

Trường THPT Quang Trung

Tổ Sinh học

Sinh 10

BÀI 23: THỰC HÀNH: MỘT SỐ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU VI SINH VẬT

Học sinh xem trước tài liệu này để nắm thao tác cho buổi thực hành.

1. Quan sát vi sinh vật trên kính hiển vi

1.1. Phương pháp làm tiêu bản vi sinh vật

- Cách làm tiêu bản giọt ép (tiêu bản tạm thời):

- + 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 để 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.

- Cách làm tiêu bản giọt treo:

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 lõm hình tròn ở giữa.
- + Bôi vazolin quanh phần lõm của phiến kính.
- + Cho một 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.

- 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.

b. Cách nhuộm:

- + Nhỏ 1 giọt thuốc nhuộm xanh meetylen 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)

1.2. Phương pháp nhuộm vi sinh vật

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

- Có 2 cách nhuộm chính:

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

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

b. Cách nhuộm đơn:

- Đặt tiêu bản lên cầu thủy tinh (đặt nằm ngang miệng một khay nhân, hoặc thủy tinh).
- Nhỏ vào vết bôi vài giọt Fuchsin Ziel, 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 hơ nhẹ tiêu bản trên đèn cồn
- Quan sát tiêu bản ở vật kính (x40) rồi chuyển sang vật kính (x100) dùng dầu soi.

c. Nhuộm kép: Việc sử dụng đồng thời các loại thuốc nhuộm trên cùng một tiêu bản cho phép ta có thể quan sát và phân biệt cấu trúc dễ dàng hơn.

- Phương pháp nhuộm Gram :

+ Nguyên tắc: Dựa trên khả năng bắt màu của tế bào chất và màng tế bào với thuốc nhuộm tím kết tinh và iot mà hình thành nên 2 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 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.

+ 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 Bac. Subtilis bên phải phiến kính là E. 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 ba vết bôi.
 - * Nhuộm tiêu bản bằng thuốc nhuộm tím kết tinh qua giấy lọc trong một phút
 - * Nhuộm lugol trong một 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 saframin từ 10-30 giây
 - * Rửa nước
 - * Làm khô và soi tiêu bản với vật kính dầu.
- Kết quả:
 - * Vết bôi của Bac. Subtilis màu tím – gram dương
 - * Vết bôi trộn Bac. Subtilis với E. Coli có màu hồng lẫn màu tím
 - * Vết bôi của E. Coli có màu hồng – gram âm.

2. Chuẩn bị dụng cụ và môi trường nuôi cấy vi sinh vật

2.1. Chuẩn bị dụng cụ

Quá trình chuẩn bị dụng cụ nuôi cấy bao gồm các bước sau:

- Xử lý dụng cụ
- Bao gói dụng cụ
- Khử trùng dụng cụ

2.2. Công thức và cách chuẩn bị một số môi trường thông dụng

a. Môi trường nước thịt – pepton (nuôi cấy vi khuẩn)

- Công thức:

Nước chiết thịt : 1000ml

Pepton: 10g

NaCl: 5g

- Cách chế tạo nước thịt:

+ Thịt bò tươi lọc sạch gân, mỡ, đem xay hoặc thái nhỏ. Cứ 500g thịt thêm 1000 ml nước.

+ Đun nóng từ từ giữ ở 50°C trong vòng 1 giờ, sau đó đun sôi 30 phút.

+ Để nguội và lắng trong dung dịch.

+ Lọc bằng vải hay giấy lọc.

+ Phân phối môi trường vào các dụng cụ để khử trùng.

b. Môi trường khoai tây – đường cám (nuôi cấy nấm men):

Khoai tây: 300g

Cám: 100g

Đường kính: 50 g

Nước: 1000ml

- Cách chế tạo:

+ Khoai tây gọt vỏ, rửa, cân 300g, thái nhỏ hạt lựu. Thêm 500 ml nước rồi đun sôi 30 phút.

+ Lọc lấy nước trong.

+ Cân 100g cám đun sôi với 500 ml nước trong 30 phút rồi lọc trong.

+ Trộn 2 dịch lọc trên với nhau và thêm 50 g đường.

+ Bổ sung nước cho đủ 1000ml.

+ Nếu làm môi trường đặc thêm 20 g cám.

Chú ý: cũng có thể không dùng cám.

3. Phân lập một số giống vi sinh vật trong thực tế

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 kháng sinh bào tử.

- Đậy nút bông, để ủ ấm ở nhiệt độ 25- 26°C trong 48- 72 h.

- Kết quả:

Xuất hiện các lớp váng xám có nhiều vi khuẩn *Bacillus subtilis* vì cỏ khô bao giờ cũng có bào tử của vi khuẩn này.

+ Trên kính hiển vi: Tế bào *Bacillus 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 x0,6) μm .

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

- Có thể phân lập 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 *Penicilium italicum*

→ Loại mốc này thường có trên vỏ cam, chanh để lâu ngày

- Dùng que cấy đầu hình thước thợ lấy 1 ít sợi nấm cấy vào môi trường thạch nghiêng thích hợp.

3.3. Phân lập nấm men *Saccharomyces*:

- 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 để vài hôm, trong hạt Kephir.

- 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 có màu trắng sữa

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

