

Chương 9. Phương pháp nuôi cấy vi khuẩn

Mục lục

Chương 9. Phương pháp nuôi cấy vi khuẩn	1
9.1. Giới thiệu.....	2
9.2. Phương pháp nuôi cấy.....	2
9.2.1. Nuôi cấy trải.....	2
9.2.2. Nuôi cấy thả.....	3
9.2.3. Nuôi cấy thuần trên đĩa.....	3
9.2.4. Nuôi cấy trên thạch nghiêng.....	3
9.2.5. Nuôi cấy đậm sâu.....	4
9.2.6. Nuôi cấy trong môi trường lỏng.....	4
9.2.7. Nuôi cấy kỵ khí.....	4
9.3. Thu thập mẫu thử	4
9.4. Môi trường nuôi cấy.....	5
9.5. Phương pháp nuôi cấy kỵ khí.....	6
9.5.1. Nuôi cấy trong bình kỵ khí McIntosh–Fildes	6
9.5.2. Khoang nuôi cấy kỵ khí có các lỗ thao tác (Anaerobic glove box).....	7
9.5.3. Sử dụng anoxomat	7

9.1. Giới thiệu

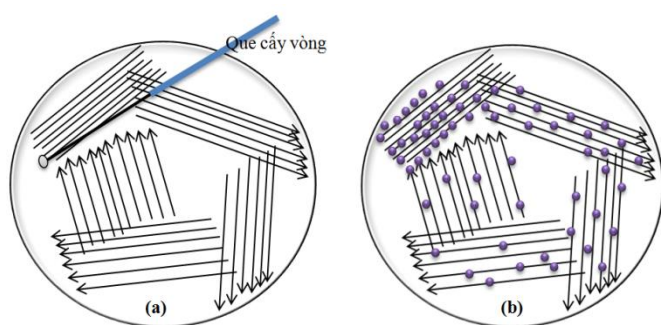
Phương pháp nuôi cấy vi sinh vật đóng vai trò rất quan trọng trong phòng thí nghiệm. Nhiều phương pháp nuôi cấy được tiến hành để phân lập và nuôi cấy thuần vi khuẩn. Chúng cũng được dùng để chứng minh các đặc điểm sinh hoá, tính kháng nguyên và những đặc điểm về kiểu hình cũng như kiểu gen của vi khuẩn cần phân lập. Phương pháp nuôi cấy vi khuẩn cũng được sử dụng để chứng minh tính nhạy cảm của vi khuẩn đối với kháng sinh, thực khuẩn thể, Nuôi cấy vi khuẩn cũng được sử dụng để điều chế kháng nguyên cho nhiều mục đích sử dụng và cũng được sử dụng để duy trì các chủng mẹ dùng cho nhiều mục đích khác nhau.

9.2. Phương pháp nuôi cấy

Nhiều phương pháp được sử dụng để nuôi cấy vi khuẩn gồm (a) nuôi cấy trải, (b) nuôi cấy thảm (lawn culture), (c) nuôi cấy thuần trên đĩa, (d) nuôi cấy trên thạch nghiêng (stroke culture), (e) nuôi cấy đâm sâu, (f) nuôi cấy trong môi trường lỏng và (g) nuôi cấy kỵ khí.

9.2.1. Nuôi cấy trải

Nuôi cấy trải là phương pháp thường được sử dụng nhất để thu nhận các khuẩn lạc vi khuẩn rời rạc. Theo đó sử dụng que cấy vòng platinum hoặc plastic vô trùng để cấy trải vi khuẩn lên bề mặt đĩa môi trường rắn, vòng cấy thường có đường kính từ 2 - 4 mm. Trong phương pháp này vòng cấy đầy khuẩn được đặt gần phần rìa (ngoại biên) của đĩa có chứa môi trường rắn. Sau đó cấy trải ra khoảng một phần tư đĩa với thành các đường



song song gần nhau. Sau đó tiếp tục cấy như hướng dẫn tại Hình minh 9.1 để thu các khuẩn lạc riêng lẻ sau khi ủ.

Hình 9.1. Sơ đồ minh họa nuôi cấy trải (a). Mô tả cách cấy khuẩn trên đĩa, mũi tên là hướng cấy, (b). Minh

họa khuẩn lạc vi khuẩn mọc lên sau khi ủ.

Các đĩa sau cấy được ủ ở 37°C qua đêm để thu nhận các khuẩn lạc vi khuẩn rời rạc. Tùy thuộc vào điều kiện sinh lý của vi khuẩn mà môi trường sử dụng và điều kiện ủ

có thể khác nhau.

9.2.2. Nuôi cấy thảm

Nuôi cấy trải thảm cung cấp lớp vi khuẩn tăng trưởng đồng nhất trên môi trường rắn. Phương pháp này được tiến hành bằng cách làm ngập bề mặt đĩa môi trường rắn bằng dịch chủng hoặc dịch khuẩn huyền phù bằng cách sử dụng pipet và cuối cùng ủ qua đêm ở 37°C. Có thể lựa chọn cách khác đó là sử dụng swab vô trùng nhúng vào dịch khuẩn sau đó cấy khuẩn lên đĩa môi trường và ủ qua đêm để vi khuẩn hình thành khuẩn lạc.

Nuôi cấy trải thảm được sử dụng để: (a) thử nghiệm tính nhạy cảm kháng sinh bằng phương pháp sử dụng đĩa có chứa kháng sinh khuếch tán; (b) phân kiểu thực khuẩn thể và (c) chuẩn bị một lượng lớn vi khuẩn cần thiết để điều chế kháng nguyên vi khuẩn hay điều chế vaccine.

9.2.3. Nuôi cấy thuần trên đĩa

Nuôi cấy thuần trên đĩa được sử dụng để chứng minh số lượng vi khuẩn thấy được trong dịch lỏng như nước, mẫu thực phẩm đã đồng nhất và pha loãng ở nồng độ thích hợp, nước tiểu, dịch cơ thể Phương pháp này được sử dụng để định lượng vi khuẩn trong nuôi cấy nước tiểu và cũng để ước lượng số lượng vi khuẩn trong dịch huyền phù. Phương pháp nuôi cấy thuần được tiến hành trong các đĩa petri. Chuẩn bị môi trường thạch nóng chảy, sau đó hạ nhiệt độ trong bể điều ở 45°C. Việc nuôi cấy được tiến hành ở dãy nồng độ pha loãng. Sau đó 1 mL của mỗi nồng độ pha loãng được thêm vào vào đĩa Petri vô trùng sau đó đổ khoảng 12 - 15 ml môi trường thạch ở 45°C, trộn đều bằng cách xoay tròn 5 lần theo vòng cùng chiều và 5 vòng ngược chiều kim đồng hồ. Sau đó để đông tự nhiên ủ các đĩa đã cấy khuẩn qua đêm ở 37°C, khuẩn lạc hình thành phân bố khắp nơi trong môi trường, sử dụng máy đếm khuẩn lạc để đếm hoặc đếm khuẩn lạc dưới ánh sáng bằng cách làm dấu với viết lông.

9.2.4. Nuôi cấy trên thạch nghiêng

Phương pháp nuôi cấy trên môi trường thạch nghiêng dùng cho vi khuẩn thuần tăng trưởng trên môi trường thạch nghiêng được chứa trong ống nghiệm. Vi khuẩn sau khi tăng trưởng được sử dụng để tiến hành thử nghiệm ngưng kết trên lam kính hay các

thử nghiệm sinh hóa khác.

9.2.5. Nuôi cấy đậm sâu

Nuôi cấy đậm sâu được chuẩn bị bằng cách đậm sâu vào môi trường trong ống nghiệm bằng một que cấy thẳng, sau đó ủ ở 37°C. Nuôi cấy đậm sâu thường được sử dụng để: (a) lưu giữ chủng bố mẹ; (b) chứng minh nhu cầu oxygen của vi khuẩn, (c) chứng minh sự hoá lỏng gelatin của vi khuẩn và (d) kiểm tra tính di động của vi sinh vật

9.2.6. Nuôi cấy trong môi trường lỏng

Nuôi cấy trong môi trường lỏng được tiến hành trong ống nghiệm, bình erlen, hay chai. Sử dụng que cấy vòng hoặc pipet hay syringe để cấy vi khuẩn vào sau đó ủ ở 37°C, sau đó cấy thuần lại trên môi trường rắn để xác định lần cuối.

Nuôi cấy trong môi trường lỏng được sử dụng để: (a) nuôi cấy máu và kiểm tra sự vô trùng; (b) nuôi cấy các mẫu thử có chứa kháng sinh và các chất kháng khuẩn khác, thông thường các mẫu thử này không hiệu quả khi nuôi cấy pha loãng trong môi trường mà không qua giai đoạn tăng sinh và (c) tăng sinh tạo ra một lượng lớn vi khuẩn hay tăng sinh để tăng độ nhạy trong phương pháp phát hiện định tính vi sinh vật thường được sử dụng trong phân tích vi sinh thực phẩm.

Điểm bất lợi chính của phương pháp nuôi cấy trong môi trường lỏng là không cung cấp chủng thuần và sự tăng trưởng của vi khuẩn không biểu hiện các đặc tính đặc biệt.

9.2.7. Nuôi cấy kỵ khí

Vi khuẩn kỵ khí bắt buộc là vi khuẩn chỉ có thể sống trong điều kiện không có oxygen. Các vi khuẩn kỵ khí này bị tiêu diệt khi chúng bị phơi nhiễm ra không khí trong thời gian khoảng 10 phút. Một số vi khuẩn kỵ khí chịu được một lượng nhỏ oxygen còn gọi là nhóm vi hiếu khí, ví dụ vi khuẩn *Campylobacter spp.* Vi khuẩn kỵ khí tùy nghi có khả năng tăng trưởng trong điều kiện có hoặc không có oxygen.

Nuôi cấy vi khuẩn kỵ khí là phương pháp được sử dụng để vi sinh vật kỵ khí từ mẫu thử có thể tăng trưởng được. Nuôi cấy vi khuẩn kỵ khí cần thiết để xác định vi khuẩn gây bệnh có trong mẫu thử, để từ đó đưa ra hướng xử lý hoặc điều trị hợp lý.

9.3. Thu thập mẫu thử

Mẫu thử thường được sử dụng để nuôi cấy kỵ khí gồm: (a) mẫu thực phẩm nhất là thực phẩm đóng hộp, thực phẩm hàn kín miệng, hút chân không hay biến đổi áp suất bên trong bao gói (MAP); (b) mẫu máu, mật, tuỷ xương, dịch não tuỷ, mẫu hút trực tiếp từ phổi và mẫu sinh thiết mô dịch hút ra từ vị trí vô trùng như khớp nối chẳng hạn; (c) mẫu mủ từ áp se răng, vết bỏng, áp se bụng hay áp se chậu hông và (d) mẫu từ dao, súng bắn chuyên dùng trong y tế hay vết thương phẫu thuật.

Mẫu thu thập không được để nhiễm chéo và cần được bảo vệ để tránh phơi nhiễm với oxygen trong quá trình thu thập. Mẫu cần phải thu nhận từ vị trí phù hợp không nhiễm vi khuẩn từ vùng da lân cận, màng nhầy hay mô.

Mẫu áp se hay dịch thường được thu thập bằng cách sử dụng kim tiêm vô trùng và sau đó cho vào vật chứa đóng nắp chặt để ngăn chặn không khí xâm nhập vào.

Mẫu mô cần được đặt vào trong túi đã khử khí và sau đó hàn kín miệng, hoặc vào trong vật chứa đã được đuổi khí có nắp vặn để có thể làm giảm oxygen tự do trong môi trường nuôi cấy và đóng nắp chặt. Khi cần thiết tiến hành cấy trải nhanh trên đĩa để phân lập vi khuẩn.

Khi nuôi cấy kỵ khí cần lưu ý: (i) không nên sử dụng kỹ thuật phết mẫu (swab) để thu thập mẫu bệnh phẩm cho nuôi cấy kỵ khí vì các sợi bông gòn có thể làm ảnh hưởng đến sự kỵ khí; (ii) mẫu đờm, phết trực tràng, phết mũi hoặc họng, phết niệu đạo,... là một số mẫu bệnh phẩm không phù hợp để xử lý nuôi cấy kỵ khí.

9.4. Môi trường nuôi cấy

Môi trường sử dụng phổ biến để nuôi cấy kỵ khí gồm môi trường lỏng RCM (Robertson cooked meat), môi trường lỏng thioglycollate, môi trường Willis và Hobbs, môi trường thạch máu có kháng sinh neomycin. Môi trường lỏng RCM là môi trường phổ biến được sử dụng trong nuôi cấy các chủng kỵ khí. Môi trường này gồm dịch dinh dưỡng và các miếng thịt tim bò, luộc, cắt, không có chất béo cùng với đó là lớp paraffin lỏng vô trùng phủ lên trên. Các acid béo không bão hòa và thậm chí là glutathione và cysteine hiện diện trong chiết xuất thịt, sử dụng oxygen cho quá trình tự oxi hóa (autooxidation).

Trước khi cấy khuẩn, RCM thường được đun ở 80°C trong bể điều nhiệt để đuổi

oxygen ra và làm cho môi trường không còn khí này nữa. Sau đó để nguội, cấy khuẩn và ủ để vi khuẩn tăng trưởng trong điều kiện kỵ khí nghiêm ngặt. Môi trường này cũng dùng để chỉ thị cho các hoạt động phân giải của nấm men hay hoạt tính phân giải protein khi thịt trong môi trường trở thành màu đỏ hoặc đen.

9.5. Phương pháp nuôi cấy kỵ khí

Nuôi cấy kỵ khí được tiến hành trong môi trường không có oxygen, sau đó ủ các đĩa môi trường có cấy khuẩn ở 35°C ít nhất trong 48 giờ trước khi kiểm tra khuẩn lạc tăng trưởng. Phương pháp nuôi cấy kỵ khí được tiến hành như sau:

9.5.1. Nuôi cấy trong bình kỵ khí McIntosh–Fildes

Phương pháp này được sử dụng rộng rãi và phương pháp phụ thuộc vào đời sống kỵ khí. Bình kỵ khí McIntosh – Fildes gồm bình thủy tinh hoặc kim loại có nắp, có ngàm vặn chặt không khí. Trên nắp có một ống vào và một ống ra. Ống ra nối với bơm chân không để hút hết không khí ra khỏi bình. Ống vào được nối với nguồn cấp hydrogen. Nắp có hai cổng điện có thể nối với nguồn điện. Mặt bên dưới của nắp có chất xúc tác (ví dụ như viên alumina được phủ palladium). Chất xúc tác này kết hợp hydrogen với oxygen còn sót lại trong không khí. Đây là phương pháp đảm bảo cho đời sống kỵ khí hoàn toàn.



Hình 9.2. Minh họa về bình nuôi cấy kỵ khí theo phương pháp McIntosh – Fildes.

Sau khi cấy khuẩn, các đĩa môi trường đặc vào trong bình kỵ khí, có nắp được siết chặt. Đời sống kỵ khí trong bình được tiến hành bằng cách hút không khí ra khỏi bình nhờ ống ra nối với bơm chân không. Sau đó ống ra được khóa lại, bình có các đĩa môi trường cấy khuẩn được hàn kín miệng, khí hydrogen được cung cấp qua ống vào để làm giảm áp suất khí quyển trở thành khí quyển bình thường, được giám sát bằng thiết bị đo chân không. Sau đó cổng điện được bật lên để gia nhiệt chất xúc tác, khi đó chất này xúc tác cho phản ứng kết hợp giữa hydrogen và oxygen còn sót lại để đảm bảo cho đời sống kỵ khí diễn ra hoàn toàn trong bình.

Xanh methylene khử được sử dụng làm chất chỉ thị cho đời sống kỵ khí trong

bình. Nếu đời sống kỵ khí diễn ra hoàn toàn chất chỉ thị này trở nên không màu. Ngược lại nếu đời sống kỵ khí không diễn ra hoàn toàn thì chỉ thị này trở nên có màu xanh da trời do phơi nhiễm với oxygen.

Gói tạo khí trong bình là phương pháp đơn giản và hiệu quả để tạo ra khí hydrogen phục vụ đời sống kỵ khí. Hệ thống này không đòi hỏi sự tỉ mỉ, công kênh về cách thức đuổi và nạp khí sau khi hút chân không. Carbon dioxide (CO_2) cũng được tạo ra để đáp ứng cho một số vi sinh vật kỵ khí tăng trưởng. Khi thêm nước vào gói kỵ khí sẽ hoạt hoá thành phản hóa học có trong gói khí này dẫn đến sản sinh ra hydrogen và carbon dioxide. Hydrogen kết hợp với oxygen trong không khí khi có mặt của chất xúc tác và nhờ đó duy trì đời sống kỵ khí. Trong phương pháp này, các đĩa đã cấy khuẩn được đặt vào trong bình cùng với gói tạo khí có thêm nước.

Đây là phương pháp lựa chọn để chuẩn bị bình kỵ khí. Các gói tạo khí có sẵn trên thị trường và được sử dụng một lần, gói tạo khí chứa chất hóa học tạo hydrogen và carbon dioxide khi có thêm nước.

9.5.2. Khoang nuôi cấy kỵ khí có các lỗ thao tác (Anaerobic glove box)

Là sự cải tiến khác được phát triển để phân lập vi khuẩn kỵ khí. Đây là khoang chứa lớn được cấu tạo bằng nhựa vinyl trong kèm theo các lỗ có găng tay thao tác, khoang chứa hỗn hợp gồm 80% nitrogen, 10% hydrogen và 10% carbon dioxide. Khóa tại một đầu cuối của khoang này được cố định bằng hai cửa sập, một dẫn ra bên ngoài và cái còn lại dẫn vào bên trong khoang. Mẫu được đặt bên trong khóa, cửa sập ngoài được đóng lại và không khí trong buồng khóa được đuổi ra ngoài và được thay thế bằng hỗn hợp khí. Sau đó cửa sập trong được mở ra để đưa mẫu vào khoang.

9.5.3. Sử dụng anoxomat

Đây là hệ thống hoàn toàn tự động nhằm đuổi khí ra khỏi bình và lấp đầy bình bằng hỗn hợp khí kỵ khí. Suốt quá trình này, nồng độ oxygen trong không khí bị loãng ra. Đối với khí quyển kỵ khí, quy trình này được lặp lại ba lần, sau đó nồng độ oxygen được pha loãng đến 0,16%.

Khi sử dụng một lượng chất xúc tác nhỏ sẽ loại bỏ vài % hàm lượng oxygen thì anoxomat có khả năng sản sinh ra điều kiện vi hiếu khí. Phương pháp này đang được sử

dụng để xử lý các mẫu vật dùng để phân lập vi khuẩn kỵ khí.