

BÀI 4: ĐẾM SỐ LƯỢNG TẾ BÀO VI SINH VẬT

I. MỤC ĐÍCH YÊU CẦU

- Nắm được các bước thu và pha loãng mẫu nghiên cứu trước khi tiến hành đếm số lượng vi sinh vật.
- Nắm vững các nguyên tắc và cách tiến hành đếm số lượng tế bào vi sinh vật theo phương pháp xác định trực tiếp và gián tiếp.

II. VẬT LIỆU

- Quả bóp cao su, đèn cồn
- Đĩa petri có sẵn môi trường (hoặc chuẩn bị đĩa petri vô trùng và bình môi trường đã khử trùng) (môi trường Hansen, môi trường peptone agar)
- Giá ống nghiệm
- Pipet 1ml, 5ml, 10 ml vô trùng
- Phòng đếm hồng cầu
- Que gạt vô trùng
- Mẫu cần kiểm tra (dịch nuôi cấy vi khuẩn và nấm men sau 3 – 5 ngày, bánh men cơm rượu)
- Các ống nghiệm chứa 9 ml nước cất vô trùng
- Một số bình tam giác chứa 99 ml nước cất vô trùng
- Cối, chày, bình tam giác vô trùng

III. THU VÀ PHA LOÃNG MẪU

Muốn biết số lượng chung của các nhóm vi sinh vật cũng như số lượng riêng của mỗi nhóm thành phần trong bất kỳ một mẫu vật nào thì người ta phải đếm số lượng tế bào của chúng.

Khi xác định số lượng vi sinh vật trong đất, nước, không khí, trong dịch nuôi cấy hoặc trong các vật phẩm khác, người ta có thể dùng nhiều phương pháp. Sau đây là hai phương pháp thường dùng hơn cả đó là:

- Phương pháp xác định trực tiếp số lượng tế bào bằng phòng (buồng) đếm hồng cầu
- Phương pháp xác định gián tiếp số lượng tế bào bằng cách đếm số khuẩn lạc mọc trên môi trường thạch.

Cả hai phương pháp trên đều phải tiến hành qua hai giai đoạn sau đây:

1. Thu 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. Việc thu mẫu phải bảo đảm các yêu cầu sau đây:

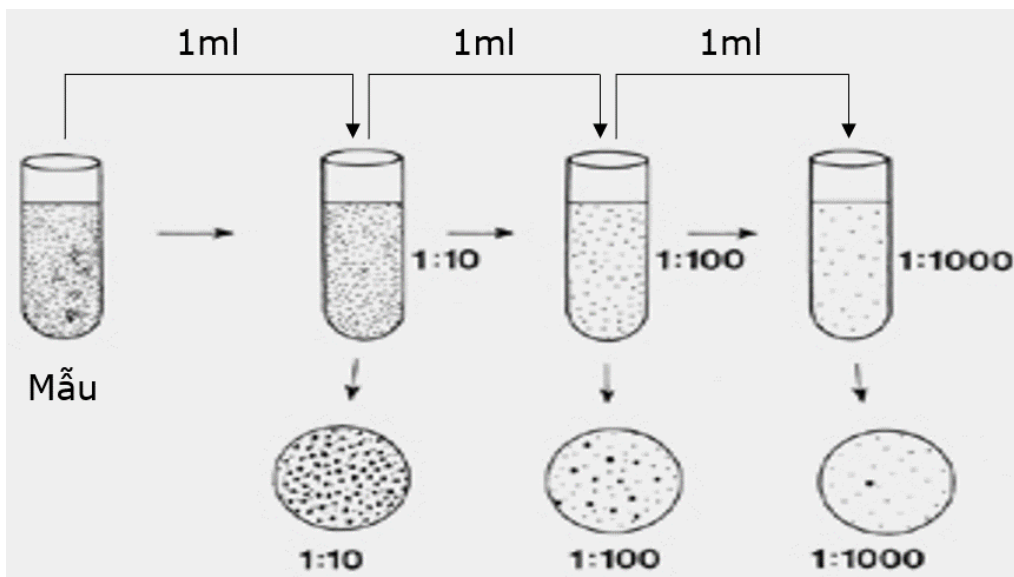
- Lấy mẫu có tính chất đại diện.
- Lượng mẫu lấy vừa phải, đủ để phân tích các đặc tính lý, hóa, sinh học.
- Dụng cụ lấy mẫu và chứa mẫu phải vô trùng.
- Lấy mẫu xong phải phân tích ngay và không được để quá 24 giờ.
- Mẫu lấy phải ghi vào nhãn ký hiệu và ghi vào sổ những đặc điểm của mẫu và nơi thu mẫu.

2. Pha loãng mẫu

Chuẩn bị một số bình tam giác chứa 99 ml nước cất vô trùng, một số ống nghiệm chứa 9 ml nước cất vô trùng và một số ống hút (1ml) vô trùng.

a. Nếu mẫu nghiên cứu ở trạng thái lỏng

- Hút 1 ml mẫu nghiên cứu cho vào ống nghiệm có 9 ml nước cất vô trùng
- Trộn đều dung dịch bằng cách hút lên rồi thổi xuống 3 – 5 lần ta được độ pha loãng 1/10 hay 10^{-1} .
- Tiếp tục hút 1 ml ở ống nghiệm 1 cho vào ống nghiệm chứa 9 ml nước cất vô trùng thứ 2.
- Trộn đều dung dịch như trên ta có độ pha loãng 1/100 hay 10^{-2}
- Tiếp tục như vậy hút từ ống 2 sang ống 3, từ ống 3 sang ống 4 ta sẽ có các độ pha loãng tương ứng 10^{-3} , 10^{-4} ...

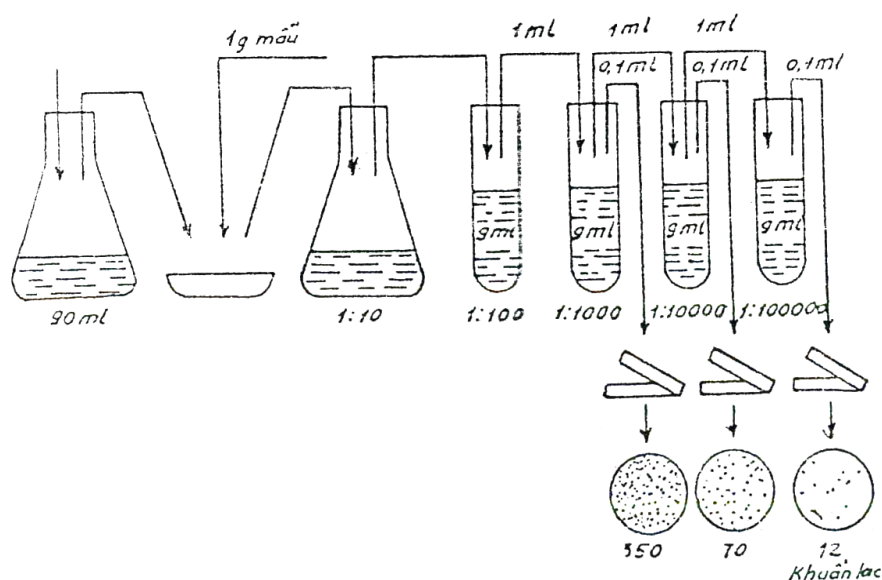


Hình 7: Sơ đồ pha loãng mẫu nghiên cứu ở trạng thái lỏng và cấy vào môi trường đặc

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

- Chuẩn bị 2 bình tam giác có dung tích 250 ml.
- + Bình 1 chứa 99 ml nước cất vô trùng
- + Bình 2 đã vô trùng và không chứa gì.
- Khử trùng cối chày sứ bằng cho một ít cồn vào và đốt lên. Sau đó để nguội
- Cân 1g 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 đều khoảng 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.

Sau khi có độ pha loãng thích hợp thì tiến hành xác định số lượng tế bào vi sinh vật.



Hình 8: Sơ đồ pha loãng mẫu nghiên cứu ở trạng thái đặc và cấy vào môi trường đặc

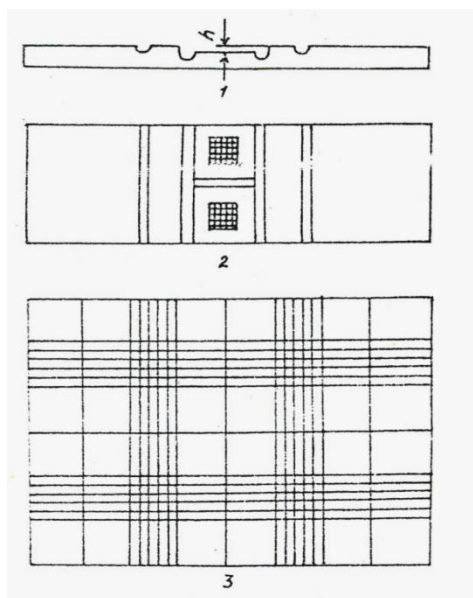
IV. XÁC ĐỊNH SỐ LƯỢNG TẾ BÀO VI SINH VẬT

1. Xác định trực tiếp số lượng tế bào vi sinh vật bằng phòng đếm hồng cầu

Phòng đếm hồng cầu dùng để đếm vi sinh vật có kích thước lớn (nấm men, bào tử nấm mốc).

Người ta thường dùng 2 loại phòng đếm hồng cầu Thomas và phòng đếm Geriep.

Nguyên tắc cấu tạo của 2 loại phòng đếm này đều giống nhau. Đó là một phiến kính dày hình chữ nhật, chia thành 3 khoảng ngang. Khoảng giữa chia thành hai khoảng nhỏ. Trên mỗi khoảng nhỏ này có kẻ một lưới đếm, gồm 400 ô vuông. Có diện tích tổng cộng là 1mm². Vì vậy diện tích một ô vuông là 1/400 mm² và chiều cao là 1/10 mm. Như vậy thể tích 1 ô nhỏ là 1/4000 mm³. Phòng đếm có là kính dày để đậy.



Hình 9: Khung đếm Geriep;

1. Nhìn nghiêng; 2. Nhìn trên xuống; 3. Khung được phóng đại

Tiến hành đếm:

- Lắc đều ống nghiệm pha loãng mẫu
- Đậy lá kính lên lưới đếm
- Dùng ống hút vô trùng lấy mẫu, cho 1 giọt vào mép lá kính, do sức mao dẫn dịch sẽ tự tràn vào mặt trên lưới đếm. Chú ý không để tạo bọt khí trong lưới đếm hoặc tràn mẫu xuống rãnh.
- Đặt phòng đếm lên bàn kính hiển vi và để yên 3 – 5 phút, tiến hành đếm tế bào trong 5 ô lớn chéo nhau, chỉ đếm các tế bào nằm trong lòng ô con và những tế bào nằm trên 2 cạnh liên tiếp cùng chiều. Đếm lần lượt từ ô con 1 đến ô con 16.

- Số lượng tế bào trong 1 ml mẫu nghiên cứu được xác định bằng công thức:

$$\text{Số tế bào/mL} = \frac{a \times 4000 \times 10^3}{b} \times 1/10^{-n}$$

- a : số tế bào trong 5 ô lớn (80 ô con)
- b : số ô con trong 5 ô lớn (16 ô x 5 = 80 ô con)
- 10³ : số chuyển mm³ thành ml (1000mm³ = 1ml)

10^{-n} : độ pha loãng mẫu

Lưu ý: số tế bào trong 5 ô lớn phải trên 200 mới đảm bảo được mức độ chính xác của phương pháp.

2. Xác định gián tiếp số lượng tế bào bằng cách đếm số khuẩn lạc mọc trên môi trường thạch.

- Nguyên tắc

+ Cây 1 thể tích xác định dịch huyền phù cần nghiên cứu lên môi trường đặc trong đĩa petri

+ Xác định số số lượng tế bào bằng cách đếm số khuẩn lạc mọc lên sau thời gian nuôi cấy vì mỗi khuẩn lạc là kết quả sự phát triển của một tế bào.

- Cách tiến hành

+ Trước tiên phải ghi độ pha loãng và ngày cấy trên nắp petri

+ Pha loãng dịch huyền phù ở các nồng độ khác nhau: 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , ...

+ Chuẩn bị môi trường trong các ống nghiệm (khoảng 20 ml) đã khử trùng rồi giữ lại ở trạng thái lỏng bằng cách đặt trong tủ ấm hoặc trong nồi cách thủy có nhiệt độ 45°C

+ Dùng pipet vô trùng hút 0,5 hoặc 1ml dịch pha loãng mẫu cho vào đĩa petri vô trùng

+ Sau đó đổ môi trường thạch từ ống nghiệm sang. Dùng tay xoay tròn đĩa cho mẫu hòa đều vào môi trường.

+ Chờ môi trường đặc rồi lật úp đĩa lại và đặt vào tủ ấm có nhiệt độ và thời gian thích hợp. Sau đó lấy ra kiểm tra kết quả.

+ Mỗi mẫu cấy 3 nồng độ liên tiếp. Mỗi nồng độ cấy 3 đĩa petri và lấy kết quả trung bình.

Việc tính số lượng khuẩn lạc mọc lên được tiến hành sau một thời gian xác định, phụ thuộc vào tốc độ sinh trưởng của loại vi sinh vật cần phát hiện trên môi trường. Kết quả các lần cấy lặp lại được tổng hợp và trích ra số khuẩn lạc trung bình mọc lên khi cấy từ độ pha loãng này.

- Cách đếm

Lấy bút mực kẻ 2 đường kính giao nhau ở đáy hộp petri. Đếm số khuẩn lạc trong từng vùng và nhớ đánh dấu những khuẩn lạc đã đếm.

Số lượng tế bào vi sinh vật trong 1g mẫu được tính như sau:

$$\text{Số tế bào / gam mẫu} = \frac{M}{V} \times H \times N$$

- M : Số khuẩn lạc trung bình trong 1 đĩa petri
H : hệ số pha loãng = $1/10^n$
V : thể tích mẫu cấy
N : Hệ số tính theo khối lượng khô tuyệt đối của mẫu

Chú ý: Độ pha loãng thích hợp nhất nếu ở nồng độ này cấy trên thạch đĩa cho số khuẩn lạc trung bình từ 50 – 150 với vi khuẩn, xạ khuẩn; 30 – 50 với nấm mốc.

V. THỰC HÀNH VÀ BÁO CÁO KẾT QUẢ

- Thực hành đếm số lượng tế bào nấm men, vi khuẩn trong dịch nuôi cấy ở các nồng độ pha loãng khác nhau.
- Thực hành kiểm tra số lượng tế bào nấm men trong mẫu bánh men cơm rượu ở 2 nồng độ 10^{-5} , 10^{-6} .

Câu hỏi:

1. Tại sao khi kiểm tra số lượng tế bào vi sinh vật trong một loại mẫu nào đó người ta phải pha loãng mẫu?
2. Kiểm tra số lượng tế bào nấm men trong dịch nuôi cấy bằng cách đếm trên buồng đếm hồng cầu, kiểm tra số tế bào nấm men trong bánh men cơm rượu theo phương pháp đếm số khuẩn lạc. Từ đó tính số tế bào nấm men trong 1 ml dịch nuôi cấy và 1g mẫu bánh men?
3. Xác định số lượng tế bào vi khuẩn ở 2 nồng độ pha loãng bằng cách đếm số khuẩn lạc trên môi trường thạch. Tính số lượng tế bào vi khuẩn từ 1 ml mẫu ban đầu?