

BÀI 3: NUÔI CẤY, QUAN SÁT SỰ PHÁT TRIỂN CỦA VI SINH VẬT

I. MỤC ĐÍCH YÊU CẦU

- Nắm vững các nguyên tắc và mục đích của việc nuôi cấy vi sinh vật
- Thực hiện được các thao tác cấy truyền từ ống giống sang các loại môi trường thạch nghiêng, thạch đứng, thạch đĩa...
- Theo dõi, quan sát và ghi nhận sự phát triển của vi sinh vật trên các loại môi trường nuôi cấy.

II. VẬT LIỆU

- Bút ghi ống nghiệm, gòn thấm
- Que cấy vòng, que cấy móc
- Đèn cồn, giá để ống nghiệm
- Các ống môi trường thạch nghiêng (Peptone, Hansen, PGA), thạch đĩa (Peptone, Hansen, PGA), môi trường lỏng (Peptone, Hansen, PG)
- Các ống giống vi khuẩn (*E. coli*, *Bac. subtilis*, *Streptococcus*), nấm men (*Saccharomyces*...), nấm sợi (*Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor*, *Rhizopus*...)

III. PHƯƠNG PHÁP NUÔI CẤY VI SINH VẬT

1. Khái niệm

Quá trình nuôi cấy vi sinh vật thực chất gồm 2 khâu: nuôi và cấy

- Nuôi là quá trình đảm bảo và duy trì những điều kiện thuận lợi nhất cho sự hoạt động và phát triển của vi sinh vật.
- Cấy là những thao tác chuyển vi sinh vật từ môi trường đang sống sang môi trường thuận lợi hơn cho sự phát triển của chúng.

Hai khâu này không thể tách rời nhau trong quá trình nghiên cứu và ứng dụng của vi sinh vật.

2. Mục đích của việc nuôi cấy

- Phát hiện sự có mặt của vi sinh vật trong các vật liệu nghiên cứu
- Tiến hành việc nhân giống vi sinh vật một cách nhanh chóng
- Cấy truyền từ canh trường cũ sang canh trường mới để giữ giống
- Nghiên cứu các đặc tính sinh học của vi sinh vật.

3. Nguyên tắc

- Mọi thao tác nuôi cấy đều phải thực hiện trong điều kiện vô trùng để tránh tạp nhiễm.
- Môi trường và dụng cụ nuôi cấy phải được khử trùng triệt để.

- Duy trì tốt các điều kiện nuôi cấy để vi sinh vật phát triển

4. Các phương pháp nuôi cấy

a. Phương pháp chung của việc cấy chuyền

Ví dụ: cấy truyền từ ống nghiệm chứa giống sang ống nghiệm chứa môi trường

Gồm các thao tác chính sau:

- Đốt đèn cồn lên
- Tay trái cầm 2 ống nghiệm: ống giống nằm ở ngoài, ống môi trường ở trong, giữ cả hai ống hơi nghiêng.
- 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 bông ra và giữ trên tay đến khi đầy lại
- 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 vào ống nghiệm môi trường để thực hiện thao tác cấy truyền.
- Rút que cấy ra, khử trùng lại phần không khí nơi miệng ống nghiệm rồi đậy nút bông lại.
- Để các ống nghiệm vào giá, đốt lại que cấy trên đèn cồn rồi để vào chỗ cũ.
- Dán nhãn ghi tên giống vi sinh vật, ngày cấy, tên môi trường vào thành ống nghiệm

Chú ý:

Cách cấy truyền này có thể tiến hành từ canh trường đặc (hoặc lỏng) sang môi trường đặc (hoặc lỏng)

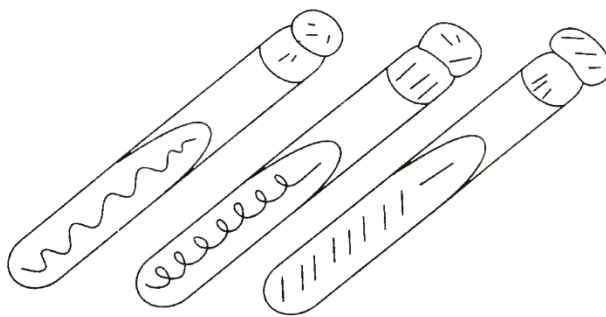
Nếu ống giống là canh trường lỏng, ngoài việc dùng que cấy còn có thể dùng pipet để hút canh trường. Pipet phải được chuẩn bị và làm vô khuẩn trước (rửa sạch, sấy khô, bọc giấy, khử trùng). Khi dùng tháo giấy ra và dùng ngay. Dùng xong cắm pipet vào dung dịch khử khuẩn.

b. Phương pháp cấy trên thạch nghiêng

Phương pháp này dùng để cấy truyền các vi sinh vật hiếu khí.

Thông thường dùng que cấy vòng, trình tự tiến hành giống như trên. Nhưng sau khi lấy được giọt canh trường vi sinh vật vào đầu que cấy rồi, ta tiếp tục như sau:

- Đưa đầu que cấy vào tận đáy ống nghiệm
- Nhẹ nhàng hòa giọt canh trường vi sinh vật vào giọt nước ngưng tụ ở đáy ống nghiệm.
- Nhẹ nhàng và từ từ kéo đầu que cấy trên mặt thạch từ đáy lên trên theo các kiểu như sau:
 - + Theo kiểu hình chữ chi
 - + Theo hình vòng xoắn
 - + Theo đường vạch ngang song song.

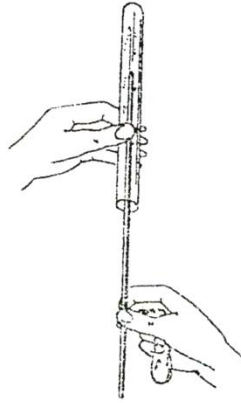


Hình 4: Một số kiểu cấy trên ống thạch nghiêng

c. Cấy đâm sâu trên thạch đứng

Phương pháp này dùng để cấy các vi sinh vật kỵ khí. Khi cấy ta dùng que cấy nhọn và đâm sâu vào môi trường. Cách tiến hành tương tự như trên, chỉ thay đổi một ít như sau:

- Quay ngược ống môi trường cho miệng ống nghiệm hướng xuống dưới để tránh nhiễm lúc cấy.
- Đưa que cấy đã có vi sinh vật đâm sâu vào dọc theo ống thạch cho đến tận đáy ống nghiệm. Tùy yêu cầu mà có thể đâm 1 – 3 đường, có thể đâm chính giữa ống hoặc sát thành ống.
- Khi cắm que cấy vào cũng như khi rút ra, chú ý giữ que cấy thẳng, làm nhẹ nhàng không làm cho môi trường bị nứt nẻ.



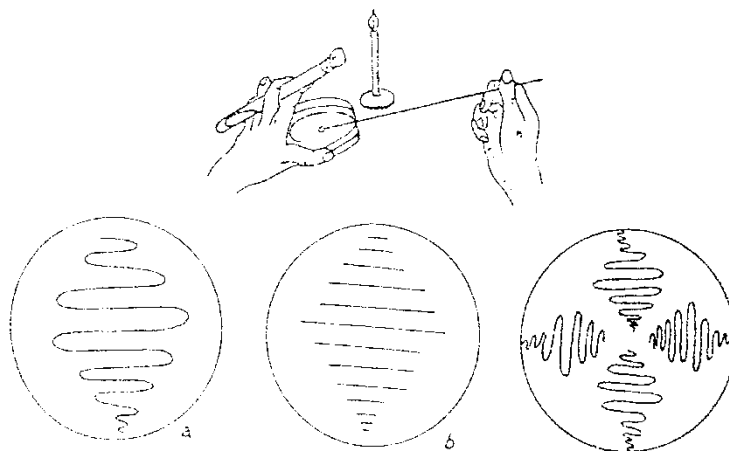
Hình 5: Cấy đậm sâu vào thạch đứng

d. Phương pháp cấy trên đĩa petri

Có thể cấy trên đĩa petri theo một trong hai cách: dùng que cấy vòng, dùng pipet. Trong phạm vi bài này chúng ta chỉ thực hiện theo cách dùng que cấy vòng và trình tự được thực hiện như sau:

- Để đĩa petri lên bàn
- Dùng que cấy lấy canh trường vi sinh vật theo thứ tự và yêu cầu vô trùng như đã nêu phần trên
- Tay trái hé mở nắp hộp vừa đủ để cho đầu que cấy vào
- Nhẹ nhàng và nhanh chóng lướt que cấy trên mặt thạch theo các kiểu:
 - + Theo hình chữ chi trên toàn bộ bề mặt thạch
 - + Theo những đường song song
 - + Theo 4 hình chữ chi ở bốn góc của đĩa thạch.

Trong quá trình cấy, vì lượng vi sinh vật sẽ bị giảm dần theo đường cấy nên khi vi sinh vật phát triển, càng gần cuối đường số khuẩn lạc càng thưa dần.



Hình 6: Các kiểu cấy trên thạch đĩa

IV. CÁC ĐIỀU KIỆN NUÔI VI SINH VẬT

Để đảm bảo vi sinh vật phát triển tốt, sau khi cấy xong phải quan tâm đến các điều kiện nuôi dưỡng. Có nhiều điều kiện ảnh hưởng đến sự phát triển của vi sinh vật, nhưng đáng chú ý nhất là những điều kiện sau:

1. Nhiệt độ

Tùy loài vi sinh vật, chọn nhiệt độ tối thích cho sự phát triển của chúng và duy trì sự ổn định nhiệt độ đó. Dựa vào nhiệt độ tối thích cho sự phát triển của vi sinh vật, người ta chia chúng làm 3 nhóm sau đây:

- + Vi sinh vật ưa ấm có nhiệt độ tối thích 20 – 37⁰C
- + Vi sinh vật ưa nóng có nhiệt độ tối thích 55 - 60⁰C
- + Vi sinh vật ưa lạnh có nhiệt độ tối thích 10 – 15⁰C

Để duy trì nhiệt độ thích hợp, ta sử dụng các tủ hoặc phòng ươm có bộ phận điều chỉnh nhiệt độ tự động luôn luôn duy trì nhiệt độ ở mức nhất định nào đó.

2. Độ ẩm

Để đảm bảo độ ẩm cho vi sinh vật phát triển ta có thể thực hiện bằng các cách sau:

- Khi chuẩn bị môi trường phải đảm bảo đủ lượng nước
- Phun nước vô khuẩn vào phòng nuôi hoặc để nước bốc hơi trong tủ ươm.

3. Điều kiện hiếu khí và yếm khí:

- Nuôi hiếu khí

Cung cấp thường xuyên và đầy đủ oxy cho vi sinh vật có thể thực hiện bằng các biện pháp:

- + Lớp môi trường nuôi cấy có độ dày vừa phải (2 – 8cm) có thể nuôi trong ống nghiệm, khay, bình tam giác.
- + Các bình chứa canh trường được lắc thường xuyên trong quá trình nuôi để cung cấp thêm oxy cho vi sinh vật.
- + Nếu nuôi cấy sâu trong môi trường lỏng, thì phải tiến hành sục khí thường xuyên hay định kỳ.

- Nuôi kỵ khí

Ngăn cách không cho vi sinh vật tiếp xúc với oxy bằng cách:

- + Sau khi cấy xong ta đổ lên bề mặt môi trường một lớp dầu paraffin, dầu vazolin hoặc lớp thạch dày khoảng 2 cm. Cách này đơn giản dễ áp dụng. Chú ý: dầu và thạch phải vô khuẩn, dầu phải trung tính.
- + Cấy đậm sâu trong môi trường đặc

+ Nuôi cấy trong bình hút chân không, có thể dùng những ống nghiệm đặc biệt gieo cấy xong hút hết không khí rồi hàn kín lại.

+ Đun sôi môi trường 20 – 30 phút rồi làm nguội nhanh để đuổi hết oxy trong đó.

+ Dùng hóa chất để loại trừ oxy của không khí trong dụng cụ nuôi.

+ Có thể nuôi vi sinh vật hiếu khí cùng vi sinh vật kỵ khí. Phương pháp này thì khó áp dụng.

V. QUAN SÁT ĐẶC TÍNH SINH LÝ CỦA VI SINH VẬT NUÔI CẤY

Vi sinh vật khi phát triển trên môi trường thường hình thành các khuẩn lạc, và các đặc điểm sinh lý khác đặc trưng cho loài vi sinh vật đó. Việc quan sát này hết sức quan trọng trong việc phân loại và những nghiên cứu về sinh hóa, di truyền của loài đó. Việc quan sát có thể thực hiện bằng mắt thường, kính lúp, kính hiển vi quang học.

1. Quan sát đặc tính phát triển của vi sinh vật trên môi trường đặc.

Khi quan sát sự phát triển của vi sinh vật trên môi trường đặc cần ghi nhận các đặc điểm sau đây:

- Hình dạng khuẩn lạc (dạng tròn, dạng rễ cây, dạng không đều hay dạng bầu dục...)

- Kích thước khuẩn lạc (tính bằng mm). Nếu là dạng khuẩn lạc tròn ta đo đường kính khuẩn lạc. Nếu không phải hình tròn ta đo chiều dài nhất.

- Màu sắc: ghi màu sắc khuẩn lạc tạo thành, và màu của môi trường

- Bề mặt khuẩn lạc: ghi nhận bề mặt khuẩn lạc bóng, xù xì, gập nếp hay gồ ghề...

- Mép khuẩn lạc: bằng phẳng, lượn sóng hay răng cưa....

- Độ đặc: dạng mỡ, bột nhão, dạng nhót, dạng màng

2. Quan sát đặc tính phát triển của vi sinh vật trong môi trường lỏng.

Sự sinh trưởng của vi sinh vật trong môi trường lỏng ở điều kiện nuôi cấy ổn định có tính chất đồng nhất hơn trong môi trường đặc. Khi quan sát vi sinh vật phát triển trong môi trường lỏng cần ghi nhận:

- Sinh trưởng yếu, vừa, hay mạnh mẽ.

- Đục môi trường: đục đồng đều, dạng bông

- Khả năng tạo váng: dạng váng vòng hay dạng kín, váng mỏng hay dày, phẳng hay xù xì, nhẵn nhụi hay gập nếp, khô hay nhày, nổi hay chìm.

- Khả năng tạo thành cặn tủa: ít hay nhiều, xốp hay đặc.

VI. THỰC HÀNH VÀ BÁO CÁO KẾT QUẢ

- Thực hành thao tác cấy truyền vi khuẩn, nấm men từ ống giống sang môi trường thạch nghiêng, đĩa petri và môi trường lỏng. Nuôi ủ ở nhiệt độ phòng và theo dõi sự phát triển.

- Thực hành thao tác cấy truyền nấm mốc từ ống giống sang môi trường thạch đĩa và thạch nghiêng (cấy 3 điểm). Nuôi ủ ở nhiệt độ phòng và theo dõi sự phát triển.

Câu hỏi

1. Nêu rõ nguyên tắc và mục đích của việc cấy truyền vi sinh vật từ ống giống sang môi trường?

2. Trình bày tóm tắt thao tác cấy truyền vi sinh vật từ ống giống sang môi trường thạch nghiêng và thạch đĩa?

3. Nêu và phân tích các điều kiện chính trong quá trình nuôi vi sinh vật?

4. Sau thời gian nuôi cấy 3 – 5 ngày quan sát và ghi nhận sự phát triển của vi khuẩn, nấm men, nấm mốc?

5. Mô tả hình dạng, màu sắc khuẩn lạc của vi khuẩn, nấm men, nấm sợi trên môi trường đặc?