



# Xác định sự sinh trưởng của vi sinh vật

Bởi:

Nguyễn Lâm Dũng

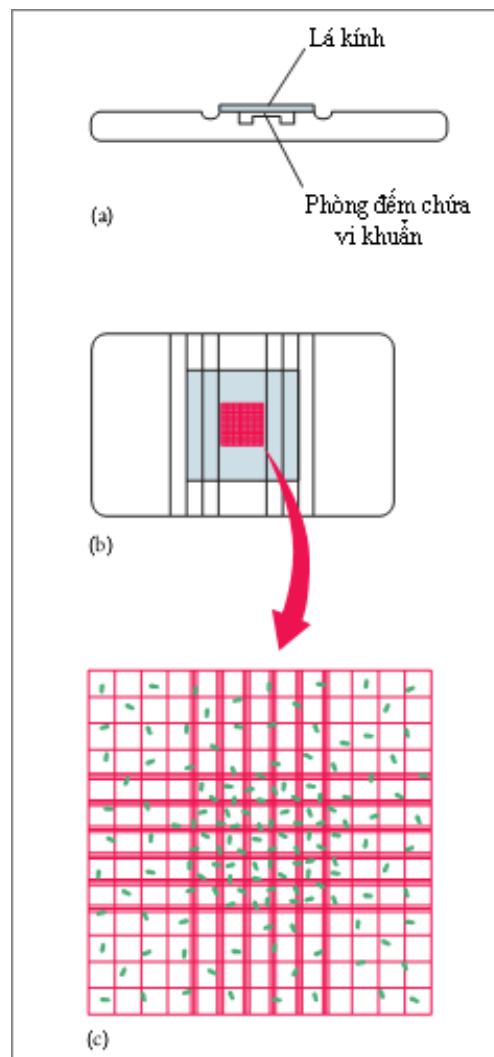
buivietha

Có nhiều cách thông qua việc xác định sự biến đổi số lượng và chất lượng vi sinh vật để hiểu được sự sinh trưởng của vi sinh vật, biết được tốc độ sinh trưởng và thời gian thế hệ. Dưới đây sẽ giới thiệu các phương pháp thường dùng nhất cùng các ưu, khuyết điểm của các phương pháp này. Không có phương pháp nào là tốt nhất, lựa chọn phương pháp nào còn phụ thuộc vào từng trường hợp cụ thể.

## Xác định số lượng tế bào

Phương pháp đơn giản nhất để xác định số lượng tế bào là đếm trực tiếp dưới kính hiển vi. Dùng các phòng đếm để đếm vừa nhanh chóng, dễ dàng, lại rẻ tiền nhất, lại có thể quan sát thấy kích cỡ và hình dáng tế bào. Thường dùng phòng đếm Petroff-Hausser để đếm tế bào động vật nguyên sinh. Dùng phòng đếm hồng cầu có thể đếm được các tế bào nhân nguyên thủy cũng như tế bào nhân thật. Với tế bào nhân nguyên thủy cần nhuộm màu hoặc là dùng kính hiển vi tương phản pha hay kính hiển vi huỳnh quang (phase-contrast or fluorescence microscope) để dễ quan sát hơn. Phòng đếm có cấu trúc để có một độ sâu nhất định lại có chia ra thành các ô nhỏ (*hình 5*). Khi đếm số lượng ta đưa dịch pha loãng vào phòng đếm, đặt lá kính (lamelle/ cover glass) lên trên, sau đó tiến hành đếm số lượng dưới kính hiển vi. Khuyết điểm của phương pháp này là không xác định được với các mẫu có số lượng vi khuẩn quá nhỏ, độ chính xác cũng không cao vì không phân biệt được giữa tế bào sống và tế bào chết.

## Xác định sự sinh trưởng của vi sinh vật



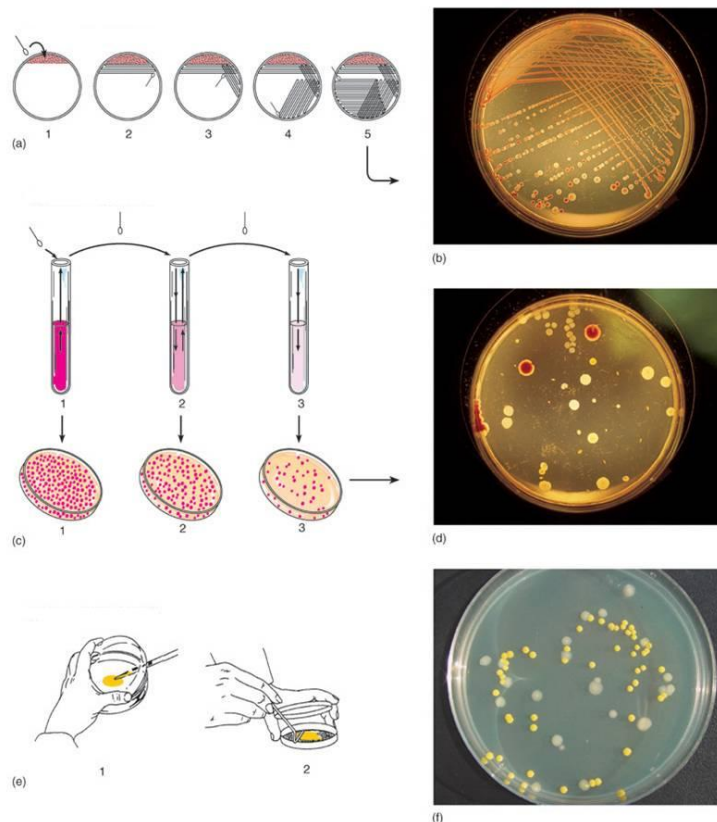
Phòng đếm Petroff-Hauser: (a)- Mặt nhìn nghiêng của phòng đếm- Phòng đếm chứa dịch huyền phù vi khuẩn là khoảng không gian bên dưới lá kính; (b)- Giữa phiến kính có phòng đếm với các ô nhỏ; (c) Ở độ phóng đại khoảng x 400-500 tiến hành đếm số lượng vi khuẩn trong các ô nhỏ. Lấy số lượng bình quân để tính ra mật độ vi khuẩn trong mẫu vật. Trong phạm vi 1mm<sup>2</sup> có 225 ô nhỏ, do đó số lượng vi khuẩn trên 1mm<sup>2</sup> là (số vi khuẩn/mm<sup>2</sup>) x 25; vì phòng đếm có chiều dày là 0,02mm do đó nồng độ vi khuẩn trong phòng đếm là: (số vi khuẩn)/m<sup>2</sup> x 25 (tổng số ô nhỏ) x 50 = số vi khuẩn/mm<sup>3</sup>. Vì 1 cm<sup>3</sup> = 1 mm<sup>3</sup> x 10<sup>3</sup> cho nên giả thử số lượng vi khuẩn bình quân trong mỗi ô nhỏ là 28 thì trong 1 cm<sup>3</sup> có nồng độ vi khuẩn là 28 x 25 x 50 x 10<sup>3</sup> = 3,5 x 10<sup>7</sup> vi khuẩn. Nhân với độ pha loãng ban đầu (nếu có) sẽ biết được nồng độ vi khuẩn trong mẫu kiểm tra.

Với động vật nguyên sinh, vi tảo và nấm men có thể dùng máy đếm điện tử như loại máy Coulter Counter để xác định số lượng. Nguyên lý là hai bên mỗi lỗ nhỏ có điện cực và nối điện. Khi tế bào trong dịch huyền phù đi qua lỗ nhỏ thì cứ mỗi tế bào đi qua thì điện trở lại tăng lên (hoặc tính dẫn điện giảm xuống) và sinh ra một tín hiệu điện, máy đếm sẽ tự động ghi số. Kết quả xác định của loại máy này khá chính xác, có thể ứng dụng rộng rãi để xác định số lượng hồng cầu và bạch cầu, nhưng phương pháp này không thích hợp xác định số lượng vi khuẩn vì dễ bị can thiệp bởi các hạt nhỏ và các vật chất dạng sợi trong mẫu vật.

## Xác định sự sinh trưởng của vi sinh vật

Cả hai phương pháp nói trên đều không phân biệt được tế bào sống và tế bào chết. Để xác định số lượng tế bào sống người ta thường dùng phương pháp cấy dịch pha loãng lên bề mặt môi trường thạch đĩa. Sau khi nuôi cấy mỗi vi khuẩn sẽ tạo thành 1 khuẩn lạc. Ví dụ ở độ pha loãng  $1 \times 10^{-6}$  đếm được 150 khuẩn lạc thì có nghĩa là mật độ vi khuẩn trong mẫu là  $1,5 \times 10^8$ .

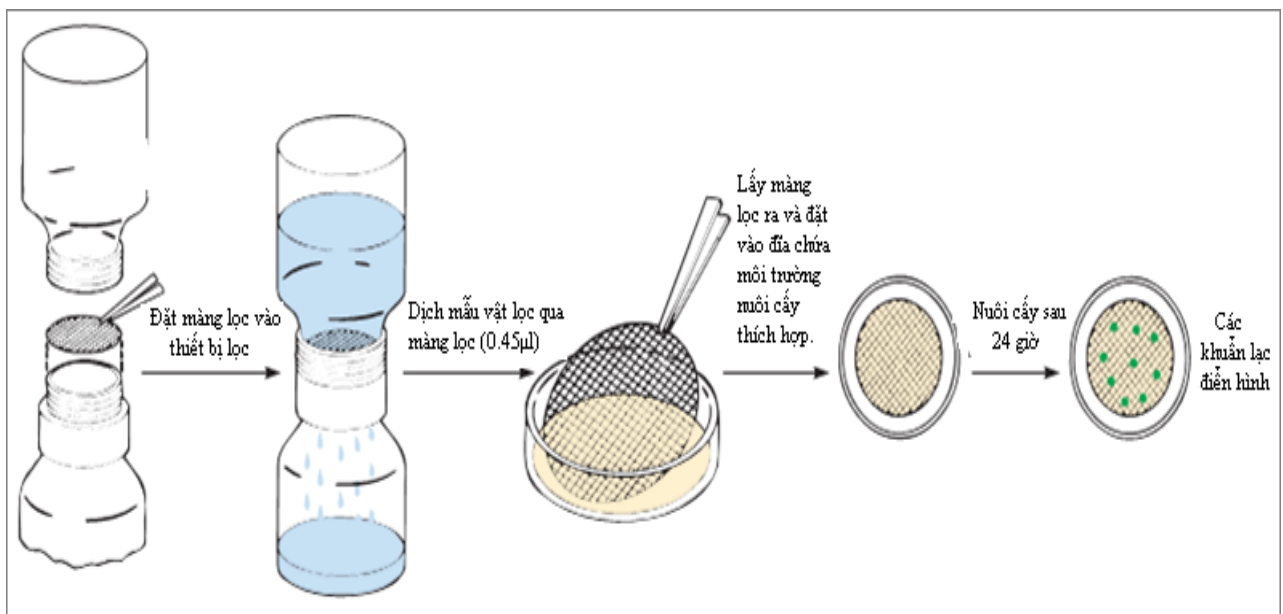
Dùng dụng cụ đếm khuẩn lạc càng thêm thuận tiện. Phương pháp này cho biết số lượng các tế bào sống của vi sinh vật. Phương pháp này đơn giản, nhạy cảm và thích hợp ứng dụng rộng rãi để xác định số lượng vi sinh vật sống khi phân tích các mẫu thực phẩm, nước, đất... Tuy nhiên kết quả cũng chịu ảnh hưởng của một số nhân tố. Nếu vi khuẩn dính thành khối không tách rời nhau ra thì kết quả thu được là thấp hơn thực tế., vì mỗi khuẩn lạc không phát triển từ một tế bào riêng rẽ. Vì vậy kết quả thu được từ phương pháp này được coi là số đơn vị hình thành khuẩn lạc (CFU-colony forming unit). CFU không hoàn toàn phù hợp với số tế bào sống trong mẫu vật. Trong quá trình sử dụng phương pháp này nên sử dụng độ pha loãng nào cho số khuẩn lạc xuất hiện trên đĩa chỉ nằm trong phạm vi khoảng 30-300 mà thôi. Đương nhiên môi trường dinh dưỡng không thể đáp ứng chung cho mọi loại vi sinh vật, do đó kết quả thu được bao giờ cũng thấp hơn thực tế. Khi trộn thạch với dịch pha loãng thì thạch đã đủ nguội để không làm chết vi khuẩn hay làm thương tổn với một số loại mẫn cảm với nhiệt độ. Việc cấy cấy dịch pha loãng trên bề mặt rồi dàn đều bằng que gạt thủy tinh thường cho kết quả cao hơn về số lượng vi sinh vật so với phương pháp trộn với môi trường thạch chưa đông.



## Xác định sự sinh trưởng của vi sinh vật

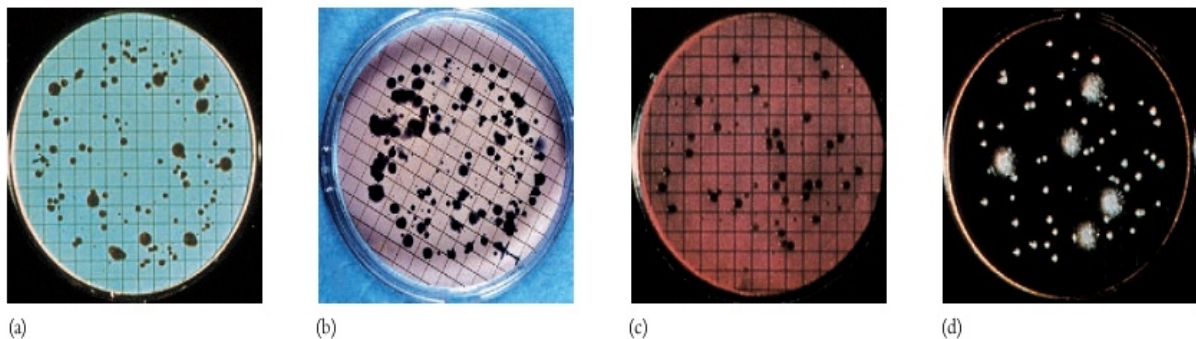
*Tách khuẩn lạc và phương pháp kiểm tra số lượng vi sinh vật thông qua đếm khuẩn lạc mọc trên môi trường thạch đĩa. (a)(b)- Cách rìa cấy để tách khuẩn lạc riêng rẽ (không dùng để đếm số lượng). (c)(d)- Cách pha loãng rồi trộn với môi trường thạch chưa đông. (e)(f)- Cách dàn dịch pha loãng bằng que gạt trên mặt thạch (cho số lượng khuẩn lạc nhiều hơn). Theo sách của K.P.Talaro, 2005.*

Để xác định số lượng vi sinh vật còn có thể nuôi cấy giấy lọc đã lọc dịch pha loãng mẫu vật. Phương pháp này gọi là phương pháp màng lọc (membrane filter). Dùng một thiết bị lọc đặc biệt đặt vừa một giấy lọc hình tròn có các lỗ nhỏ hơn kích thước vi khuẩn và các vi sinh vật khác. Sau khi lọc đặt giấy lọc lên môi trường thạch thích hợp hoặc thấm ướt màng lọc bằng dịch môi trường thích hợp rồi để nuôi cấy 24 giờ. Đếm số khuẩn lạc mọc trên giấy lọc để tính ra mật độ vi khuẩn sống có mặt trong mẫu vật (*hình 7*)



*Phương pháp lọc màng để xác định số lượng vi sinh vật*

Phương pháp này thích hợp để sử dụng phân tích vi sinh vật trong nước. Có thể dùng các môi trường khác nhau thích hợp với các nhóm vi sinh vật khác nhau (*hình 8*)



## Xác định sự sinh trưởng của vi sinh vật

*Các loại khuẩn lạc mọc trên màng lọc. Theo sách của Prescott, Harley và Klein (2005). (a)- Tổng số vi khuẩn mọc trên môi trường tiêu chuẩn, Dùng chỉ thị màu để nhuộm đồ khuẩn lạc cho dễ đếm; (b)- Dùng môi trường thích hợp để kiểm tra nhóm vi khuẩn coliform có nguồn gốc từ phân (khuẩn lạc bắt màu xanh); (c)- Dùng môi trường thạch m-Endo để xác định vi khuẩn E.coli và các Coliform khác- khuẩn lạc có màu lục; (d)- Nấm sợi và nấm men mọc trên môi trường Thạch - Mạch nha.*

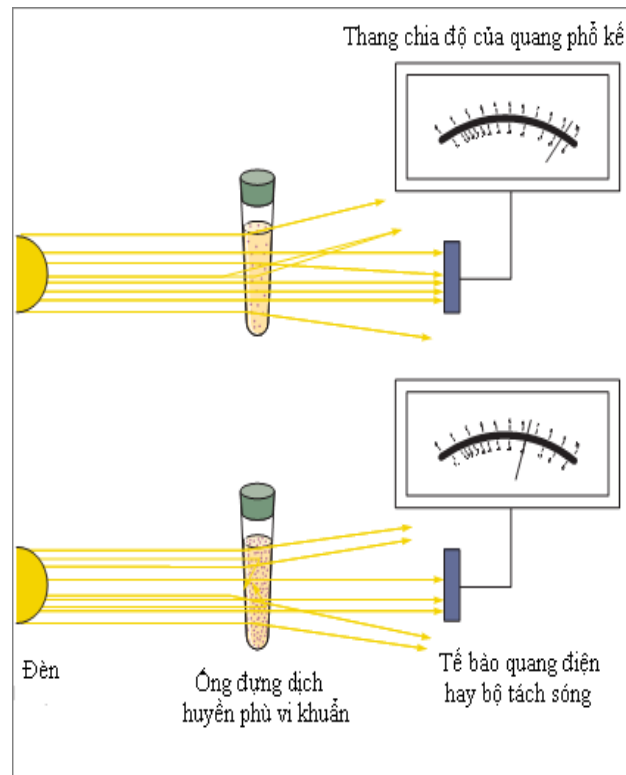
Phương pháp màng lọc còn dùng để đếm trực tiếp vi khuẩn. Dịch mẫu vật được lọc qua một màng polyCarbonate màu đen. Vi khuẩn trên màng lọc được nhuộm màu huỳnh quang bằng thuốc nhuộm acridine da cam hoặc DAPI (diamidino-2-phenylindole). Quan sát dưới kính hiển vi huỳnh quang có thể thấy các tế bào vi sinh vật hiện lên màu da cam hay màu lục trên một nền đen. Hiện đã có những kit thương mại cho phép phân biệt tế bào sống và tế bào chết khi kiểm tra.

## Xác định khối lượng tế bào

Sự sinh trưởng của vi sinh vật không chỉ biểu hiện ở số lượng tế bào mà còn ở cả sự tăng trưởng của tổng khối lượng tế bào. Phương pháp trực tiếp nhất là xác định trọng lượng khô của tế bào. Trước hết cần ly tâm để thu nhận sinh khối tế bào. Sau đó rửa tế bào rồi làm khô trong lò sấy rồi cân trọng lượng khô. Phương pháp này thích hợp để xác định sự sinh trưởng của nấm. Phương pháp này tốn thời gian và không thật miễn cảm. Đối với vi khuẩn vì trọng lượng từng cá thể là rất nhỏ, thậm chí phải ly tâm tới vài trăm ml mới đủ số lượng để xác định trọng lượng sinh khối khô.

Phương pháp nhanh hơn, miễn cảm hơn là dùng phương pháp đo độ đục nhờ tán xạ ánh sáng. Mức độ tán xạ ánh sáng tỷ lệ thuận với nồng độ tế bào. Lúc nồng độ vi khuẩn đạt đến  $10^7$  tế bào/ml thì dịch nuôi cấy sẽ vẫn đục, nồng độ càng tăng thì độ đục cũng tăng theo và làm cản trở ánh sáng đi qua dịch nuôi. Có thể đo độ tán xạ ánh sáng bằng quang phổ kế (spectrophotometer). Ở một mức độ hấp thụ ánh sáng thấp, giữa nồng độ tế bào và giá trị hấp thụ ánh sáng có quan hệ tuyến tính (*hình 9*). Chỉ cần nồng độ vi sinh vật đạt tới nồng độ có thể đo được là đều có thể dùng phương pháp đo độ đục trên quang phổ kế để xác định sự sinh trưởng của vi sinh vật. Nếu hàm lượng một số vật chất trong mỗi tế bào là giống nhau thì tổng lượng chất đó trong tế bào có tương quan trực tiếp với tổng sinh khối vi sinh vật. Chẳng hạn, thu tế bào trong một thể tích nhất định của dịch nuôi cấy, rửa sạch đi rồi đo tổng lượng protein hay tổng lượng nitrogen, có thể thấy sự tăng quần thể vi sinh vật là phù hợp với sự tăng tổng lượng protein (hay N). Cũng tương tự như vậy, việc xác định tổng lượng chlorophyll có thể dùng để đo sinh khối tảo; đo hàm lượng ATP có thể biết được sinh khối của các vi sinh vật sống.

## Xác định sự sinh trưởng của vi sinh vật



Đo số lượng vi sinh vật bằng phương pháp đo độ đục. Thông qua việc đo độ hấp thụ ánh sáng có thể xác định được sinh khối vi sinh vật. Khi số lượng tế bào tăng lên sẽ dẫn đến việc tăng độ đục, mức độ tán xạ ánh sáng nhiều hơn và quang phổ kế sẽ đo được mức độ tăng lên của trị số hấp thụ ánh sáng. Trên quang phổ kế có hai thang chia độ: phía dưới là trị số hấp thụ ánh sáng, phía trên là mức độ thấu quang. Khi trị số hấp thụ ánh sáng tăng lên thì mức độ thấu quang hạ xuống.