

BÀI 2: PHÂN LẬP VI SINH VẬT

I. MỤC ĐÍCH YÊU CẦU

- Nắm vững nguyên tắc và mục đích của việc phân lập vi sinh vật
- Thực hiện được các bước phân lập và làm thuần các chủng vi sinh vật

II. VẬT LIỆU

- Cỏ khô ngâm trong nước 2 – 3 ngày; bánh men cơm rượu; nước trái cây (thơm, nho...) để 2 ngày; cơm nguội để 4 - 5 ngày.
- Môi trường thạch đĩa (Hansen, PGA, peptone, Gause/Czapek – dox), thạch nghiêng (PGA) để phân lập
- Đèn cồn, gòn thấm, giấy vệ sinh
- Que gạt vô trùng, que cấy vòng, que cấy móc
- Các ống nghiệm chứa 9ml nước cất vô trùng
- Các bình tam giác chứa 99ml nước cất vô trùng
- Nhãn dán (hoặc bút ghi ống nghiệm)
- Pipet 1ml vô trùng
- Giá để ống nghiệm

III. KHÁI NIỆM

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, sinh hóa hoặc sử dụng vào thực tiễn một loài nào đó thì cần phải đưa chúng về dạng thuần khiết.

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.

IV. PHƯƠNG PHÁP PHÂN LẬP VI SINH VẬT 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 mọc riêng rẽ, cách biệt nhau.

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 một quần thể vi sinh vật trong thiên nhiên như đất, nước, không khí, những mẫu vật và sản phẩm khác...

- Phân lập vi sinh vật thuần khiết
- Kiểm tra độ thuần khiết.

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

Bước đầu là làm sao cho chúng mọc tách rời nhau. Để đạt được mục đích này người ta phải pha loãng mẫu cần phân lập. Nếu mẫu ở trạng thái đặc phải đưa về dạng lỏng bằng cách:

- + Nghiền mẫu
- + Hòa tan mẫu trong nước cất vô trùng
Sau đó thực hiện như mẫu ở dạng lỏng.
- + Tiếp tục pha loãng ở nồng độ cần thiết.
- + Cấy mẫu trên môi trường đặc trưng của nó

Mỗi loài vi sinh vật có tính đặc trưng trên môi trường dinh dưỡng. Lợi dụng tính chất này người ta tạo ra môi trường mà ở đó chỉ phát triển bình thường một nhóm vi sinh vật nhất định. Các vi sinh vật khác hoặc bị kiềm hãm phát triển hoàn toàn hoặc từng phần.

Ví dụ: cần phân lập nấm mốc hoặc xạ khuẩn thì phân lập trên môi trường có thêm chất kháng sinh để ức chế vi khuẩn.

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

a. Đối với vi sinh vật hiếu khí

- Trãi mẫu bằng phương pháp gạt:

+ 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 ẩm ở nhiệt độ thích hợp. Sau 1 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.

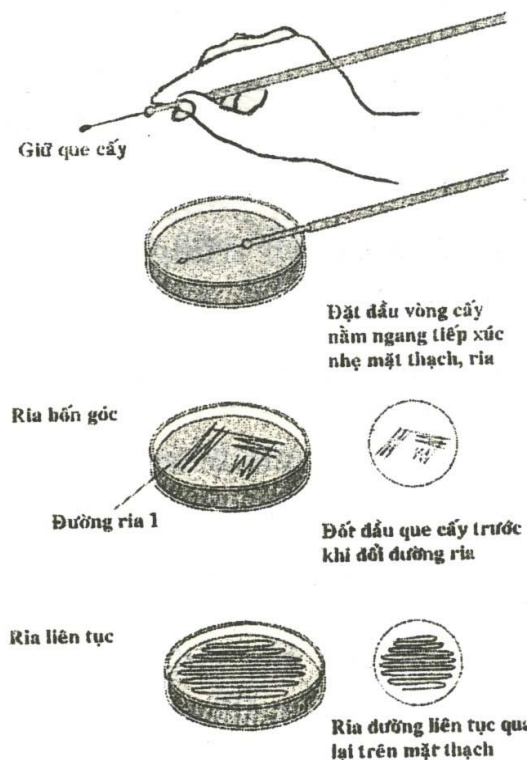
- Trãi mẫu bằng phương pháp ria:

+ Khử trùng que cấy vòng, để nguội

+ Lấy một ít dịch tế bào ria các đường trên hộp petri như hình vẽ

+ Sau mỗi đường ria, đốt que cấy và làm nguội trước khi thực hiện đường ria tiếp theo

+ Gói đĩa petri và đem ủ ở nhiệt độ thích hợp. Sau 1 thời gian nhất định, tùy giống vi sinh vật ta sẽ nhận được các khuẩn lạc riêng rẽ từ các đường rìa.



Hình 3: Phân lập bằng kỹ thuật rìa

b. Đối với 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 – 50°C.

+ Hút 0,1 ml dịch nghiên cứu cho vào ống môi trường, đập nút lại, lắc đều.

+ Rót nhanh môi trường ở ống nghiệm vào nắp dưới của đĩa petri và đập thật nhanh nắp 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.

3. Kiểm tra độ thuần khiết của giống phân lập

Độ thuần khiết của các giống đã phân lập sẽ được kiểm tra vết cấy, kiểm tra độ thuần của khuẩn lạc.

a. 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 đã tinh khiết thì giữ lại.

+ Nếu vết cấy không thuần nhất thì loại bỏ

b. Kiểm tra lại độ thuần chủng của các khuẩn lạc

+ Chọn các khuẩn lạc riêng rẽ trên môi trường thạch nghiêng.

+ Tách các khuẩn lạc này ra và hòa tan, pha loãng ở nồng độ cần thiết trong nước cất vô trùng.

+ Nhỏ một giọt dịch trên vào đĩa petri có môi trường.

+ Dùng 1 que gạt phân phối giọt dịch đều khắp mặt thạch đĩa petri thứ nhất, rồi đĩa thứ 2, thứ 3.

+ Đặt các đĩa petri vào tủ ấm với nhiệt độ và thời gian thích hợp tùy loại vi sinh vật.

+ Sau đó lấy ra quan sát các khuẩn lạc riêng rẽ. Sự thuần khiết của khuẩn lạc là biểu hiện sự thuần khiết của giống.

Ngoài ra, độ thuần khiết của các giống phân lập có thể được kiểm tra bằng kính hiển vi, được tiến hành như sau: chuẩn bị các tiêu bản cố định nhuộm màu tế bào hoặc các tiêu bản tế bào sống để kiểm tra. Các giống thuần khiết của nhiều loại vi khuẩn *Pseudomonas*, *Bacterium*, *Bacillus*.... Thường đồng nhất về hình thái, chỉ khác nhau ít nhiều về kích thước giữa các tế bào. Tế bào của nhiều vi sinh vật khác như *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Corynebacterium* rất đa dạng vì vậy rất khó xác định độ thuần khiết của chúng khi soi kính hiển vi.

V. PHÂN LẬP MỘT SỐ GIỐNG VI SINH VẬT

1. Phân lập nấm men

- Nguồn phân lập

+ Men bánh mì: men cái bánh mì (dạng paste hoặc bột) hòa tan trong nước cất vô trùng, sau đó pha loãng vài lần trước khi sử dụng.

+ Men rượu hoặc men cơm rượu: bánh men bẻ đôi, cạo lấy phần bột ở giữa, hòa trong nước cất vô trùng, pha loãng vài lần trước khi sử dụng.

+ Men trái cây: cho vào ống nghiệm sạch một ít nước mía hoặc trái cây tươi (thơm, nho...), dầm lấy nước. Bọc miệng ống nghiệm bằng giấy. Để ở nhiệt độ phòng 24 giờ, khi dịch trong ống nghiệm bắt đầu sủi bọt, pha loãng vài lần trước khi sử dụng.

- **Môi trường phân lập:** Hansen.

- Tiến hành phân lập

+ Trãi mẫu bằng phương pháp ria:

Chuẩn bị nguồn phân lập như phần trên. Dùng que cấy vòng lấy một ít dịch tế bào nấm men (tương đương một vòng đầu que cấy). Dàn đều một cạnh petri. Đốt đầu que cấy để khử trùng và bắt đầu kéo thành những đường zic-zắc khởi đầu từ cạnh có dàn tế bào nấm men. Tuần tự tiến hành ở 3 vùng kế tiếp.

Gói hộp petri, ủ ở nhiệt độ phòng trong 2 ngày.

+ Trãi mẫu bằng que gạt :

Cho lên mặt thạch petri 0,1 ml dịch tế bào nấm men. Dùng que gạt đã nhúng cồn khử trùng để dàn dịch tế bào nấm men cho đều khắp bề mặt thạch (có thể gạt tiếp trên đĩa thứ 2 và 3)

Gói petri, ủ ở nhiệt độ phòng trong 2 ngày.

- **Làm thuần**

Sau hai ngày ủ ở nhiệt độ phòng, quan sát các khuẩn lạc xuất hiện trên môi trường Hansen. Chọn khuẩn lạc có đặc tính điển hình của nấm men (khuẩn lạc to, màu đục sữa, khô, gồ cao...)

Dùng que cấy vòng tách khuẩn lạc nói trên sang petri chứa môi trường Hansen khác (nếu đường cấy trên petri đầu tiên nhiễm nhiều) hoặc ria trên ống thạch nghiêng (nếu khuẩn lạc rời và ít nhiễm)

Tiếp tục cấy nhiều lần cho đến khi các khuẩn lạc đồng nhất.

Giống được xem là thuần khi tất cả các khuẩn lạc hiện diện trên môi trường đều có chung đặc tính về hình thái. Quan sát dưới kính hiển vi không có tế bào lạ.

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

- **Nguồn phân lập:** có thể phân lập nấm mốc này trên cơm nguội, xôi làm mốc tương, bánh mì để khô vài ngày.

- **Môi trường phân lập:** PGA

- **Tiến hành phân lập:** Dùng que cấy mốc (đã khử trùng), gạt nhẹ lên hệ sợi tơ hoặc trên bào tử dính (dạng bụi phấn), chuyển sang ống nghiệm thạch nghiêng. Đánh ngược phần lưng mốc lên thành bên trong của ống nghiệm cho bào tử rơi xuống hay cắm đầu mốc xuống mặt thạch thành ba điểm theo chiều dọc mặt thạch. Ủ ở nhiệt độ phòng trong 2 ngày.

Sau hai ngày, lấy ra quan sát. Nếu trên mặt thạch chỉ có một loại tơ hoặc bào tử nấm mốc phân lập là đạt.

Còn nếu lẫn nấm mốc khác hoặc vi khuẩn, thì cần tiếp tục cấy chuyển cho đến khi thuần khiết (chỉ còn loại nấm mốc mong muốn).

Thông qua màu sắc của mốc để nhận diện.

+ Mốc có màu trắng: có thể là *Mucor* hay *Rhizopus*

- + Mốc có màu đen có thể là *Aspergillus niger*
- + Mốc có màu xanh lục có thể là *Aspergillus oryzae* hay *Penicillium*

3. Phân lập vi khuẩn *Bacillus subtilis*

- **Nguồn phân lập:** cỏ khô

Lấy cỏ khô cắt nhỏ, cho vào bình tam giác. Đổ nước sạch vào cho 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. Sau 2 – 3 ngày thì thấy xuất hiện lớp váng xám có nhiều vi khuẩn *Bacillus subtilis* vì cỏ khô bao giờ cũng có bào tử của vi khuẩn này.

- **Môi trường:** peptone - agar.
- **Tiến hành phân lập và làm thuần:** trải mẫu bằng phương pháp gạt hoặc phương pháp ria. Sau đó để trong tủ ẩm ở nhiệt độ sau 2- 3 ngày lấy ra chọn khuẩn lạc riêng rẽ để cấy chuyên.

4. Phân lập xạ khuẩn

- **Nguồn phân lập:** đất, nước, trên các cơ chất động vật, thực vật...
- **Môi trường phân lập:** môi trường Gause hoặc môi trường Czapek – dox. Trên môi trường đôi khi có cả vi khuẩn mọc cùng xạ khuẩn nên cần phân biệt:
 - + Khuẩn lạc vi khuẩn nhày, ướt
 - + Khuẩn lạc xạ khuẩn bông, xốp, có dạng sợi
- **Tiến hành:** trải mẫu bằng phương pháp gạt hoặc phương pháp ria. Sau đó để trong tủ ẩm 28°C từ 7 – 15 ngày mới lấy ra chọn khuẩn lạc riêng rẽ để cấy chuyên.

VI. THỰC HÀNH VÀ BÁO CÁO KẾT QUẢ

Thực hành phân lập và làm thuần vi khuẩn, nấm men, nấm mốc, xạ khuẩn

Câu hỏi:

1. Mục đích của việc phân lập?
2. Nêu các bước tiến hành phân lập và làm thuần các chủng vi sinh vật từ tự nhiên?
3. Quan sát và ghi nhận kết quả thu được?