

**BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO  
TRƯỜNG ĐẠI HỌC NÔNG NGHIỆP HÀ NỘI**  
\*\*\*

**NGUYỄN XUÂN THÀNH (Chủ biên) VŨ THỊ HOÀN  
NGUYỄN THẾ BÌNH - ĐINH HỒNG DUYÊN**

**Chủ biên & hiệu đính  
PGS.TS NGUYỄN XUÂN THÀNH**

# **THỰC TẬP VI SINH VẬT** Chuyên ngành

**Hà Nội - 2007**

## MỤC LỤC

Nội dung	Trang
Bài số 1: Trang thiết bị cần thiết trong nghiên cứu vi sinh vật	1
Bài số 2: Phương pháp cố định tiêu bản và nhuộm tế bào vi sinh vật	12
Bài số 3: Chuẩn bị dụng cụ và môi trường nuôi cấy vi sinh vật	16
Bài số 4: Nuôi cấy vi sinh vật	26
Bài số 5: Phương pháp lấy mẫu để phân tích vi sinh vật	31
Bài số 6: Phương pháp phân tích vi sinh vật	33
Bài số 7: Đánh giá đặc tính sinh học của vi sinh vật	37
Bài số 8: Phân lập tuyển chọn <i>Azotobacter</i> từ đất	40
Bài số 9: Phương pháp lấy mẫu và phân lập tuyển chọn vi khuẩn <i>Rhizobium</i>	42
Bài số 10: Phương pháp xác định nhanh trao đổi chất ở vi sinh vật	46
Bài số 11: Vi sinh vật trong môi trường	50
Bài số 12: Phương pháp xác định nấm men, nấm mốc, tảo và nguyên sinh động vật	53
Bài số 13: Quá trình chuyển hoá nitơ dưới tác dụng của vi sinh vật	60
Bài số 14: Chuyển hoá lưu huỳnh dưới tác dụng của vi sinh vật	63
Bài số 15: Vi sinh vật phân giải lân (phospho)	65
Bài số 16: Enzym trong quá trình trao đổi nitơ, phospho, lưu huỳnh	67
Bài số 17: Xác định sinh khối vi sinh vật đất	75
Bài số 18: Sinh trưởng của vi sinh vật	83
Bài số 19: Thăm quan kiến tập về vi sinh vật	86
Phụ lục	88
Tài liệu tham khảo	91

## **Bài số 1**

### **TRANG THIẾT BỊ CẦN THIẾT TRONG NGHIÊN CỨU VI SINH VẬT**

#### **Mục đích yêu cầu:**

- + Nắm được những máy móc, trang thiết bị cần thiết trong nghiên cứu về vi sinh vật.
- + Biết sử dụng thành thạo một số máy móc thông dụng của phòng nghiên cứu.
- + Hiểu được tầm quan trọng của công tác tiêu độc, khử trùng.
- + Sử dụng thành thạo kính hiển vi
- + Phân biệt các dạng hình thái của vi sinh vật

#### **Nội dung :**

- + Giới thiệu những trang thiết bị cần thiết trong phòng nghiên cứu vi sinh vật.
- + Giới thiệu các dụng cụ và nguyên liệu cần thiết để nghiên cứu vi sinh vật: dụng cụ lọc, khử trùng, dụng cụ quang học, dụng cụ đo lường, môi trường nuôi cấy.
- + Thao tác vận hành và sử dụng các trang thiết bị trong phòng nghiên cứu vi sinh vật
  - + Cấu tạo và sử dụng, bảo quản kính hiển vi
  - + Quan sát hình thái vi sinh vật

## **I. MÁY MÓC**

### **1. Tủ nuôi cấy vi sinh vật (Incubator)**

Tủ nuôi cấy hay còn gọi là tủ định ôn là thiết bị quan trọng dùng trong công tác nghiên cứu vi sinh vật, vì nhiệt độ trong tủ có thể thay đổi từ  $0^{\circ} - 90^{\circ} \text{C}$  tùy theo ý muốn của người nghiên cứu và nhiệt độ trong tủ sau khi đã được xác định thì luôn luôn ở trạng thái ổn định trong suốt thời gian nuôi cấy.

#### **1.1. Cấu tạo**

Cấu tạo vỏ tủ nuôi cấy có 2 lớp: lớp trong là kim loại dẫn nhiệt để giữ nhiệt độ bên trong của tủ, lớp ngoài là kim loại dày hơn và được bọc phía trong bởi một chất cách nhiệt (amiant). Giữa lớp trong và lớp ngoài là khoảng trống để giữ cho nhiệt độ trong tủ ít bị biến đổi.

Trong tủ có bộ phận cảm nhiệt để báo nhiệt độ lên xuống cho rơ-le hoạt động và quạt gió được lắp ở phần giữa thân để điều hoà nhiệt độ bên trong.

Phần ngoài tủ nuôi có hệ thống bảng điện tử để điều chỉnh nhiệt độ theo yêu cầu của nghiên cứu. Phía trên tủ được lắp van an toàn, nếu nhiệt độ trong tủ vượt quá dao động biên độ, van an toàn sẽ tự ngắt.

#### **1.2. Cách sử dụng**

Đóng mạch điện, bấm nút mở công tắc tủ (có thể giữ vài giây đến khi xuất hiện đèn báo trên bảng điện tử). Sau đó bấm nút đặt nhiệt độ và thời gian (set up) theo yêu cầu nuôi cấy, điều chỉnh nhiệt độ và thời gian bằng ấn nút tương

ứng mũi tên lên hoặc xuống. Nhiệt độ trong tủ ẩm tăng dần và đạt tới nhiệt độ đã xác định.

Nhiệt độ sẽ được duy trì trong suốt thời gian nuôi cấy đã định sẵn. Trên bảng điện tử luôn xuất hiện chỉ số báo nhiệt độ thực tế trong tủ. Khi đủ thời gian nuôi cấy, tủ sẽ phát ra tiếng báo hiệu và rơ le tự ngắt để tự động tắt chế độ làm việc.

Nếu muốn nuôi cấy liên tục lâu dài có thể không cần đặt chế độ thời gian, chỉ đặt nhiệt độ. Khi nào muốn kết thúc thì bấm nút tắt công tắc nguồn.

### ***1.3. Khi sử dụng máy cần chú ý những điểm sau đây***

- + Hiệu chỉnh thiết bị trước khi sử dụng.
- + Phải nối tủ với dây đất và kiểm tra điện thế của máy với điện thế ở nơi đặt máy xem có giống nhau không, trường hợp không giống nhau phải dùng biến thế.
- + Khi sử dụng tủ ẩm lần đầu, phải kiểm tra bộ phận điều chỉnh nhiệt độ xem có chính xác không, nhiệt độ trong tủ có đều không.
- + Cửa tủ luôn luôn phải đóng kín, trừ khi lấy hoặc cho nguyên liệu vào nuôi cấy nhưng cũng không được mở cửa tủ rộng và lâu.
- + Luôn luôn phải đảm bảo cho tủ ẩm được khô ráo, sạch sẽ, phải cho tủ hoạt động thường xuyên nhất là những hôm trời ẩm. Khi làm đổ các chất dịch nuôi cấy hoặc làm bẩn trong tủ, phải lau chùi và sát trùng ngay.
- + Nên đặt trong tủ 1 cốc nước vô trùng trong quá trình nuôi cấy để giúp cho quạt gió hoạt động tốt.
- + Khi không dùng, tắt công tắc điện và rút phích cắm điện ra.

## **2. Tủ sấy khô (Drying oven)**

### ***2.1. Tác dụng***

Dùng tủ sấy khô để khử trùng các dụng cụ thủy tinh, đồ sứ như ống nghiệm, xi lanh, hộp lồng, cốc, phễu, cối chày sứ..., các đồ kim khí như dao, kéo, panh và các dụng cụ khác không có nước khác như bông, băng, vải... Trừ vật liệu làm từ cao su và môi trường nuôi cấy không được khử trùng bằng tủ sấy khô.

Nguyên lý cấu tạo của tủ sấy khô cũng gần giống như tủ ẩm, chỉ khác là có thể tiệt trùng ở nhiệt độ 175 - 200°C.

### ***2.2. Cách sử dụng tủ sấy khô***

Các dụng cụ phải rửa sạch, để khô, bao gói cẩn thận trước khi cho vào tủ, sau khi sắp xếp các thứ vào trong tủ rồi đóng kín cửa và đóng các lỗ thông khí. Bật công tắc điện, đặt chế độ làm việc cho tủ (điều chỉnh nhiệt độ và thời gian giống như với tủ định ôn). Thông thường dụng cụ nuôi cấy và phân tích vi sinh vật được khử trùng ở 160-180°C trong 2 giờ. Với các dụng cụ, như: pipét, xi lanh,... không được sấy quá 60°C vì nhiệt độ cao làm giãn nở thủy tinh dẫn đến mất độ chính xác của dụng cụ. Lưu ý khi sấy không nên đặt dụng cụ sát thành tủ vì ở đây nhiệt độ thường cao

hơn nhiều dễ làm cháy giấy gói hoặc nút bông, cũng không nên xếp dụng cụ quá khít nhau để không khí có thể lưu thông được và làm nóng đều các vật cần khử trùng.

Sau khi ngắt mạch điện, chờ nhiệt độ hạ dần xuống bằng nhiệt độ phòng thì mới được mở cửa tủ để lấy dụng cụ sấy ra. Dụng cụ lấy ra phải để trên giá gỗ, trên giấy hoặc vải, không được để ở trên gạch men, trên sàn gạch hoặc sàn xi măng vì dụng cụ đang nóng gặp lạnh sẽ dễ vỡ và làm ảnh hưởng đến tính vô trùng của dụng cụ.

### 3. Nồi hấp hơi nước cao áp (Autoclave)

#### 3.1. Nguyên lý

Nồi hấp hơi nước cao áp (hình 1) làm bằng kim loại chịu được nhiệt độ cao (ít nhất là 135°C) có thể dùng điện, dùng củi hoặc dùng than đun cho nước sôi, hơi nước sẽ nén dần lại ở trong nồi và nếu tiếp tục để cho nước sôi thì áp lực trong nồi sẽ tăng dần, áp lực càng tăng thì nhiệt độ của hơi nước trong nồi càng cao, như vậy giữa nhiệt độ  $t^0$  của hơi nước và áp lực P của nó có liên quan với nhau, nhưng không phải theo một tỷ lệ đường thẳng (xem đồ thị).

Khi áp lực kế chỉ số 0 có nghĩa là: áp lực P trong nồi hấp = áp lực P không khí.

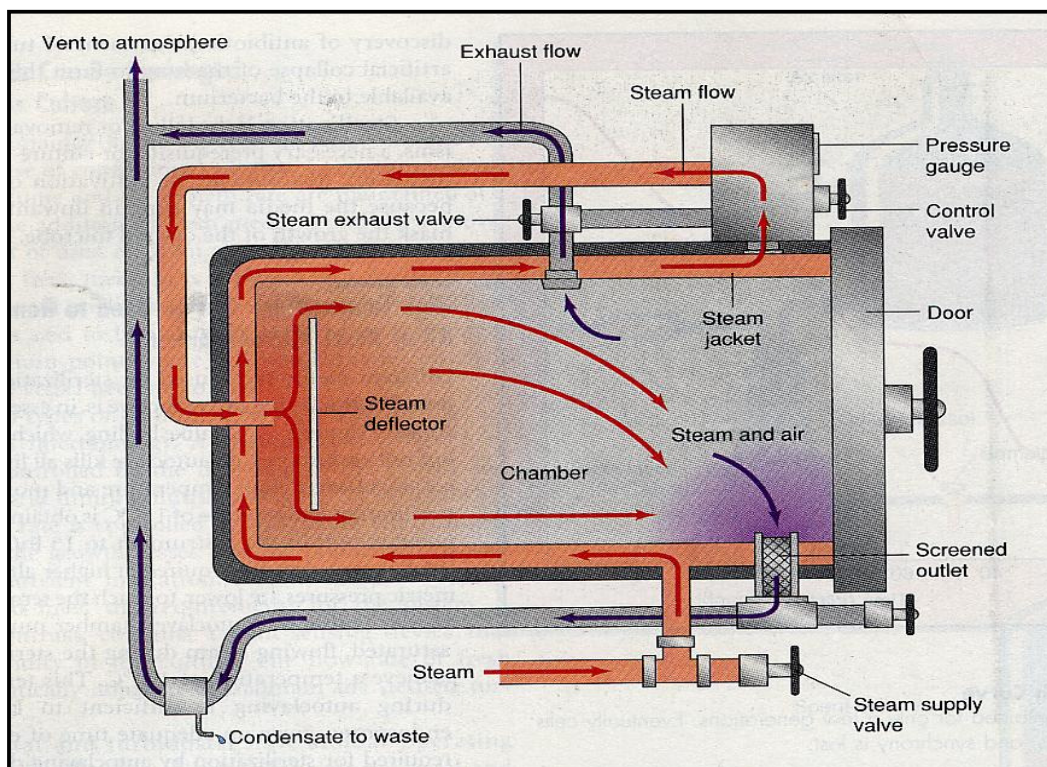
Cho nên khi áp lực kế chỉ  $1\text{kg}/\text{cm}^2$  thì chính là chỉ hiệu số giữa áp lực bên trong với áp lực không khí tồn tại trong nồi.

$$1\text{kg}/\text{cm}^2 = P (\text{trong nồi}) - P (\text{không khí trong nồi})$$

Do đó áp lực P trong nồi không phù hợp với P áp lực kế hay nói một cách khác, nhiệt độ trong nồi không tương ứng với nhiệt độ của áp lực kế. Vì vậy muốn cho nhiệt độ trong nồi phù hợp với áp lực kế thì phải loại bỏ hết không khí trong nồi ra ( $1\text{kg}/\text{cm}^2 = 1\text{atm} = 1\text{ phoud}$ ).

**Bảng 1. So sánh mối liên quan giữa áp suất ghi trên áp kế của nồi hấp biểu thị bằng atmosphere và nhiệt độ trong nồi đã loại hết không khí**

Áp suất (atm)	Nhiệt độ (°C)	Áp suất (atm)	Nhiệt độ (°C)	Áp suất (atm)	Nhiệt độ (°C)	Áp suất (atm)	Nhiệt độ (°C)
0,0	100,0	0,5	112,5	1,0	121,0	1,5	127,0
0,1	102,5	0,6	114,5	1,1	129,9	1,6	128,0
0,2	105,0	0,7	116,	1,2	124,0	1,7	129,0
0,3	107,5	0,8	117,0	1,3	125,0	1,8	130,0
0,4	110,0	0,9	119,0	1,4	126,0	1,9	131,0
						2,0	132,0



**Hình 1. Sơ đồ nồi hấp áp lực**

Để loại bỏ hết không khí trong nồi ra có 2 cách:

- Đóng khóa thoát hơi để tăng áp lực trong nồi lên đến khoảng 0,3 atm rồi xì cho thoát hết hơi ra, sau đó khóa lại và cho tăng áp lực.
- Mở khóa thoát hơi và đun cho đến khi hơi nước bắt đầu thoát ra thành một luồng hơi trắng khá mạnh, khá đều thì đóng lại và cho tăng áp lực.

### **3.2. Cách sử dụng nồi hấp cao áp**

- Đổ nước vào nồi hấp với lượng vừa đủ (xem ở vạch ngang ghi trên ống thủy tinh hoặc bình chứa lắp bên ngoài nồi hấp). Chú ý nước phải ngập dây may so trong nồi nếu là nồi hấp xách tay.
- Các dụng cụ đem hấp phải được bao gói kỹ, đối với các bình và ống môi trường có nút bông phải bọc bằng giấy dầu hoặc giấy nhôm để tránh hơi nước đọng làm ướt nút.
- Khi sắp xếp dụng cụ vào nồi hấp không nên để sát nhau quá, để vật nặng xuống dưới vật nhẹ lên trên.
- Đậy nắp, khóa chặt các ốc theo từng đôi đối xứng nhau để khỏi vênh, khỏi hở, khi tháo khóa cũng phải làm như vậy. Đóng van điều áp và van xả hơi.
- Mở mạch điện hoặc đốt nhiên liệu để cung cấp nhiệt cho nồi, ấn nút mở công tắc nồi (nút on), đặt chế độ làm việc (nhiệt độ và thời gian hấp) cho nồi

bằng cách điều chỉnh mũi tên lên xuống. Chế độ làm việc luôn thể hiện trên bảng ghi điện tử. Sau khi hấp đủ theo nhiệt độ và thời gian định sẵn, rơ le sẽ tự ngắt, nồi phát ra tiếng kêu báo hiệu quá trình hấp đã kết thúc.

Với nồi hấp xách tay phải luôn luôn có mặt để theo dõi kim chỉ áp lực trên đồng hồ áp lực kể trong khi hấp, loại hết không khí trong nồi theo 2 phương pháp đã nêu trên. Khi đạt tới mức cần thiết thì điều chỉnh nguồn nhiệt để duy trì áp lực không đổi trong một khoảng thời gian cần thiết.

Nhiệt độ và thời gian hấp khử trùng phụ thuộc vào vật đem khử trùng và mục đích nghiên cứu. Người ta thường hấp ở nhiệt độ 121°C trong khoảng 20 phút thì nha bào của một số loại vi khuẩn cũng sẽ bị tiêu diệt.

- Khi đạt tới thời gian cần thiết thì ngắt điện (ấn nút off) hoặc rút hết nhiên liệu ra và đợi cho áp lực hạ dần xuống 0° C, nhiệt độ trong nồi giảm hẳn rồi mới được mở nắp lấy dụng cụ đã khử trùng ra. Chú ý tránh hạ áp lực đột ngột bằng cách mở van xì hơi ra quá mạnh sẽ làm rạn nứt hoặc vỡ dụng cụ. Cũng không nên để nồi hấp nguội lạnh mới lấy dụng cụ ra, vì lúc này nắp nồi sẽ mút chặt vào miếng đệm cao su rất khó mở.

- Các dụng cụ lấy ra không được để ở nền gạch men, nền đá, nền xi măng (vì dụng cụ đang nóng gặp lạnh sẽ vỡ, nứt) và đảm bảo tính vô trùng cho dụng cụ.

#### **4. Tủ lạnh (Freezer)**

Tủ lạnh là một thiết bị quan trọng dùng để giữ và bảo quản giống vi khuẩn, virus và bảo quản các loại huyết thanh, các loại vacxin, các môi trường dùng để nuôi cấy...

Tủ lạnh 0° - 4° C dùng để giữ giống vi khuẩn.

Tủ lạnh -15° C đến -30° C dùng để giữ giống virus.

#### **5. Máy ly tâm (Centrifugal machine)**

##### **5.1. Công dụng**

- Tập trung ở đáy ống các phần tử cần nghiên cứu chứa trong một bệnh phẩm hay chất mang.

- Tập trung vi khuẩn nuôi cấy trong môi trường lỏng để tách riêng vi khuẩn.

- Làm trong một chất lỏng chứa nhiều phần tử đặc vẩn đục.

- Tách hồng cầu riêng với huyết tương....

##### **5.2. Cách sử dụng**

Máy ly tâm thông thường có một trục quay tròn, về phía trên của trục có một hình sao để nhận các ống chứa chất lỏng cần ly tâm. Các ống này được móc vào sao bằng một cái quai. Khi quay các ống sẽ giãn ra thẳng góc với trục quay đứng và các hạt lắng xuống theo đường trục của ống và dồn về phía đáy. Với kiểu máy này, tốc độ tối đa là 4500 - 6000 vòng trong một phút.

Các máy ly tâm gần đây có bộ phận thắng bằng tự động, có máy để thời gian tự động, có đồng hồ chỉ tốc độ v.v..., khi ly tâm chỉ cần vặn các nút theo ý muốn.

#### **6. Những thiết bị cần thiết khác**

- Máy hút chân không (vacuum gauge)
- Máy đếm khuẩn lạc (colony counting)
- Máy đo pH (pH meter) hay thang đo pH (pH paper set)
- Máy cất nước (Deionizers)
- Máy đánh mẫu (Mixers)
- Máy đếm tế bào (cell counting)
- Máy lắc (shaker)
- Phòng hoặc buồng vô trùng (clean bench, laminars)

## **II. CÁC DỤNG CỤ VÀ THIẾT BỊ PHÒNG THÍ NGHIỆM**

### **1. Thiết bị quang học**

- Kính hiển vi quang học (Microscopy)
- Kính hiển vi chụp ảnh
- Đèn soi kính hiển vi
- Tủ quang nền đen
- Thước đo vật kính và thước đo thị kính
- Kính lúp hai mắt đeo trán
- Máy projector
- Máy Over head
- Máy ảnh
- Đèn tử ngoại (UV lamp)

### **2. Thiết bị đo lường**

- Cân kỹ thuật (technical balance)
- Cân tiểu ly có lồng kính
- Cân tiểu ly xách tay
- Cân bàn
- Cân phân tích điện
- Nhiệt kế treo tường và các loại nhiệt kế đo nhiệt độ khác
- Đồng hồ điện tử đếm phút, giây

### **3. Các loại dụng cụ khác**

- Các loại dụng cụ thủy tinh: Phiến kính, hộp lồng, ống nghiệm, lọ, bình, phễu, cốc ống đong, xi lanh, pipet, que gạt, đèn cồn...

- Các loại dụng cụ kim loại: Dao mổ các loại, kéo thẳng, kéo cong, panh, que cấy, đèn xì, hộp tiêu độc, cưa xương...

- Các loại dụng cụ đồ men, sứ: Khay men, cối chày sứ, xoong nồi để pha chế môi trường.

- Các loại dụng cụ cao su, vải, bông, băng: Găng tay để mổ và để rửa dụng cụ, ủng, bông thấm nước, bông không thấm nước, vải gạc, vải lọc, vải màn.

- Các loại hóa chất để chế môi trường, rửa dụng cụ thủy tinh và sát trùng tiêu độc.

- Các loại thuốc nhuộm và thuốc thử phản ứng sinh hóa.

- Các loại giống vi khuẩn và virus, các loại kháng huyết thanh để chẩn đoán, các loại khuẩn tố để chẩn đoán.

### **III. KÍNH HIỂN VI**

Kính hiển vi là một dụng cụ quang học rất cần thiết để nghiên cứu hình thái vi sinh vật và nghiên cứu những vật hết sức nhỏ mà mắt thường không thể nhìn thấy được, có nhiều loại kính hiển vi khác nhau.

#### **\* Cấu tạo kính hiển vi quang học**

Kính hiển vi quang học gồm có 2 bộ phận:

#### **1. Bộ phận cơ học**

##### **1.1 Chân kính hay đế kính**

Dùng để đỡ kính hiển vi ở trạng thái cân bằng, cấu tạo từ kim khí đặc biệt.

##### **1.2 Thân kính**

Nối liền với chân kính, được tạo từ loại kim khí đặc biệt. Thân kính để gắn toàn bộ các bộ phận của kính hiển vi.

##### **1.3 Ống kính**

Là một ống kim khí rỗng hình trụ lắp trên trụ kính, đầu trên của ống kính lắp thị kính, phía dưới của ống kính là bàn xoay dùng để lắp các vật kính. Tác dụng của ống kính là khi vật ảnh được phóng đại lần thứ nhất bởi vật kính, thì đưa vật ảnh qua ống kính tới thị kính để phóng vật ảnh lần thứ 2. Như vậy vật ảnh ta quan sát thấy chính là ảnh ảo.

##### **1.4 Khay kính hay đĩa kính**

Có thể hình vuông hay hình tròn là nơi đặt tiêu bản để quan sát, ở giữa có lỗ thấu quang để đưa ánh sáng từ bộ tụ quang kính lên tiêu bản. Trên khay kính có bộ phận kẹp tiêu bản cho vững và bộ phận gọi là xa để di chuyển tiêu bản theo hai chiều khác nhau, từ trái sang phải, từ trước ra sau và ngược lại để tìm vật ảnh. Ngoài ra, khay kính còn có thể di chuyển theo các chiều bằng cách vận hai ốc ở hai bên khay kính.

##### **1.5 Ốc điều chỉnh**

Gồm có ốc điều chỉnh lớn (ốc sơ cấp) và ốc điều chỉnh nhỏ (ốc vi cấp). Ốc sơ cấp dùng để điều chỉnh tiêu điểm, ốc vi cấp dùng để điều chỉnh cho ảnh vật rõ nét.

## **2. Bộ phận quang học:**

### **2.1. *Gương phản chiếu***

Đặt ở phía dưới khay kính gồm có hai mặt, một mặt phẳng và một mặt lõm, dùng để lấy ánh sáng.

### **2.2. *Tụ quang kính***

Được lắp vào phía dưới khay kính bởi một ốc cố định, dùng để tập trung ánh sáng vào tiêu bản.

### **2.3. *Bộ phận chắn sáng***

Có hình giống như con người đặt ở phía dưới tụ quang kính có thể mở rộng hay hẹp dùng để điều hòa ánh sáng vào tiêu bản.

### **2.4. *Vật kính***

Là một hệ thống quang học rất quan trọng và phức tạp, gồm một số thấu kính, nó trực tiếp phóng đại ảnh thật của vật xem, khả năng phóng đại của vật kính phụ thuộc vào tiêu cự tức là phụ thuộc vào bán kính cong của thấu kính; thấu kính càng cong, tiêu cự càng ngắn thì khả năng phóng đại càng lớn. Vật kính khi dùng được lắp vào bàn xoay ở phía dưới ống kính. Có hai loại vật kính:

+ *Vật kính khô*: là vật kính có độ phóng đại thấp x8; x20; x40; dùng để xem tươi, xem vi khuẩn di động, xem khuẩn lạc, hay xem ký sinh trùng hoặc xem các tiêu bản tổ chức...

+ *Vật kính dầu*: là vật kính có độ phóng đại cao x 90; x100; x 120..., nó có một vòng khác màu ở đầu vật kính để phân biệt với vật kính khô.

Vật kính khô và vật kính dầu khác nhau ở chất mà ánh sáng phải đi qua tiêu bản (phiến kính) và vật kính. Ở vật kính khô chất đi qua là không khí mà chỉ số khúc xạ (chiết xuất) của không khí là  $n = 1$  rất khác với chỉ số khúc xạ của thủy tinh  $n = 1,52$ ; do đó các tia sáng khi ra khỏi tiêu bản sẽ bị phản xạ và phần ngoài của chùm ánh sáng không lọt được vào vật kính.

Ở vật kính có độ phóng đại lớn người ta dùng dầu bạch hương (huile de cèdre) có chỉ số khúc xạ  $n = 1,51$  xấp xỉ với chỉ số khúc xạ của thủy tinh  $n = 1,52$  đặt vào giữa tiêu bản và vật kính. Lúc này thủy tinh và dầu bạch hương là một môi trường gần như đồng nhất, nên ánh sáng khi đi qua thủy tinh sẽ không bị khúc xạ mà chiếu thẳng vào vật kính.