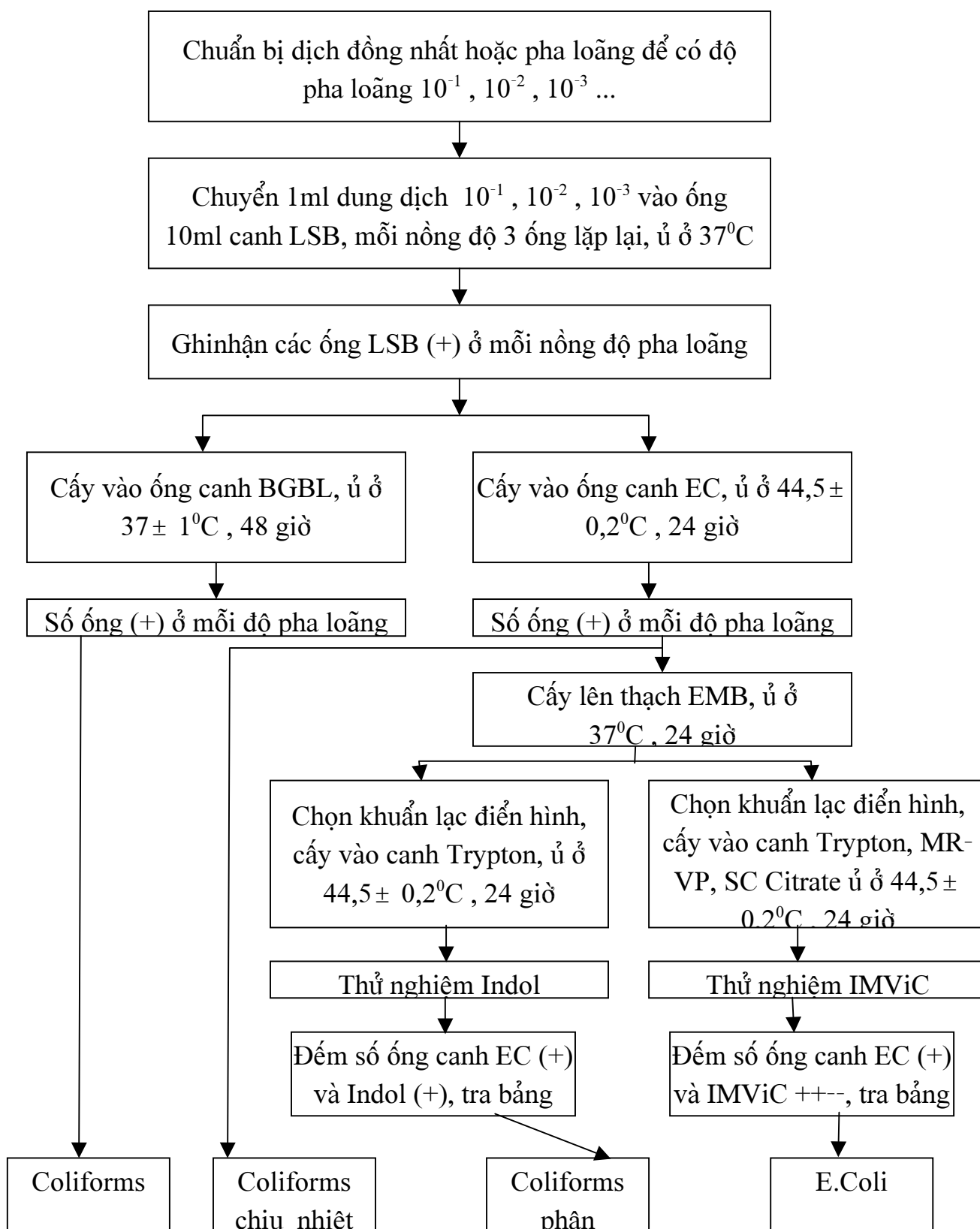
2.4.3. Quy trình phân tích.

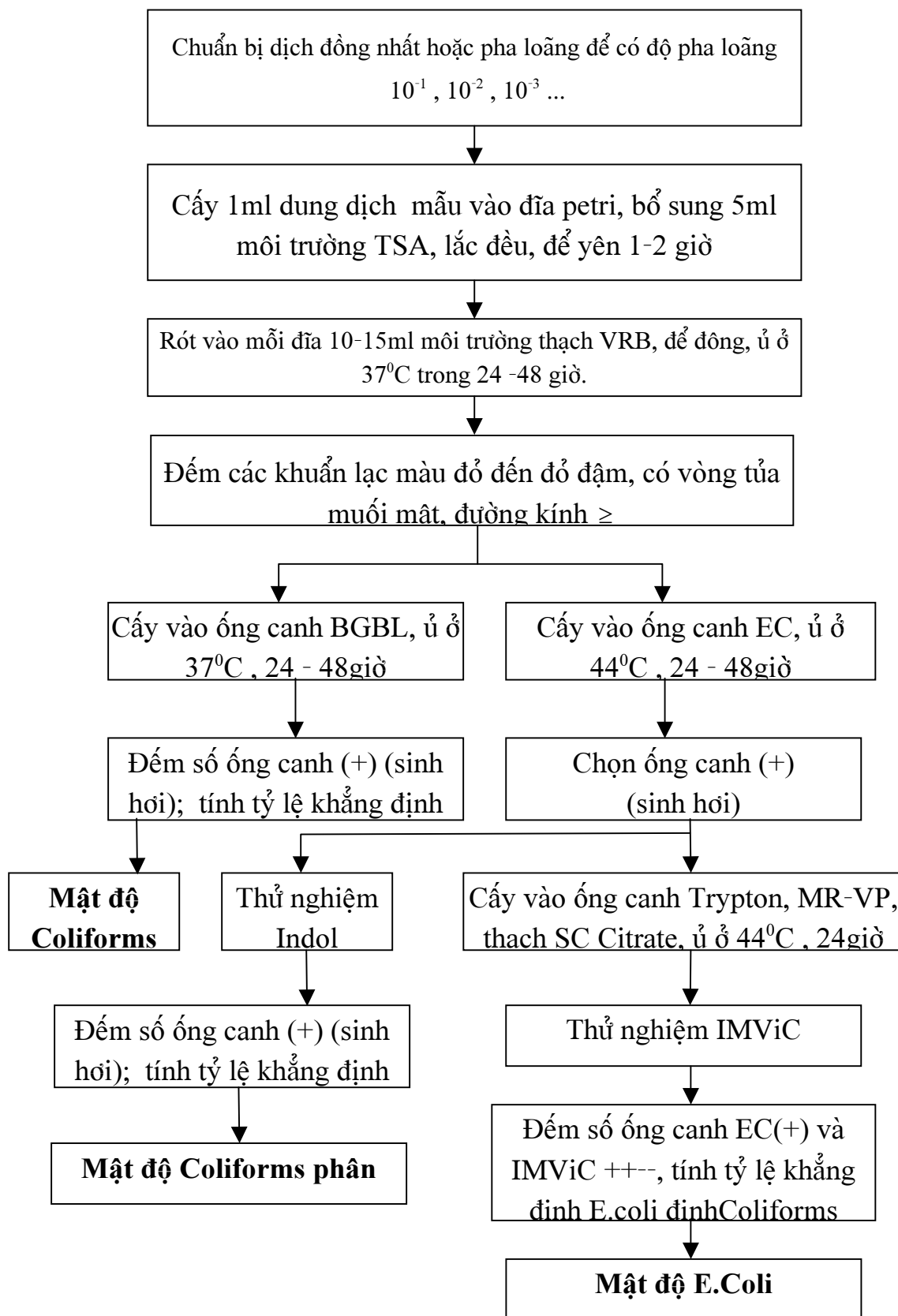
Mẫu được đồng nhất, pha loãng và định lượng tương tự như phần Coliforms phân với bước khẳng định được tiến hành như sau: chọn 5 khuẩn lạc nghi ngờ, dùng que cấy vòng cấy chuyển sang môi trường canh EC, ủ ở $44 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ trong 24 giờ. Chọn các ống cho kết quả (+) (sinh hơi) và dùng que cấy vòng cấy chuyển sang các môi trường sau: canh trypton, canh MR-VP, thạch simmon Citrate. Ủ các môi trường trên ở $44 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ trong 24 giờ. Thực hiện thử nghiệm Indol, Methyl Red, Voges Proskauer, Citrate (xem chương IV). Ghi nhận số khuẩn lạc cho thử nghiệm khẳng định E.coli (+) (IMViC là ++ --).

2.4.4. Cách tính kết quả.

Tính tỷ lệ khẳng định và tính mật độ E.coli (CFU/ml hay CFU/mg) theo công thức tương tự trên.

Tóm tắt các bước của qui trình định lượng các loại Coliforms và E.Coli.





Quy trình định lượng Coliforms, Coliforms chịu nhiệt, Coliforms phân và E. coli bằng phương pháp đếm khuẩn lạc

IV. XÁC ĐỊNH TỔNG NẤM MEN, NẤM MỐC

4.1. Định nghĩa và nguyên tắc

Nấm men và nấm mốc là nhóm vi sinh vật rất đa dạng, cho đến nay có hơn 400.000 loài nấm men và nấm mốc đã được mô tả. Đây là nhóm vi sinh vật nhân thật, có vách tế bào là lớp vỏ chitin, có nhân và các bào quan khác. Tất cả các loài men và mốc đều thuộc nhóm vi sinh vật dị dưỡng, chúng cần nguồn carbon hữu cơ để cung cấp năng lượng từ môi trường bên ngoài. Vì thế vi sinh vật này thường xuyên được phân lập từ thực phẩm hay các nguồn giàu dinh dưỡng khác. Có thể phân biệt được nấm men và nấm mốc theo khái niệm đơn giản như sau: nấm mốc là vi nấm dạng sợi, sinh sản bằng bào tử hay khuẩn ty; nấm men là những tế bào đơn tính phát triển theo kiểu nảy chồi, thỉnh thoảng có thể tồn tại ở dạng khuẩn ty giả trong đó các tế bào kết nhau thành chuỗi. Đơn vị hình thành khuẩn lạc của nấm mốc và nấm men là mầm để tạo nên 1 khuẩn lạc khi nuôi cấy trong môi trường. Mầm có thể là 1 bào tử, 1 tế bào hay 1 đoạn của khuẩn ty.

Quá trình tăng trưởng của nấm men và nấm mốc phụ thuộc vào rất nhiều yếu tố từ môi trường. Hầu hết nấm mốc, nấm men đều thuộc nhóm vi sinh vật ưa mát, nhiệt độ thích hợp cho sự phát triển của chúng trong khoảng 20 – 28°C, 1 số ít trong số này ưa lạnh hay ưa nóng. Nước hoạt tính cũng là nhân tố ảnh hưởng rất quan trọng đến tăng trưởng. Hầu hết các loài nấm men và nấm mốc phát triển tốt trong cơ chất có nước hoạt tính khoảng 85% hay lớn hơn, 1 số ít loài có thể tăng trưởng trong cơ chất có nước hoạt tính thấp hơn khoảng 60 – 70%. Nấm mốc và nấm men tăng trưởng được vùng pH từ 2 – 9, trong pH thích hợp nhất nằm trong khoảng 4 – 6,5. Hầu hết nấm mốc, nấm men đều thuộc nhóm hiếu khí bắt buộc, 1 số có thể phát triển trong điều kiện vi hiếu khí. Một số có thể tiếp nhận oxy nguyên tử từ cơ chất của chúng nhưng dù ở dạng nào, oxy vẫn là nguyên tố cần thiết cho quá trình phát triển của nấm men và nấm mốc.

Trong thực phẩm, nấm men và nấm mốc hiện diện có thể tăng trưởng làm thay đổi màu của thực phẩm, 1 số có thể tạo độc tố gây ngộ độc thực phẩm.

Mật độ nấm men và nấm mốc trong mẫu được xác định chung dưới dạng tổng nấm men nấm mốc bằng kỹ thuật pha loãng, trải và đếm khuẩn lạc trên môi trường Dichloran Glycerol Agar (DG18) hay Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol Agar (DRBC). Môi trường DG18 được sử dụng cho các loại mẫu thực phẩm có hàm lượng nước thấp như các loại thực phẩm khô, gạo, ngũ cốc, tiêu, các loại thực phẩm có dầu, có hàm lượng đường hay muối cao. Môi trường

DRBC được sử dụng cho các mẫu có hàm lượng nước cao như sữa và các sản phẩm của sữa, các loại rau quả và trái cây tươi, các loại đồ hộp... Đối với mẫu có mật độ nấm mốc thấp, ví dụ như mỹ phẩm, môi trường được sử dụng là môi trường Malt Extract Agar (MEA) hay Potato Dextrose Agar (PDA) chứa 40ppm Chloramphenicol hay chlortetracycline.

4.2. Môi trường và hoá chất

- Dung dịch pha loãng (nước pepton 1%)
- Môi trường thạch Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol Agar (DBRC)
- Môi trường thạch Malt Extract Agar (MEA)
- Môi trường thạch Potato Dextrose Agar (PDA)
- Môi trường thạch Sabouraud Dextrose Agar (SDA)
- Môi trường canh Sabouraud Dextrose Agar (SDB)

Các loại môi trường thạch được chuẩn bị trong đĩa petri, làm khô bề mặt trong điều kiện vô trùng, tránh ánh sáng trước khi sử dụng. Môi trường thạch Sabouraud Dextrose Agar còn được chuẩn bị dưới dạng các ống thạch nghiêng.

4.3. Quy trình phân tích định tính

Đối với mẫu có nguy cơ nhiễm và mật độ nhiễm nấm mốc quá thấp, việc phân tích thường được hiện 1 cách định tính theo quy trình như sau: Mẫu được pha loãng 10^{-1} và đồng nhất trong môi trường SDB. Dịch đồng nhất được ủ ở 30°C , theo dõi từng ngày đến 7 ngày. Nếu trong canh trường có sự xuất hiện của nấm mốc, tiến hành chuyển lên các đĩa thạch SDA, MEA hay PDA, ủ ở 30°C trong 7 ngày. Các khuẩn lạc nấm mốc xuất hiện trên các đĩa môi trường này được cấy chuyển lên bề mặt ống thạch nghiêng SDA để định danh khi cần thiết.

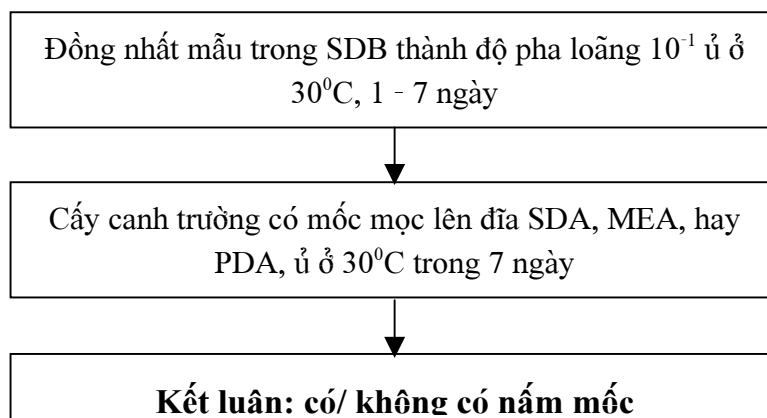
4.4. Quy trình phân tích định lượng

Cân 10g mẫu trong túi PE vô trùng, bổ sung 90ml dung dịch pha loãng. Trường hợp mẫu dạng khô, ngâm mẫu trong dung dịch khoảng 30 phút trước khi đồng nhất mẫu. Mẫu được đồng nhất bằng máy đập mẫu trong 2 phút và được pha loãng thành các dãy nồng độ thập phân liên tiếp thích hợp. Hút vô trùng 0,1ml dịch mẫu lên các đĩa môi trường DBRC hoặc DG18. Nếu mật độ trong nấm men và nấm mốc thấp, có thể cấy 1ml mẫu. Dùng que gạt thủy tinh trải dịch mẫu đều trên bề mặt đĩa môi trường cho đến khô. Đặt ngược đĩa trong bao nylon, để hở miệng bao, ủ ở nhiệt độ 25°C trong 5-7 ngày. Đĩa đã được đặt ngược để tạo độ ẩm cho sự phát triển của nấm men mốc và hạn chế làm khô thạch. Thực hiện 3 đĩa cho mỗi nồng độ pha loãng. Đếm và số lượng khuẩn lạc nấm mốc và nấm men trên tất cả các đĩa cấy. Khi cần thiết phải quan sát bằng kính hiển vi soi nổi hay kính lúp để phân biệt khuẩn lạc nấm men hay nấm mốc. Kết

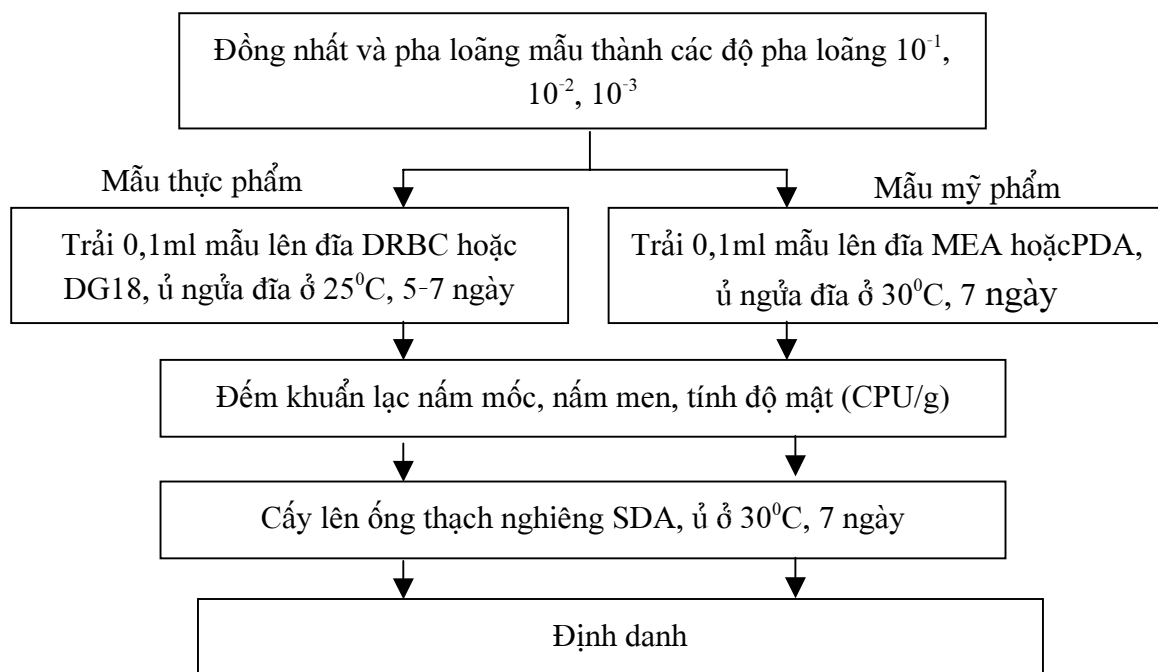
quả được ghi bằng đơn vị CPU/g. Nếu có yêu cầu phân loại hay định danh các loại nghi ngờ sinh độc tố, các khuẩn lạc nấm mốc được cấy chuyển vào trong các ống thạch nghiêng SDA để gửi đến các phòng thí nghiệm chuyên định danh và phân loại nấm.

Cần lưu ý rằng trong thời gian ủ nấm mốc có thể tạo bào tử và phát tán vào trong môi trường nuôi cấy tạo nên các khuẩn lạc mới. Để hạn chế hiện tượng này, trong suốt thời gian ủ, không được chạm tay hoặc di chuyển các đĩa cho đến khi đếm kết quả. Mặt khác, khi tiến hành đếm khuẩn lạc cần hạn chế việc mở đĩa để hạn chế sự phát tán của bào tử vào trong không khí, gây nhiễm vào trong mẫu hay môi trường nuôi cấy khác.

Đối với mỹ phẩm, việc định lượng được thực hiện trên các đĩa môi trường. Môi trường thạch MEA hay thạch PDA. Các đĩa được ủ ở 30⁰ C trong 7 ngày trước khi tiến hành đếm riêng lẻ số khuẩn lạc nấm men, nấm mốc xuất hiện trên đĩa.



Quy trình định tính nấm mốc



Quy trình định lượng tổng nấm men nấm mốc

BÀI 1 : THỰC HÀNH LÀM MÔI TRƯỜNG DINH DƯỠNG.....	33
BÀI 2 : CÁC PHƯƠNG PHÁP PHÂN LẬP VI SINH VẬT	37
BÀI 3 : CÁC PHƯƠNG PHÁP NUÔI CẤY VÀ BẢO QUẢN VI SINH VẬT	42
BÀI 4 : CÁC PHƯƠNG PHÁP NHUỘM MÀU VÀ QUAN SÁT HÌNH THÁI VI SINH VẬT.....	50
BÀI 5 : CÁC PHƯƠNG PHÁP XÁC ĐỊNH SỐ LƯỢNG.....	57
TẾ BÀO VI SINH VẬT	57
BÀI 6 : XÁC ĐỊNH KHẢ NĂNG PHÂN GIẢI CÁC CHẤT HỮU CƠ KHÔNG CHỨA NITƠ CỦA VSV	66
BÀI 7 : XÁC ĐỊNH KHẢ NĂNG PHÂN GIẢI CÁC CHẤT HỮU CƠ CHỨA NITƠ CỦA VI SINH VẬT.....	74
BÀI 8 : PHƯƠNG PHÁP XÁC ĐỊNH KHẢ NĂNG TẠO SẢN PHẨM BẬC HAI Ở VI SINH VẬT	77
BÀI 9 : PHƯƠNG PHÁP THU NHẬN VÀ XÁC ĐỊNH HOẠT TÍNH ENZYM TỪ VI SINH VẬT	79
BÀI 10 : PHƯƠNG PHÁP XÁC ĐỊNH TỔNG VI KHUẨN HIẾU KHÍ VÀ COLIFORM	89