

BỘ NÔNG NGHIỆP
TRƯỜNG ĐẠI HỌC NÔNG NGHIỆP I

NGUYỄN KHẮC TUẤN

GIÀO TRÌNH THỰC TẬP
VI SINH VẬT

(Dùng cho học sinh ngành chăn nuôi)

HÀ NỘI—1982

- LỜI NÓI ĐẦU

Để đáp ứng nhu cầu ngày càng cao về công tác giảng dạy và học tập của cán bộ và học sinh thuộc chuyên ngành chăn nuôi thú y ở các trường đại học, cao đẳng, chúng tôi biên soạn cuốn giáo trình này. Trên cơ sở nội dung của cuốn giáo trình thực tập về sinh vật chăn nuôi đã đem in lần trước (năm 1969 và năm 1972) chúng tôi đã bổ xung, sửa chữa theo chương trình được thông qua trong hội nghị các cán bộ giảng dạy môn này do vụ tuyên giáo chủ trì năm 1974.

Để giúp các cán bộ chuẩn bị tốt cho một bài thực tập và giúp các học sinh nắm được nội dung chính của một bài thực tập chúng tôi đã cố gắng đưa vào nhiều hình vẽ minh hoạ nội dung, đưa thêm trong giáo trình phần nội dung thực tập và viết tường trình nội dung đã thực tập, phần chuẩn bị dụng cụ và nguyên liệu cần chuẩn bị v.v...

Tuy rằng chúng tôi đã có nhiều cố gắng nhằm làm cho cuốn sách có nội dung sát thực và đầy đủ nhưng với trình độ có hạn nên không thể tránh khỏi có nhiều thiếu sót. Rất mong được sự góp ý của các bạn đồng nghiệp.

Hà Nội ngày 20 tháng 9 năm 1979

TÁC GIẢ

BÀI 1

PHƯƠNG PHÁP SỬ DỤNG KÍNH HIỂN VI QUAN SÁT HÌNH THÁI VI SINH VẬT

Vi sinh vật là những sinh vật vô cùng nhỏ bé mà mắt thường không thể thấy được. Vì vậy chỉ có một dụng cụ duy nhất giúp chúng ta nhìn được chúng đó là kính hiển vi; kính hiển vi không tách rời với bất cứ lĩnh vực công tác vi sinh vật nào. Hiện nay người ta đã sáng chế ra nhiều loại kính hiển vi khác nhau nhằm mục đích nghiên cứu rõ hơn và sâu hơn về vi sinh vật. Song ở đây chúng ta chỉ nghiên cứu sử dụng loại kính hiển vi quang học là các loại kính hiển vi thông thường được sử dụng ở hầu hết các lĩnh vực có liên quan đến vi sinh vật.

MỤC ĐÍCH YÊU CẦU

— Nắm vững cấu tạo của kính hiển vi. Hiểu rõ nguyên tắc và phương pháp sử dụng kính hiển vi.

— Sử dụng thành thạo kính hiển vi để quan sát hình thái và cấu tạo cơ bản của 1 số loại vi sinh vật.

— Thực hiện tốt các biện pháp và yêu cầu bảo vệ kính hiển vi trước và sau khi sử dụng xong.

I — CẤU TẠO KÍNH HIỂN VI

Kính hiển vi bao gồm ba bộ phận chính sau đây (hình 1).

1. Bộ phận cơ giới

Chân kính: Dùng để đỡ kính hiển vi

Khay kính: Nơi đặt tiêu bản để quan sát. Ở giữa có một lỗ hổng để ánh sáng có thể đi qua, tiêu bản được đặt ở chính chỗ này. Trên khay có kẹp để giữ tiêu bản. Khay kính có thể được

hãm cố định hoặc di động theo các chiều là nhờ có ốc hãm và ốc chuyển dịch nằm ở mép dưới khay kính, nhờ đó mà tiêu bản có thể được cố định hay chuyển dịch. Ở một số loại kính thì tiêu bản được cố định và dịch chuyển là nhờ hai du xích đặt trên khay kính.

Trụ mang ống kính: Là bộ phận hình cong dùng để đặt ống kính, gắn với trụ giữa bằng một bản lề trượt để có thể di động lên xuống. Trụ kính có bộ đầu (đầu trụ) để gắn ống kính và bản xoay.

Ống kính: Là ống kim loại rỗng hình trụ, phía trên gắn thị kính, phía dưới gắn bản xoay có gắn các vật kính. Phần trên ống kính có gắn thị kính có thể là một ống gắn một thị kính, hoặc có thể là hai ống gắn hai thị kính. Phần này có thể quay được theo các hướng nhờ vít hãm.

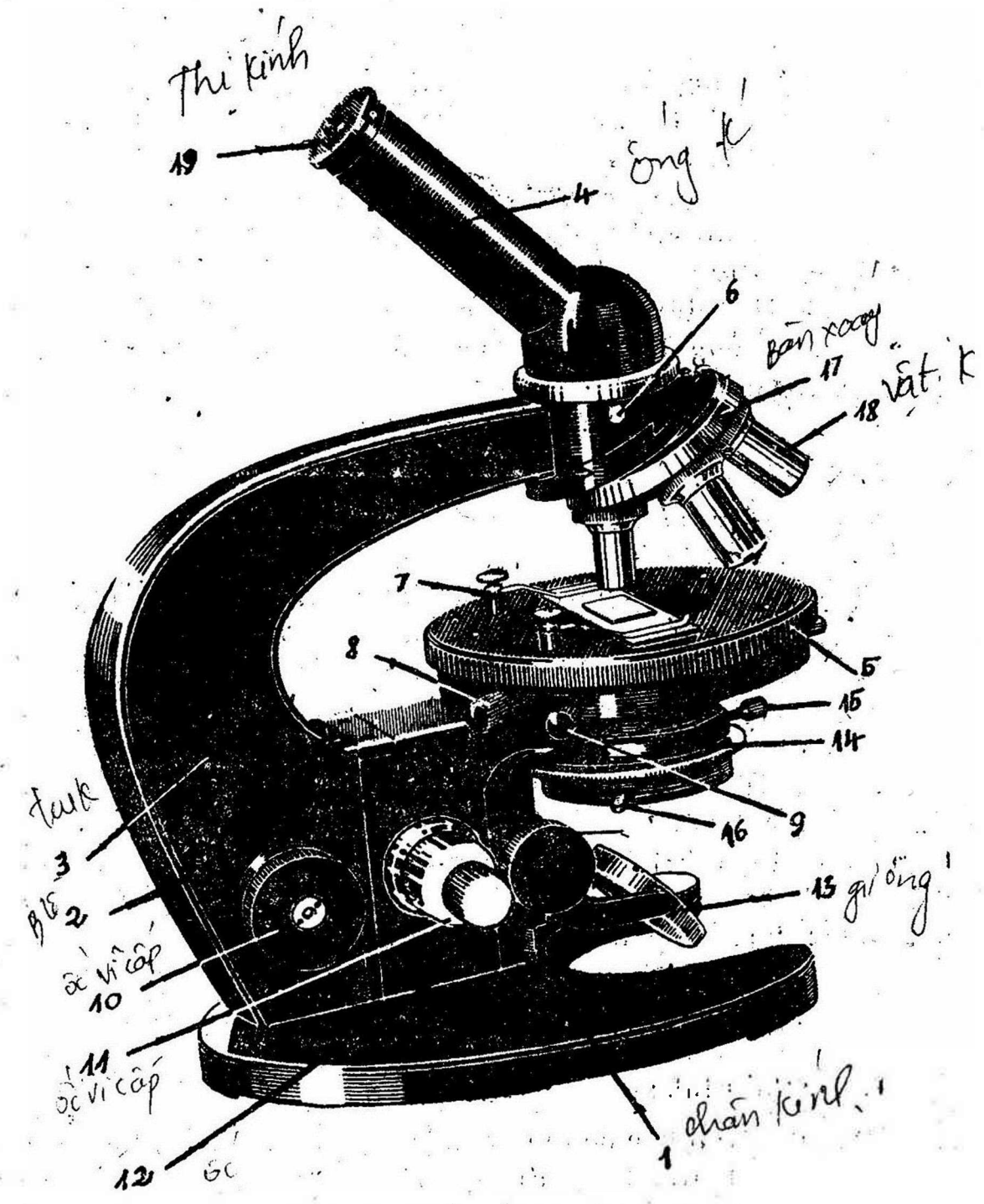
Ốc điều chỉnh: Gồm ốc vĩ cấp và ốc vi cấp. Các ốc này chủ yếu là làm dịch chuyển vị trí của trụ kính, thực chất là điều chỉnh khoảng cách giữa tiêu bản và đầu vật kính. Có loại kính hai ốc được gắn chung trên một trục. Có loại kính hai ốc được đính ở hai vị trí khác nhau. Ốc vi cấp làm di chuyển ống kính chậm, đầu ốc thường có khắc độ, mỗi khắc độ tương đương với sự dịch chuyển là 0,01mm.

2. Bộ phận quang học.

Vật kính: Do bộ phận quang học này tiếp cận với vật thể cần quan sát nên có tên như vậy. Vật kính là một hệ thống quang học gồm nhiều thấu kính ghép lại với nhau. Vật kính là một bộ phận quan trọng nhất quyết định tính năng của kính hiển vi (tính năng tạo ảnh thật của tiêu bản).

Mỗi kính hiển vi tùy theo thiết kế bao gồm số lượng vật kính khác nhau, nhưng đều có đủ loại. Vật kính bội số thấp, trung bình và cao. Vật kính có bội số thấp là các vật kính 8 X; 10 X; 20X; vật kính có bội số trung bình 40X; 60X hoặc 65X; vật kính có bội số cao là 90 X hoặc 100 X (còn gọi là vật kính dầu ở đầu có một vòng đen để phân biệt với vật kính khác) vật kính bội số thấp thường được dùng để xem tươi, còn vật kính dầu thường để xem tiêu bản nhuộm.

Thị kính: Được gọi là thị kính là do bộ phận quang học này tiếp cận với mắt người quan sát. Cấu tạo gồm hai thấu kính ghép lại. Thị kính không có năng lực tạo ảnh như vật kính mà



Hình 1 : Cấu tạo kính hiển vi

- | | |
|-------------------------------------|---------------------------------|
| 1 - Chân kính | 11 - Ốc vĩ cấp (điều chỉnh nhỏ) |
| 2 - Bản lề | 12 - Ốc nâng (hạ) Tụ quang kính |
| 3 - Trụ kính | 13 - Gương phản chiếu |
| 4 - Ống kính | 14 - Tụ quang kính |
| 5 - Khay kính | 15 - Ốc giữ tụ quang kính |
| 6 - Ốc hãm ống kính | 16 - Bộ phận chắn sáng |
| 7 - Kẹp giữ tiêu bản | 17 - Bàn xoay gắn vật kính |
| 8 - Ốc điều chỉnh khay kính đi động | 18 - Vật kính |
| 9 - Ốc hãm khay kính | 19 - Thị kính |
| 10 - Ốc vĩ cấp (điều chỉnh lớn) | |

chủ yếu chức năng của nó là phóng đại ảnh do vật kính thu được. Thông thường thị kính có độ phóng đại: 7X; 10X; 15X và 20X (hoặc 12X, 16X...).

Như vậy ta thấy rằng độ phóng đại tiêu bản quan sát sẽ là tích số của độ phóng đại thị kính với độ phóng đại của vật kính đem sử dụng.

Ví dụ: Nếu dùng vật kính đầu có độ phóng đại 90X và thị kính có độ phóng đại 15X để quan sát tiêu bản thì tiêu bản đã được phóng đại lên :

$$90 \times 15 = 1350 \text{ lần}$$

3. Bộ phận tập trung ánh sáng

Gương phản chiếu: Đặt dưới khay kính gồm hai mặt lõm và lồi.

Tụ quang kính: Đặt dưới khay kính dùng để tập trung ánh sáng từ gương phản chiếu vào tiêu bản. Trong tụ quang kính có một hoặc nhiều thấu kính tạo nên sự tập trung ánh sáng, đó đó tăng cường sự chiếu sáng rõ của tiêu bản và tập trung ánh sáng vào đầu của vật kính. Dưới hệ thống thấu kính là bộ phận chắn sáng, cấu tạo bởi hơn chục lá thép mỏng ghép lại, bộ phận trung tâm hình thành lỗ tròn. Có thể điều chỉnh độ to nhỏ của lỗ bằng một cần gạt ở bên, do đó lượng ánh sáng đi vào được điều chỉnh. Tụ quang kính có thể di động lên xuống nhờ có ốc điều khiển làm chuyển dịch bản lề gắn tụ quang.

II – CÁCH SỬ DỤNG KÍNH HIỂN VI

1. Tư thế kính :

Đặt kính trên bàn cho ngay ngắn, ở tư thế có lợi nhất cho người quan sát. Khi quan sát người ta thường dùng mắt trái còn mắt phải dùng để ghi chép. Cần phải luyện tập khả năng quan sát bằng hai mắt để có thể thay đổi cho đỡ mệt. Khi quan sát cần luyện mở cả hai mắt, tránh nheo một bên mắt hay dùng tay bịt một bên mắt, như vậy không mỏi mệt và thuận tiện cho người quan sát.

2. Nguồn sáng

Có thể sử dụng hai nguồn sáng là nguồn sáng tự nhiên và nguồn sáng nhân tạo (ánh sáng đèn).

Sử dụng nguồn sáng tự nhiên thường là ánh sáng tán xạ, (ánh sáng gián tiếp), muốn vậy phải đặt kính trước cửa sổ quay

về hướng nam hoặc hướng bắc thì tốt, vì ánh sáng tương đối ổn định, dễ quan sát. Tránh dùng ánh sáng, mặt trời chiếu trực tiếp vì có hại cho mắt và ánh sáng không được rõ.

Sử dụng nguồn sáng nhân tạo, thường người ta dùng ánh sáng của đèn điện và ánh sáng của đèn dầu, đèn đất, nến... Nhưng phải điều chỉnh lượng ánh sáng đưa vào trong kính tốt nhất là dựa vào gương phản chiếu những tia sáng hình nón rộng thì ánh sáng vào kính sẽ đều. Người ta cần dùng những phiến kính lọc màu đặt ở tụ quang kính, (nếu dùng ánh sáng của đèn chiếu kính thì kính lọc màu đặt ngay ở đèn chiếu kính) để tránh sự ảnh hưởng của tia sáng màu vàng hoặc màu nâu đến màu sắc thật của ảnh. Trường hợp ánh sáng mạnh còn sử dụng kính mờ màu trắng để giảm bớt cường độ ánh sáng và làm cho ánh sáng đều.

3. Cách lấy ánh sáng.

Hiệu quả quan sát tiêu bản có quan hệ rất lớn đến cách sử dụng ánh sáng. Sử dụng tốt ánh sáng có quan hệ đến ba yếu tố là cách sử dụng nguồn sáng, sử dụng gương phản chiếu và kính tụ quang.

Cách sử dụng gương phản chiếu và kính tụ quang. Đối với kính hiển vi có bố trí kính tụ quang. Trong trường hợp thông thường: Phải dùng mặt phẳng gương phản chiếu để bảo đảm phát huy tính năng tạo ảnh của kính. Đặc biệt trong trường hợp nguồn sáng ở xa; chỉ trong trường hợp ánh sáng không đủ, hoặc khi sử dụng ánh sáng thiên nhiên mà bóng của cây ở ngoài cửa sổ lọt vào thị trường thì có thể dùng kính lồi, bởi vì kính tụ quang chỉ tập trung được các tia sáng chiếu song song. Đối với kính hiển vi không có bố trí kính tụ quang thì nói chung đều dùng mặt lồi của gương phản chiếu.

Sử dụng kính tụ quang cần nắm được các điểm sau đây: khi quan sát với vật kính bội số thấp thường ít mở bộ phận chắn sáng, và hạ thấp đến mức gần như thấp nhất kính tụ quang; Như vậy thị trường được chiếu sáng rộng, thị trường nhận được ánh sáng đều và đủ khi dùng vật kính có bội số cao hơn thì kính tụ quang cũng được nâng dần lên đến mức cần thiết để đạt được độ chiếu sáng tốt, ảnh rõ. Dùng với vật kính dầu (bội số cao) cần thiết phải nâng kính tụ quang lên mức tối đa và có thể mở hoàn toàn bộ phận chắn sáng.

Cách điều chỉnh ánh sáng: Mở hoàn toàn bộ phận chắn sáng, hạ thấp tụ quang kính với mục đích tìm ánh sáng tối đa trong kính. Vận tất cả các vật kính vào bàn quay rồi đưa vật kính bội số thấp vào trục kính; hạ thấp ống kính xuống; xoay chuyển gương phản chiếu đồng thời theo dõi ánh sáng trong kính; khi nào thấy ánh sáng đạt tối đa thì thôi. Tùy theo nguồn sáng, đặc tính của tiêu bản mà có sự điều chỉnh kính tụ quang cho thích hợp để đạt được mục đích quan sát.

Xem tiêu bản tươi với vật kính dầu: khi dùng với vật kính bội số thấp thì thường không dùng kính tụ quang và gương phản chiếu. Nguồn sáng yếu thì có thể dùng gương mặt phẳng khi dùng với vật kính bội số thấp (10X; 20X) và dùng gương mặt lõm khi dùng vật kính bội số trung bình (40X). Khi nguồn sáng tập trung thì dùng gương nào cũng được. Hạ thấp tụ quang kính và ít mở bộ phận chắn sáng.

Xem tiêu bản nhuộm với vật kính dầu: khi nguồn sáng tốt, rộng thì dùng gương nào cũng được, khi nguồn sáng hẹp thì dùng gương lõm; nâng cao tận cùng kính tụ quang và mở hoàn toàn bộ phận chắn sáng nhưng khi ánh sáng mạnh quá có thể đóng bớt bộ phận chắn sáng.

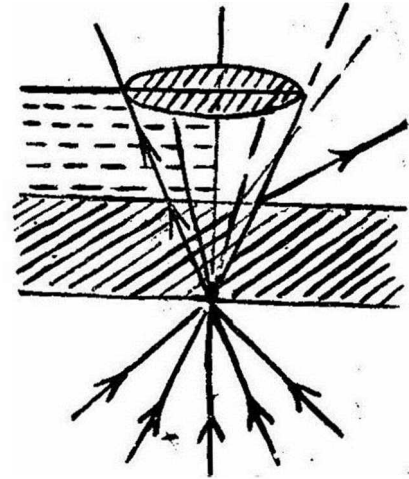
4. Xác định tiêu điểm và quan sát.

Đặt phiến kính có tiêu bản lên khay kính, cố định. lắp vật kính và thị kính thích hợp vào bàn xoay và ống kính. Khi xem tươi có thể dùng các thị kính, vật kính có bội số thấp (vật kính 8X; 40X; thị kính 8X; 10X.); khi nhuộm có thể dùng thị kính và vật kính có bội số cao hơn (vật kính dầu 90X; thị kính 15X).

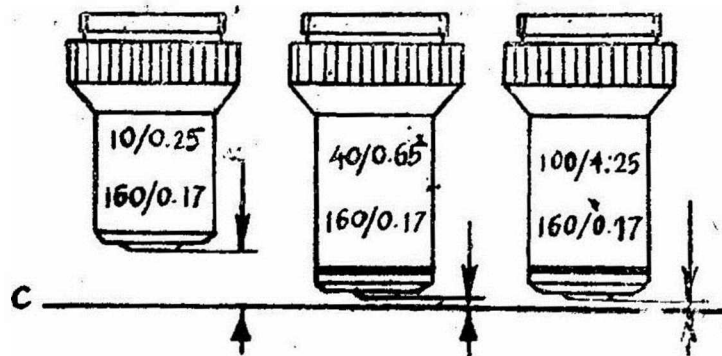
Khi xem tươi chỉ cần hạ thấp ống kính gần sát xuống tiêu bản, sau đó vận ốc vĩ cấp nâng từ từ ống kính lên, đồng thời quan sát trong kính, nếu thấy chớp ảnh thì dùng ốc vĩ cấp để điều chỉnh cho rõ ảnh của tiêu bản.

Khi xem tiêu bản nhuộm với vật kính dầu thì đầu tiên phải xác định tiêu điểm với vật kính bội số thấp nhất. Sau đó nhỏ một giọt dầu bạch dương (cedre) rất nhỏ vào vị trí đã được xác định không làm lan rộng ra, lý do của việc nhỏ dầu là do vật kính dầu có độ phóng đại lớn nên có đường kính thấu kính nhỏ vì vậy khi dùng không cho dầu thì chỉ có một phần nhỏ ánh sáng lọt vào thấu kính, ảnh vào sẽ không được rõ; dầu bạch

dương có chiết suất xấp xỉ chiết suất thủy tinh cho nên ánh sáng đi qua tiêu bản để vào vật kính là một môi trường gần như đồng nhất nên đi thẳng mà không bị khúc xạ vì vậy lượng ánh sáng vào nhiều, ảnh rõ (hình 2). Xoay vật kính đầu cho sát xuống tiêu bản cho dầu vật kính ngập trong dầu (chú ý không vặn xuống mạnh làm ép vỡ tiêu bản). Nhìn vào thị kính và xoay ốc vĩ cấp nâng vật kính dầu lên từ từ. Khi thấy có chớp ảnh thì vặn ốc vĩ cấp từ từ để thấy rõ ảnh tiêu bản. Cần phải chú ý một điều quan trọng là ảnh của tiêu bản được quan sát rõ nhất khi mà vặn đúng tiêu điểm của vật kính với tiêu bản. Lúc này giữa dầu vật kính với mặt trên của phiến kính có tiêu bản có một khoảng cách ổn định; nếu thay đổi khoảng cách này thì ảnh tiêu bản sẽ mất hoặc nhìn không rõ; khoảng cách này được gọi là cự ly công tác của vật kính. Cự ly công tác của vật kính có quan hệ với tiêu cự của nó. Vật kính có độ phóng đại càng lớn, tiêu cự càng ngắn thì cự ly công tác cũng càng ngắn (hình 3).



Hình 2: Đường đi của tia sáng qua tiêu bản



Hình 3: Cự ly công tác của vật kính (C — mặt trên của phiến kính; → ← cự ly công tác của vật kính, đơn vị mm)

Điều này giúp cho chúng ta khi điều chỉnh kính tìm tiêu điểm được dễ dàng vì ta có thể ước đoán được cự ly vặn ốc để điều chỉnh ở trong phạm vi cách giữa dầu vật kính với tiêu bản mà ta ước đoán ứng với từng vật kính khác nhau;

III – CÁCH BẢO QUẢN KÍNH HIỂN VI

— Lấy kính trong hộp ra nên dùng tay phải, nắm chắc trụ kính kéo kính ra theo hướng nằm ngang không để dựng vào thành hộp; sau đó dùng tay trái đỡ chân kính để mang đi. Nếu mang đi xa thì phải cố định chắc chắn để tránh bị hỏng kính do bị lắc mạnh.

— Không được sờ tay vào các đầu của vật kính và thị kính. Nếu phát hiện thấy vật kính, thị kính bị bụi bẩn thì không được dùng tay, các thứ vải linh tinh để lau hoặc mồm để thổi mà phải dùng giấy riêng để lau kính hay khăn lụa để lau, khi lau phải nhẹ nhàng.

— Khi dùng xong, nếu sử dụng vật kính dầu thì trước hết phải dùng giấy mềm hoặc vải lụa để lau nhẹ cho sạch dầu, sau đó lau lại bằng xylene hoặc benzen cho hết dầu ở đầu vật kính, dùng giấy hoặc vải lụa lau lại một lần nữa là được. Xoay các bộ phận của kính về đúng chỗ quy định. Để choãi dầu vật kính sang hai bên, và áp sát xuống mặt khay kính. Tụ quang kính phải hạ thấp xuống gương phản chiếu xoay dọc theo thân kính.

— Không được để ánh sáng mặt trời chiếu trực tiếp vào kính. Không được tự tiện tháo lắp các bộ phận của kính không tự ý cho dầu vào các bộ phận cơ giới của kính.

— Phải để nơi khô ráo thoáng, không nóng, ít bụi bặm.

IV – QUAN SÁT HÌNH THÁI VI SINH VẬT

Kết hợp với thao tác sử dụng kính hiển vi tiến hành các tiêu bản đã chuẩn bị sẵn (hoặc kết hợp với nội dung bài thực tập 2 để học sinh tự chuẩn bị tiêu bản quan sát) về hình thái một số loại vi sinh vật đặc trưng.

Xem tiêu bản tươi với vật kính bội số thấp (8X — 20X) tiêu bản của nấm mốc.

Xem tiêu bản tươi với vật kính bội số trung bình (40X): tiêu bản nấm men, trực khuẩn kích thước lớn.

Xem tiêu bản nhuộm với vật kính bội số cao (vật kính dầu 90X): tiêu bản của một số loại cầu khuẩn, trực khuẩn, xạ khuẩn, nấm men.

NỘI DUNG TƯỜNG TRÌNH

Tự mỗi học sinh điều chỉnh kính để quan sát các tiêu bản được chuẩn bị.

— Quan sát hình thái cấu tạo bên ngoài và bên trong của các loại vi sinh vật ở các tiêu bản, đồng thời miêu tả màu nhuộm của tế bào.

— Phân biệt vẽ hình từng loại vi sinh vật, chú ý sự khác nhau về kích thước, hình thái và trạng thái tồn tại của chúng ở trong tiêu bản quan sát.

CHUẨN BỊ NGUYÊN LIỆU VÀ DỤNG CỤ

Cho một nhóm 20 học sinh:

1. Dụng cụ: Kính hiển vi
Khăn lau kính
Đèn soi kính

Tiêu bản tươi và tiêu bản nhuộm các loại VSV

2. Nguyên liệu:

Dầu bạch hương
Dung dịch xylon.

BÀI 2

PHƯƠNG PHÁP LÀM VÀ NHUỘM MẪU TIÊU BẢN

Làm và nhuộm mẫu tiêu bản có ý nghĩa quan trọng trong công tác vi sinh vật; có tiêu bản thì người ta, mới sử dụng kính hiển vi để quan sát được hình thái, đo được kích thước và quan sát được cấu tạo đại thể cũng như vi thể của tế bào vi sinh vật (Quan sát tiêu bản nhuộm) và để quan sát một số hoạt động sống bình thường của vi sinh vật như sự chuyển động, sự sinh trưởng và phát triển (quan sát tiêu bản tươi ở trạng thái tự nhiên).

MỤC ĐÍCH YÊU CẦU

—Nắm vững các thao tác cơ bản trong phương pháp chế tạo tiêu bản các loại theo những yêu cầu và nội dung khác nhau.

— Thành thạo về phương pháp nhuộm đơn, và nhuộm kép (nhuộm Gram).

— Phân biệt được hiện tượng của phản ứng gram âm và gram dương.

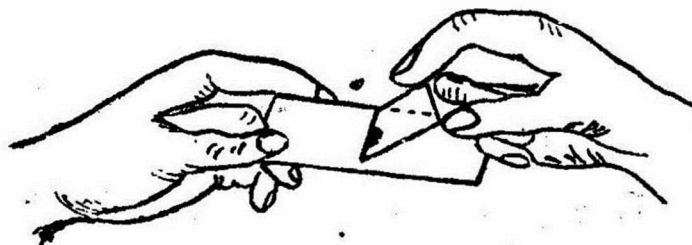
I – PHƯƠNG PHÁP LÀM TIÊU BẢN TƯƠI KHÔNG NHUỘM

1. Tiêu bản giọt ép.

— Lấy một phiến kính (lame) sạch hơn vài lần trên ngọn lửa đèn cồn để khử vết dầu, mỡ trên mặt và làm khô phiến kính; để phiến kính trên bàn.

— Dùng que cấy sau khi đã nung đỏ trên ngọn lửa đèn cồn, sau khi đã nguội lấy một giọt môi trường có nuôi cấy vi sinh vật đặt lên giữa phiến kính, hơn que cấy. Trường hợp môi trường nuôi cấy đặc thì trước khi làm như trên phải dùng que cấy đã đốt khử trùng lấy một giọt nước cất vô trùng cho vào giữa phiến kính trước. Sau đó lấy một ít khuẩn lạc tiêu chuẩn cho vào giọt nước ở trên phiến kính trộn nhẹ đều.

— Dùng một lá kính (lamella) đẩy lên giọt dung dịch vi sinh vật trên. Cách làm như sau: Đầu tiên để mép lá kính xuống



Hình 4: Đẩy lá kính lên giọt tiêu bản

mặt phiến kính sát chỗ giọt dịch; hạ từ từ và nhẹ nhàng lá kính xuống đẩy kín, ép đều giọt dịch phía trước. Chú ý tránh đẩy nhanh, mạnh có thể tạo thành bọt khí và làm cho giọt dịch bắn lung tung ra ngoài (hình 4).

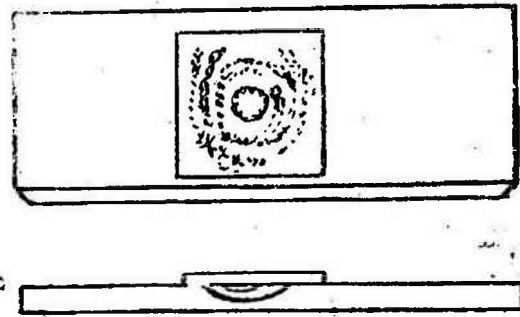
2. Tiêu bản giọt treo.

— Lấy một lá kính sạch và một phiến kính lõm (có một chỗ lõm ở giữa phiến kính) sạch.

— Bôi một lớp va-dơ-lin mỏng quanh chỗ lõm trên phiến kính để gắn kín lá kính trên phiến kính tránh khô dịch quan sát.

— Thứ tự và cách làm như tiêu bản trên khi lấy mẫu làm tiêu bản, nhưng khác là tiêu bản được đặt vào giữa lá kính thành giọt tròn gọn.

— Thận trọng úp ngược lá kính lại sao cho giọt dịch vi sinh vật nằm ở phía dưới rồi từ từ đặt lên chỗ lõm của phiến kính sao cho giọt dịch tiêu bản vẫn giữ nguyên vị trí trên lá kính và nằm đúng vào giữa chỗ lõm (hình 5).



Hình 5: Phương pháp giọt treo
a—nhìn trên xuống; b—nhìn nghiêng

II – PHƯƠNG PHÁP LÀM TIÊU BẢN TƯƠI NHUỘM

Để quan sát các hoạt động của tế bào vi sinh vật sống một cách rõ ràng hơn, có thể tiến hành làm tiêu bản giọt treo hay giọt ép như trên nhưng cho thêm một dung dịch thuốc nhuộm nào đó, theo một trong những cách làm như sau:

— Cùng nhỏ một giọt thuốc nhuộm xanh methylen 0,001% và giọt dung dịch vi khuẩn lên cùng chỗ trên phiến kính trộn đều. Trong trường hợp vi sinh vật lấy từ môi trường rắn có thể dùng giọt thuốc nhuộm làm môi trường hòa tan thay nước cất.

— Nhỏ một giọt thuốc nhuộm xanh methylen 0,001% lên phiến kính, để khô; sau đó lấy 1 giọt dịch môi trường vi khuẩn (nếu như môi trường khô phải làm như phần I đã hướng dẫn) lên chỗ màu nhuộm.

III – PHƯƠNG PHÁP NHUỘM MÀU TIÊU BẢN

Nhuộm màu tiêu bản chính là nhuộm màu tế bào vi sinh vật. Công tác nhuộm màu giúp cho chúng ta quan sát kỹ các phần cấu trúc của tế bào. Sử dụng các loại thuốc nhuộm, khác nhau với thủ thuật nhuộm màu tiêu bản khác nhau người ta sẽ quan sát được những cấu tạo đặc biệt của vi khuẩn như giáp mô, nha bào, lông... Qua đó phân biệt các chủng loại khác nhau của vi khuẩn. Tính chất bắt màu không giống nhau (bằng phương pháp nhuộm kép) người ta phân biệt được các nhóm vi khuẩn khác nhau. Nhuộm màu còn có tác dụng trong sự bảo tồn tiêu bản của một loại hình vi sinh vật nào đó cần cho sự nghiên cứu về sau này.

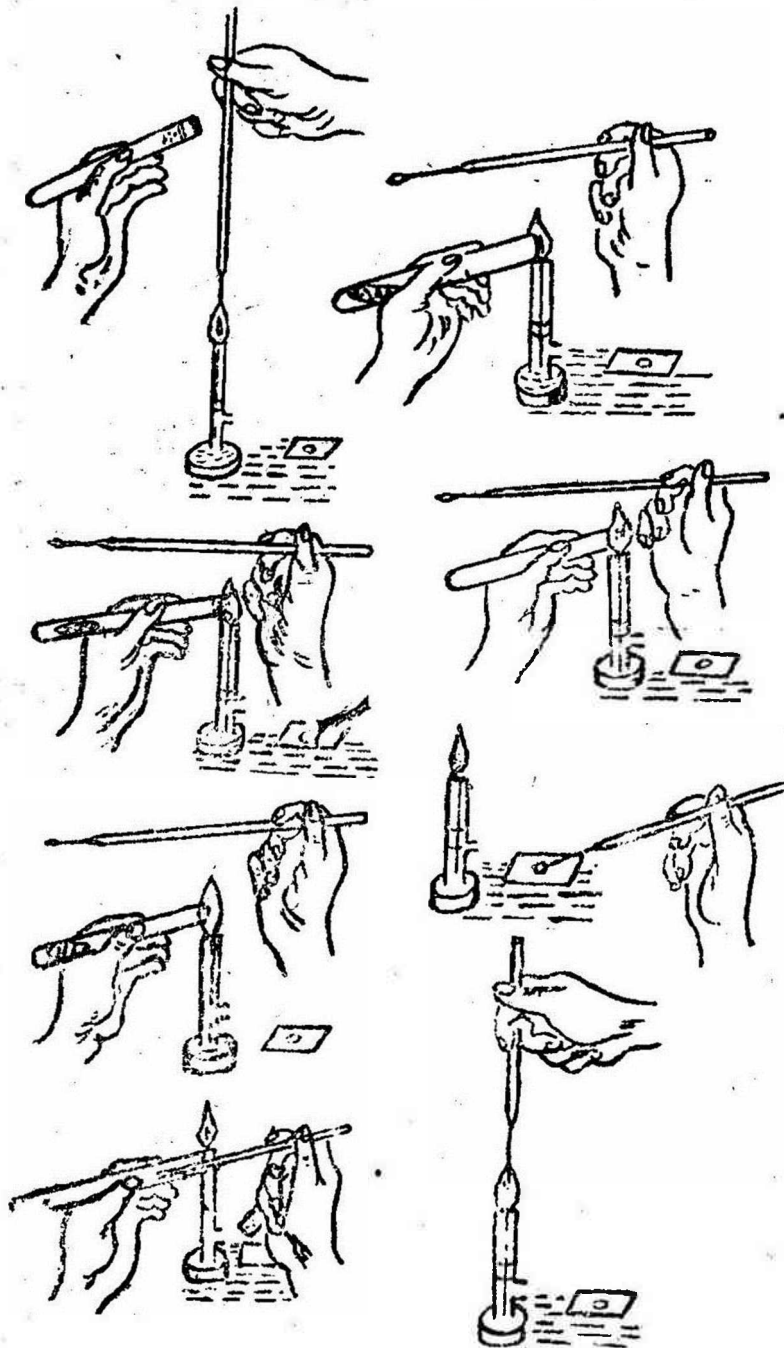
Nhuộm màu tiêu bản tiến hành theo các nội dung chính là làm tiêu bản (phiến kính), cố định và nhuộm màu tiêu bản.

1. Phương pháp làm tiêu bản để nhuộm.

— Chọn phiến kính sạch, trong và khô, nếu không phải rửa qua cồn, hơ trên ngọn lửa đèn cồn và dùng khăn vải mịn lau sạch.

– Trình tự tiến hành giống như ở phần làm tiêu bản giọt ép đã hướng dẫn, nhưng không dày lá kính.

Nhưng cần chú ý là tiêu bản tránh làm dày quá khó quan sát, sau này khi làm tiêu bản đặc biệt chú ý đến thao tác vô trùng như: phải hơ miệng của các vật có chứa canh trùng lên ngọn lửa đèn cồn khi lấy nút ra để làm tiêu bản. Que cấy phải được khử trùng kỹ trên ngọn lửa đèn cồn trước và sau khi làm tiêu bản và làm xong tiêu bản (hình 6). Để tiết kiệm phiến kính hoặc để tiện cho quan sát có thể làm hai hoặc ba tiêu bản trên cùng một phiến kính, nhưng nhớ ghi chú để đỡ lẫn.



Hình 6:
Thao tác làm
tiêu bản đê-
nhuộm

2. Cố định tiêu bản.

Cố định tiêu bản có mục đích là giết chết vi sinh vật, cố định chặt tiêu bản trên phiến kính khỏi bị nước rửa trôi đi mất, làm cho tiêu bản dễ nhuộm hơn vì các nguyên sinh chất chết dễ bắt màu hơn các nguyên sinh chất sống. Có thể cố định bằng nhiều cách:

— Cố định bằng nhiệt độ: Hơ qua vài lần trên ngọn lửa đèn cồn, không hơ sát ngọn lửa làm cho tiêu bản dễ biến dạng hay để trong tủ sấy nhiệt độ thấp, hoặc làm tiêu bản xong để trên giá cho khô tự nhiên hay cho vào trong bình hút ẩm.

— Cố định bằng cồn 95° hoặc tuyệt đối: nhỏ vài giọt cồn lên tiêu bản đợi khô hoặc sau khi nhỏ cồn xong thì đốt. Khi ngọn lửa vừa bốc cháy thì thổi tắt ngay tiêu bản sẽ khô và không bị nhiệt độ cao ảnh hưởng.

— Cố định bằng hóa chất: Dùng các dung dịch cố định (fixateur) như cồn 96°; dịch etanol-formal; hơi foemalin...

3. Phương pháp nhuộm.

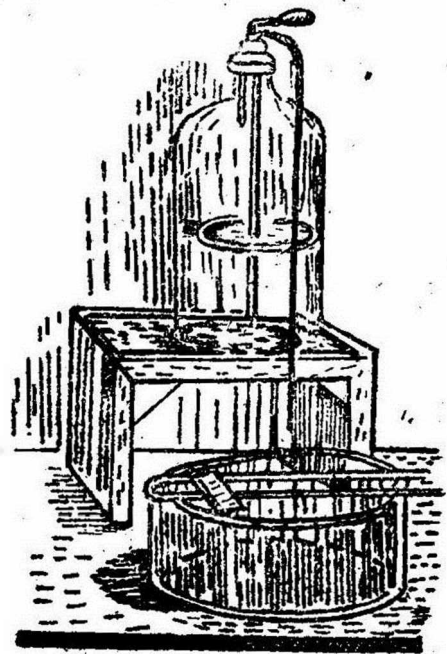
Nhuộm đơn: Là phương pháp chỉ dùng một loại thuốc nhuộm để nhuộm. Thường dùng phương pháp này để quan sát hình thái và kích thước tế bào.

— Thường dùng các loại thuốc nhuộm như Fucxin kiềm, xanh Methylen.

Thủ thuật nhuộm tiến hành như sau:

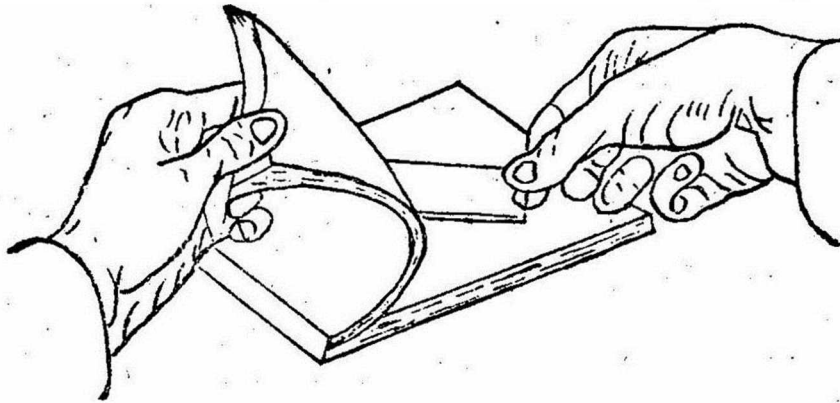
— Đặt phiến kính đã được cố định trên giá đặt trên chậu thủy tinh (hình 7) giở lên chỗ làm tiêu bản vài giọt thuốc nhuộm.

— Sau 1 — 2 phút, hoặc lâu hơn tùy theo loại thuốc nhuộm, đổ thuốc nhuộm đi rồi rửa nhẹ bằng nước; để nghiêng phiến kính cho nước chảy từ từ dọc theo phiến kính đến khi nào thấy nước trong là được.



Hình 7: Giá đặt phiến kính khi làm bản mẫu.

— Sấy khô bằng hơi nóng như hơi trên ngọn lửa đèn cồn hay để trong tủ sấy nhiệt độ thấp hay thấm khô bằng giấy lọc (hình 8).



Hình 8: Thấm khô sau khi rửa nước

Nhuộm kép: phương pháp nhuộm Gram :

Năm 1884 : Cristian Gram giới thiệu một phương pháp nhuộm đặc biệt là dùng hai loại thuốc nhuộm để nhuộm ; sau khi nhuộm màu loại thuốc nhuộm thứ nhất và làm gắn màu bằng dung dịch hợp chất hóa học. (Tím genxian hoặc kết tinh tím) thì dùng một loại chất khác để lấy màu ; sau đó lại tiến hành nhuộm với một loại thuốc nhuộm thứ hai, loại thuốc nhuộm này phải có màu đối lập với loại trước và không được mạnh bằng loại thuốc nhuộm thứ nhất để ảnh hưởng đến màu đã được nhuộm trước. Kết quả có vi khuẩn bắt màu tím và có loại bắt màu loại thuốc nhuộm thứ hai. Loại vi khuẩn như trên được gọi là vi khuẩn Gram dương, sau khi nhuộm màu tím nó không bị chất lấy màu tẩy đi mất, do đó không bắt màu loại thuốc nhuộm thứ hai ; loại vi khuẩn sau là vi khuẩn Gram âm nó đã bị tẩy mất màu tím, cho nên lại bắt màu loại thuốc nhuộm thứ hai khi nhuộm tiếp sau đó.

Thủ thuật nhuộm tiến hành như sau :

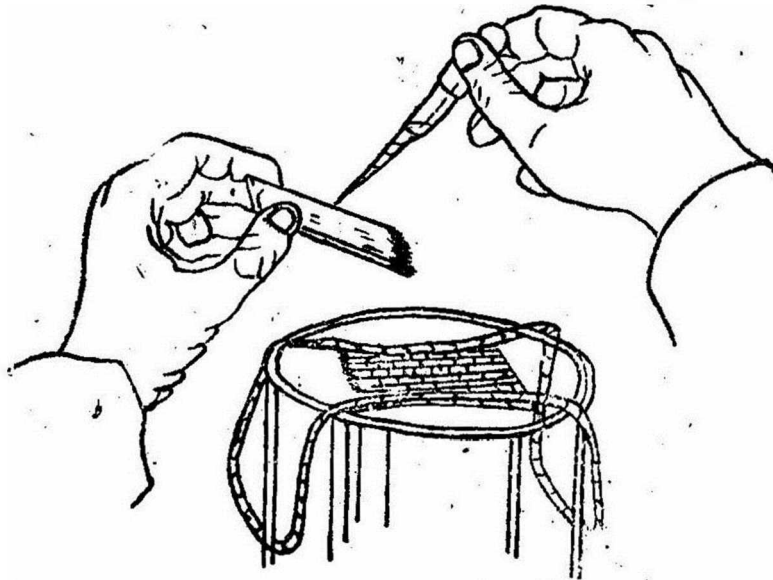
— Để tiêu bản lên giá nhuộm, nhỏ 1 giọt dung dịch tím genxian hoặc tím kết tinh lên trên tiêu bản, để 1 — 2 phút.

— Rửa nước nhanh, vẩy sạch.

— Nhỏ vài giọt dung dịch lugôl, để 1 phút (khi tiêu bản có màu nâu đen).

— Rửa nước nhanh, vẩy sạch.

— Nhỏ cồn-axêton thật nhanh từ đầu phiến kính để nghiêng cho chảy qua tiêu bản, đến khi dịch rửa không còn nhuộm màu nữa thì thôi (hình 9).



Hình 9 : Nhỏ cồn-axêton để tẩy màu

- Rửa nhanh bằng nước, vẩy sạch.
- Nhỏ vài giọt dung dịch Fuc-xin loãng (lấy 1 ml Fuc-xin Ziehl pha trong 19 ml nước cất) hoặc Safranin 0,25% lên tiêu bản, để trong 1 phút,
- Rửa nước đến khi không còn màu nữa.
- Sấy khô hoặc thấm khô.

Những vấn đề chú ý khi nhuộm màu :

- Phải dùng thuốc mới, không cũ.
- Nhỏ thuốc nhuộm đúng tiêu bản, không nhiều quá và lan rộng.

— Khi rửa nước phải dùng tia nước nhỏ, rửa từ một đầu phiến kính để nghiêng, không được dội nước trực tiếp vào chỗ làm tiêu bản để tránh làm trôi tiêu bản.

— Bước tẩy màu trong nhuộm Gram rất quan trọng, phải tẩy màu kỹ nhưng thời gian không được kéo dài. Nếu tẩy màu không kỹ sẽ bị lẫn giữa gram âm với gram dương; nếu tẩy màu lâu quá vi khuẩn gram dương sẽ bị mất màu tím nên dễ bị lẫn với vi khuẩn gram âm.

— Khi nhuộm loại thuốc nhuộm thứ hai trong nhuộm kép không nên dùng thứ đặc quá hay nhuộm thời gian lâu quá như vậy sẽ ảnh hưởng đến sự quan sát sự bắt màu của loại thuốc nhuộm thứ nhất kết quả không rõ.

IV — PHƯƠNG PHÁP NHUỘM MÀU CÁC KẾT CẤU ĐẶC BIỆT CỦA VI SINH VẬT

1. Nhuộm giáp mô.

Một số loài vi khuẩn có khả năng sinh giáp mô (vỏ nhầy-cap sul); giáp mô khó bắt màu nên phải dùng thuốc và phương pháp nhuộm đặc biệt mới có kết quả có thể sử dụng các phương pháp sau:

Phương pháp nhuộm Hiss.

- Làm tiêu bản, cố định tiêu bản bằng ngọn lửa đèn cồn.
- Nhỏ Fucxin kiềm hay tím kết tinh lên tiêu bản, hơi nóng thấy bốc hơi thì thôi,
- Tẩy màu bằng dung dịch CuSO_4 20% cho tới khi màu không thôi ra nữa thì thôi.
- Làm khô.
- Quan sát dưới vật kính dầu thấy vỏ nhày được nhuộm màu xanh, tế bào nhuộm màu đỏ.

Phương pháp nhuộm KLETT.

- Làm tiêu bản để khô tự nhiên trong không khí.
 - Nhỏ dung dịch xanh metylen Klett, hơi nóng đến bay hơi trong một phút, bỏ xung thuốc nhuộm ngay nếu bị khô nhanh.
 - Rửa nước.
 - Nhuộm Fucxin Klett trong 5 giây.
 - Rửa nước làm khô.
- Quan sát với vật kính dầu thấy kết quả vỏ nhày nhuộm màu hồng tế bào nhuộm màu xanh.

2. Nhuộm nha bào.

Chỉ có một số nhóm vi khuẩn mới có khả năng hình thành nha bào. Nha bào khá ổn định và khó bắt màu. Để thấy rõ nha bào vi khuẩn có thể nhuộm bằng các phương pháp sau:

Phương pháp nhuộm SCHAEFFER và FULTON.

- Làm tiêu bản vi khuẩn lấy từ trên thạch nghiêng đến ngày thứ tư, cố định bằng ngọn lửa đèn cồn.
- Nhỏ dung dịch lục malachit 5% cho ngập tiêu bản để trong 2 — 3 phút.

— Hơ lửa cho bốc hơi khi nào thấy mặt thuốc nhuộm có viền nâu là được, để thêm 1 — 3 phút.

— Rửa nước.

— Nhỏ dung dịch Safranin 0,5% trong 1 phút

— Rửa sạch làm khô.

Kết quả soi vật kính dầu bào tử bắt màu xanh; tế bào bắt màu hồng. Màu lục của bào tử chỉ rõ khi dùng thuốc nhuộm mới.

Phương pháp nhuộm OGIETSKA.

— Làm tiêu bản để khô tự nhiên.

— Nhỏ vài giọt HCl 0,5% lên vết bôi, hơ nóng trên ngọn lửa đèn cồn cho bốc hơi, giữ khoảng 2 phút.

— Rửa nước.

— Nhỏ thuốc nhuộm Fucxin Ziehl lên tiêu bản qua miếng giấy lọc đặt ở trên. Hơ nóng cho bốc hơi, duy trì trong 5 phút; nếu thuốc nhuộm khô phải bổ xung ngay.

— Vứt giấy lọc, rửa nước.

— Ngâm tiêu bản trong dung dịch H_2SO_4 1% trong 2 phút.

— Rửa nước.

— Nhỏ dung dịch xanh metilen Loeffler, để trong 5 — 15 phút

— Rửa nước, làm khô.

Kết quả soi vật kính dầu bào tử nhuộm màu đỏ, tế bào nhuộm màu xanh.

3. Nhuộm lông.

Lông (Flagella) có ở một số nhóm vi khuẩn. Lông vi khuẩn rất mảnh nên khó quan sát; hơn nữa nó dễ bị đứt khi nhuộm cho nên muốn quan sát thấy ta có thể dùng phương pháp sau đây.

Phương pháp nishiwawa kangen

— Lấy khuẩn lạc nuôi cấy trên môi trường thạch, trong thời gian ngắn (canh trường non) 12—15 giờ, pha loãng nhẹ nhàng trong nước cất vô trùng thành huyền dịch đục đều.

— Nhỏ thật nhẹ nhàng vài giọt huyền dịch trên phiến kính sạch (ngâm trong cồn và được đốt nóng nhiều lần trước khi làm), sau đó dàn đều, để khô tự nhiên.

— Nhỏ dung dịch I qua phễu bằng giấy lọc, để trong 15 phút

— Khẽ nghiêng phiến kính để đồ thuốc nhuộm đi, nhúng nhẹ nhàng vào nước sạch trong 30 giây.

— Nhỏ dung dịch II qua phễu bằng giấy lọc, để trong 1–2 phút (khi tiêu bản chuyển màu nâu rõ).

— Nhúng nhẹ nhàng vào cốc nước sạch giữ trong 30 giây, để khô.

Kết quả soi vật kính dầu thấy tiêm mao nhuộm màu nâu xám giống tế bào.

Phương pháp loeffler

— Làm tiêu bản như trên.

— Nhỏ thuốc nhuộm Ta-nin để trong 15–20 phút hoặc hơi nóng cho bốc hơi trong thời gian 2–3 phút.

— Đồ thuốc nhuộm, rửa nhẹ trong nước thời gian 30 giây.

— Nhỏ thuốc nhuộm Fucxin Ziehl trong 15 phút.

— Đồ thuốc nhuộm, rửa nước như phương pháp trên.

— Để khô tự nhiên.

Kết quả soi kính dầu, lông và tế bào đều nhuộm màu hồng.

4. Phương pháp nhuộm các thể vùi trong tế bào.

Các thể vùi (hạt dự trữ) trong tế bào có sự thay đổi về loại hình, hình thái và kết cấu tùy thuộc vào loại hình vi sinh vật. Do tính chất của các thể vùi khác nhau nên phương pháp nhuộm từng loại cũng khác nhau. Sau đây giới thiệu một số phương pháp nhuộm các thể vùi cơ bản.

a) Nhuộm volutin

Phương pháp loeffler.

— Làm tiêu bản với vi khuẩn azotobacter, cố định trên ngọn lửa đèn cồn.

— Nhỏ thuốc nhuộm xanh metilen loeffler trong 2–3 phút.

— Rửa nước để khô.

Kết quả soi kính dầu hạt volutin nhuộm màu xanh lam.

Phương pháp omelianski

— Làm tiêu bản như trên.

— Nhuộm Fucxin Ziehl trong 1 phút.

— Tẩy màu bằng dung dịch H_2SO_4 1% trong 20–30 giây.

— Rửa nước.

— Nhuộm xanh metylen $\frac{1}{40}$ trong 15 – 20 giây.

— Rửa nước làm khô.

Kết quả soi kính hạt vô lutin nhuộm màu đỏ, tế bào nhuộm màu xanh.

b) Nhuộm glycogen.

— Làm tiêu bản với Bac. Subtilis hay nấm men cố định trên ngọn lửa đèn cồn.

— Ngâm trong dung dịch Este cồn trong 5 – 10 phút.

Nhỏ dung dịch Iod đặc, đậy lá kính.

Kết quả soi vật kính dầu các hạt glycogen nhuộm màu đỏ nâu

c) Nhuộm Granuloza

Làm tiêu bản với vi khuẩn Butiric (hoặc nấm men).

— Nhỏ vài giọt dịch lugol, đậy lá kính.

Kết quả soi kính hạt granuloza nhuộm màu lam xám.

NỘI DUNG TUỜNG TRÌNH

— Làm tiêu bản tươi không nhuộm và tiêu bản nhuộm với các loại vi sinh vật trong nhóm vi khuẩn nấm men, nấm mốc như: Bac. Subtilis; Staphylococcus aureus; Escherichia Coli; nấm men; mốc Mucor. Aspergillus và Rhizopus.

— Về hình thái các loại vi khuẩn đã quan sát.

— Quan sát và miêu tả hình thái, sự chuyển động và sự sinh sản của nấm men (quan sát sự nảy chồi và tạo vách ngăn).

— Miêu tả hình thái của cơ quan mang bào tử và các bào tử của nấm mốc. Quan sát đại thể cấu tạo sợi nấm và màu sắc của nấm mốc.

— Nhuộm gram với các loại vi khuẩn: Bac. subtilis, Bac. mycoides; E.coli trực khuẩn lactic; staphylococcus aureus. vẽ hình thái và xác định sự bắt màu gram của chúng.

— Nhuộm vi khuẩn Bac. Subtilis và quan sát miêu tả nha bào của nó.

— Nhuộm vi khuẩn E.Coli hay Bac. Subtilis, quan sát và miêu tả lông của nó.

— Dùng các phương pháp nhuộm thể vùi để nhuộm nấm men quan sát và miêu tả thể vùi các loại trong nấm men.

CHUẨN BỊ DỤNG CỤ VÀ NGUYÊN LIỆU

Dụng cụ

- Kính hiển vi và dầu soi kính
- Que cấy và đĩa thủy tinh
- Lá kính (lamelle) và phiến kính (lame) thường và lõm
- Đèn cồn
- Bình rửa.
- Giá và chậu thủy tinh.
- Giá đỡ ống nghiệm.

Pince.

- Que nhọn.

Hóa chất

- Xanh metilen 0,001%

Xanh metilen 0,01g.

Nước cất 1000ml

- Xanh metilen Loeffler

a) Xanh metilen 0,45g

Cồn 96° 30ml

b) Dung dịch KOH 0,01% trong nước 100ml

- Xanh metilen klett

Xanh metilen 1g

Cồn 96° 10ml

Nước cất 1000ml

- Xanh metilen $\frac{1}{40}$

Xanh metilen bão hòa trong cồn 1ml

Nước cất 40ml

- Xanh metilen trong axit phênic

Xanh metilen 1g

Cồn 96° hay tuyệt đối 10ml

axit phênic kết tinh 1g

Nước cất 10ml

Nghiền 1g xanh metilen với 1/2 lượng cồn sau đó đổ từ từ 2/3 lượng nước vào quấy đều. Đổ axit phênic vào quấy đều. Để

ở lọ kín, sau 24 giờ lọc qua giấy, tráng cốc bằng số nước và còn lại.

– Fucxin Ziehl

a) Fucxin kiềm	1g
Cồn 96° hay tuyệt đối	10ml
b) axit phenic	5g
Nước cất	100ml

Cách pha như xanh metilen sau đó đem pha loãng 4 lần với axit phenic 5%

– Fuc xin klett

Fuc xin	1g
Cồn	10ml
Nước cất	100ml

– Tim genxian Cacbonic.

a. Timgenxian hay kết tinh tím	1g
Cồn 90°	10 ml
b. Axit phenic	5g
Nước cất	100 ml

Cách pha như hai loại trên.

– Lugol

Iod kim loại	0,5 g
KI	1 g
Nước cất	150 ml

Nghiền KI với ít nước sau đó cho Iod vào nghiền nhỏ, sau đó nước vào từ từ, lắc đều cho tan hết.

– Cồn – axêton

Cồn tuyệt đối	100 ml
Axêton	20 ml
Nước cất	80 ml

Hỗn hợp các dung dịch trên.

Safranin 0,25%.

Safranin	0,25 g
Cồn 96°	10 ml
Nước cất	90 ml

Nghiền tan trước safranin với cồn, sau đó hỗn hợp với nước.

- Dung dịch CuSO_4 20 %
- $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 20 g
- Nước cất 100 ml
- Dun nóng cho hòa tan rồi lọc.
- Lục malachit 5%
- Lục malachit 5g
- Cồn 96° 10ml
- Nước cất 90 ml
- Hòa trước thuốc nhuộm với cồn và một ít nước.
- Safranin 0,5%
- Safranin 0,5 g
- Cồn 96° 10 ml
- Nước cất 90 ml
- Dung dịch HCl 0,5% trong nước
- Dung dịch H_2SO_4 1% trong nước
- Dung dịch I
- axit tanic 5 g
- Nước cất 100 ml
- Lắc đều cho tan, sau đó vừa lắc đều vừa thử tự chỗ vào.
- FeCl_3 1,5g
- Focmôn 2 ml
- NaOH 40 %
- Dung dịch II
- AgNO_3 2 g
- Nước cất 100 ml
- Sau khi pha xong cho vào 5-6 giọt nước amoniac, lắc đều.
- Dịch Tanin
- Dung dịch Tanin 20% trong nước 10 ml
- Dung dịch FeSO_4 bão hòa trong nước 5 ml
- Dung dịch Fúcxin kiềm bão hòa trong cồn 96° 1 ml
- Trộn ba dung dịch trên, để sau 24 giờ lọc qua giấy lọc.
- Hỗn hợp Ête-cồn (1/1).
- Dung dịch Iod (I_2) đặc
- Focmôn 40% trong
- Xudan III
- Xudan III 0,05 g
- Axit lactic đặc 10 ml
- Cồn đốt
- Một số giống vi sinh vật và tiêu bản mẫu.

CÁCH SỬ DỤNG MỘT SỐ MÁY MÓC CÁCH SỬ LÝ VÀ BAO GÓI DỤNG CỤ THỦY TINH

Dụng cụ và máy móc trong phòng thí nghiệm có nhiều, nhưng một số loại thường xuyên dùng đến. Vì vậy cần phải hiểu biết và nắm vững cách sử dụng các loại máy móc đó.

Trong phòng thí nghiệm, dụng cụ thủy tinh là loại thường xuyên sử dụng đến. Việc xử lý và bao gói dụng cụ thủy tinh có liên quan trực tiếp đến kết quả của công tác. Dụng cụ thủy tinh phải được chọn đúng quy cách, bảo đảm chất lượng; phải được xử lý tốt không có lẫn tạp chất và không có vết bẩn. Bao gói dụng cụ thủy tinh phải đạt tiêu chuẩn để đạt được yêu cầu khi khử trùng và thuận tiện cho việc sử dụng.

A — CẤU TẠO VÀ XỬ DỤNG CÁC DỤNG CỤ MÁY MÓC THÔNG THƯỜNG

I — TỦ ẤM

Tủ ấm là thiết bị quan trọng trong nuôi cấy vi sinh vật vì nhiệt độ trong tủ có thể thay đổi (từ 0°C đến 56°C) tùy theo ý muốn và nhiệt độ đã được xác định trong tủ luôn luôn được giữ ở trạng thái ổn định trong suốt thời gian nuôi cấy.

1. Cấu tạo của tủ ấm.

Cấu tạo vỏ của tủ ấm có hai lớp, lớp trong là lớp kim loại dẫn nhiệt để giữ nhiệt độ bên trong của tủ, lớp ngoài là lớp kim loại dày hơn và được bọc bên trong bởi một lớp cách nhiệt. Giữa lớp trong và lớp ngoài thường là khoảng rỗng, giữ cho nhiệt độ ít biến đổi.

Trong tủ mắc bộ phận cảm ứng nhiệt để báo nhiệt độ lên xuống cho rơ-le hoạt động.

Phần ngoài của buồng ấm có lắp một hệ thống máy tự động điều chỉnh nhiệt độ theo yêu cầu của thí nghiệm. Bộ phận này bao gồm hệ thống điện tử, bán dẫn khá phức tạp.

Phía mặt ngoài của tủ có thể nhìn thấy hai núm điều chỉnh nhiệt độ, núm điều chỉnh phạm vi nhiệt độ lớn và núm điều

chỉnh phạm vi nhiệt độ nhỏ và có chốt đóng mở mạch, có nhiệt kế theo dõi nhiệt độ...

2. Cách sử dụng tủ ấm.

Sử dụng tủ ấm theo trình tự như sau:

Sau khi đóng mạch, xoay núm điều chỉnh nhiệt độ lớn cho kim chỉ đến nhiệt độ cần thiết và xoay núm điều chỉnh nhiệt độ nhỏ ở vị trí 0. Sau một thời gian nhiệt độ tăng dần và đạt tới giá trị nhiệt độ ổn định. Nếu nhiệt độ trong tủ cao hơn hoặc thấp hơn so với nhiệt độ cần thiết, thì lúc đó phải điều chỉnh núm điều chỉnh nhiệt độ nhỏ (cần giảm nhiệt độ xoay kim về phía trái; cần tăng xoay kim về phía phải) để giảm hay tăng cao nhiệt độ đến nhiệt độ cần thiết.

Ví dụ: Khi cần điều chỉnh nhiệt độ cần thiết trong tủ là 37°C thì vặn núm điều chỉnh lớn cho kim chỉ ở khắc độ 37 trên bảng chia gần bên trên núm. Sau một thời gian nhiệt độ trong tủ ổn định và chỉ ở 38°C . Như vậy sẽ vặn núm điều chỉnh nhỏ sang trái 1 độ chia trên bảng chia độ (mỗi độ chia tương ứng với 10°C). Tiếp tục theo dõi thấy nhiệt độ hạ thấp xuống $36,8^{\circ}\text{C}$ thì tiếp tục vặn núm điều chỉnh sang phải một khoảng nào đó. Tiếp tục làm như vậy cho tới khi nhiệt độ trong tủ ổn định ở nhiệt độ 37°C .

Khi đóng mạch thì đèn đỏ bật sáng. Khi nhiệt độ trong tủ đạt tới mức yêu cầu thì bộ phận cảm ứng nhiệt sẽ hoạt động và báo cho rơ-le làm việc và làm ngắt mạch, đèn xanh bật sáng (đèn đỏ tắt). Khi nhiệt độ xuống thấp, rơ-le tự động điều khiển sự đóng mạch. Quá trình sẽ tiếp diễn liên tục như vậy trong thời gian tủ làm việc để duy trì nhiệt độ.

3. Các điểm cần chú ý khi sử dụng.

— Phải xem điện thế của máy với nơi đặt máy có giống nhau không. Trường hợp không giống nhau phải dùng biến thế điện.

— Khi dùng lần đầu phải xem bộ phận điều chỉnh nhiệt độ có làm việc tốt không. Nhiệt độ trong tủ có đều không.

— Cửa tủ luôn luôn đóng kín trừ khi nào lấy hoặc cho nguyên liệu vào nuôi cấy.

— Theo dõi nhiệt độ trên nhiệt kế để điều chỉnh cho hợp với yêu cầu.

— Luôn luôn bảo đảm sạch sẽ khô ráo trong tủ. Phải luôn cho máy chạy nhất là những ngày trời ẩm.

II — NỒI HẤP KHÔ

Dùng nồi hấp khô để tiêu độc các đồ dùng thủy tinh như ống nghiệm, ống tiêm, ống hút, hộp lồng, phễu... Các đồ kim khí như dao kéo, kim, kẹp và tất cả các đồ linh tinh khác như bông, băng, vải cao su. Các môi trường nuôi cấy không khử trùng trong nồi hấp này (nồi hấp khô hình 10a).

Nguyên lý cấu tạo của nồi hấp nhiệt khô gần giống như tủ ấm, chỉ khác là nhiệt độ của tủ có thể được đưa lên khá cao. Nồi hấp có thể dùng nguồn nhiệt là điện, dầu hỏa hay than.

1. Cách sử dụng nồi hấp.

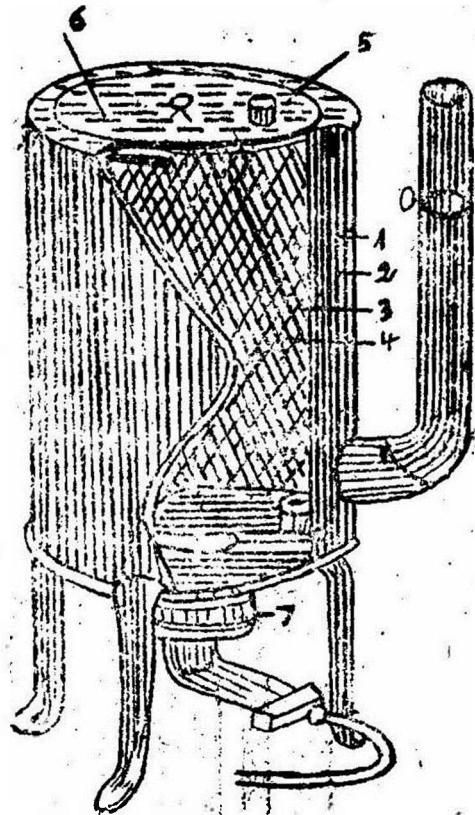
Các dụng cụ phải rửa sạch để khô, gói kỹ trước khi cho vào nồi hấp. Sau khi xếp các thứ vào trong tủ rồi đóng kín cửa. Đóng mạch điện hoặc đốt nhiên liệu. Nhiệt độ trong nồi hấp tăng cao dần. Theo dõi sự tăng nhiệt độ trên nhiệt kế cắm trên nồi hấp, nếu đạt tới nhiệt độ hấp cần thiết thì điều chỉnh việc cung cấp nguồn nhiệt để duy trì nhiệt độ này trong một thời gian cần thiết. Nếu tủ có gắn bộ phận điều chỉnh

nhiệt độ tự động như tủ ấm thì cách làm cũng gần giống như sử dụng tủ ấm. Khi đạt thời gian cần thiết thì ngắt mạch điện (hoặc cắt nguồn nhiệt) chờ nhiệt độ hạ xuống 50 — 60°C về mùa hè và 30 — 40°C về mùa đông thì mở rồi hấp để lấy dụng cụ ra. Dụng cụ lấy ra phải được đặt trên giá gỗ, trên giấy hoặc trên vải; để ở sàn gạch hay sàn xi măng sẽ làm vỡ dụng cụ.

2. Những vấn đề cần chú ý.

— Trong các nồi hấp hiện nay dùng thường có trang bị bộ phận điều chỉnh nhiệt độ tự động. Trước khi hấp chỉ việc cố định ngay nhiệt độ lúc đầu bằng núm điều chỉnh.

— Trong thời gian hấp phải luôn luôn có mặt để quan sát đèn báo hiệu và nhiệt độ trong nồi hấp để có sự điều chỉnh kịp thời.



Hình 10a — Nồi hấp khô

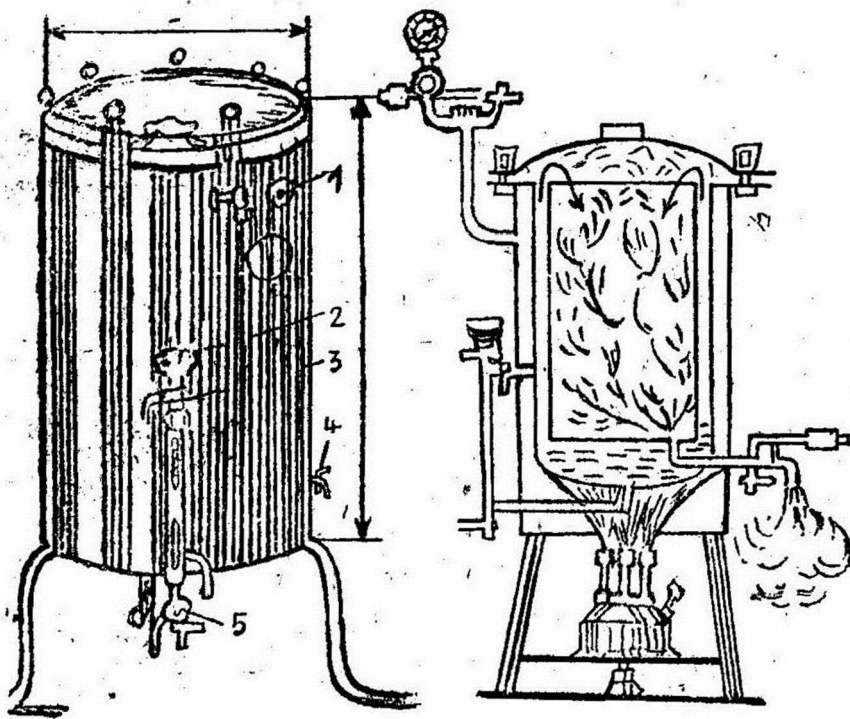
— Các dụng cụ cho vào không để sát vào thành nồi hấp. Các đồ dùng thủy tinh, sứ phải để ở dưới còn bông băng, vải thì để ở phía trên vì nhiệt độ phía dưới bao giờ cũng cao hơn phía trên. Các dụng cụ phải để quay miệng lên phía trên.

— Khi hấp dụng cụ dễ bị cháy phải theo dõi chặt nhiệt độ và thời gian hấp để tránh bị cháy vật hấp

— Sau khi hấp, dụng cụ phải được ghi rõ ngày tháng hấp. Thời gian sử dụng không được kéo dài quá 7 ngày.

III – NỒI HẤP HƠI NƯỚC CAO ÁP

Nha bào của một số loại vi khuẩn chỉ bị diệt khi hấp ướt ở nhiệt độ 120°C . Do vậy cần phải có những nồi hấp ướt dưới áp lực cao (cao hơn áp lực khí quyển) mới có nhiệt độ trên 100°C được. Hiện nay đang dùng các nồi hấp theo kiểu nồi chung Sambeclan (hình 10b).



Hình 10b: Nồi chung Sambeclan

- 1 – Áp kế
- 2 – Phểu đổ nước vào
- 3 – Khóa ống dẫn nước
- 4 – Khóa ống dẫn hơi
- 5 – Khóa thải nước ra

Cấu tạo các bộ phận của nồi hấp như ở hình vẽ. Nồi hấp cao áp thiết kế dựa trên nguyên lý về tỷ lệ thuận giữa điểm sôi và áp suất hơi nước. Khi nước trong nồi hấp (đã được đóng kín) sôi, bốc hơi nước làm cho áp suất trong nồi tăng cao dần, vượt quá áp suất khí quyển. Điểm sôi của nước cũng tăng cao dần vượt quá 100°C.

Quan hệ giữa áp lực khí chung và nhiệt độ.

Áp lực (kg/cm ²)	nhiệt độ (°C)
0	100
0,35	109
0,70	115,5
1,05	121,5
1,41	126,5
1,75	127,0
2,00	134,6

Ở áp lực 1.05 atp (điểm sôi của nước là 121,5°C) duy trì trong 15 — 20 phút, hầu như toàn bộ vi khuẩn hoặc nha bào bị tiêu diệt.

1. Phương pháp sử dụng.

— Đổ nước vào nồi hấp với lượng thích hợp (đến vạch chuẩn trên ống thủy tinh đặt dưới phễu rót nước). Đổ ít hoặc nhiều nước sẽ làm giảm hiệu quả của khử trùng.

— Các đồ dùng phải bao gói kỹ mới xếp vào nồi hấp; đồ nặng để dưới, nhỏ nhẹ để ở trên. Không nên để sát nhau quá.

— Đóng nắp nồi hấp, vặn chặt khóa; đóng van thông hơi.

— Mở mạch điện hoặc đốt nhiên liệu để đun sôi nước trong nồi. Chú ý không để nhiệt độ tăng quá nhanh sẽ gây vỡ dụng cụ thủy tinh.

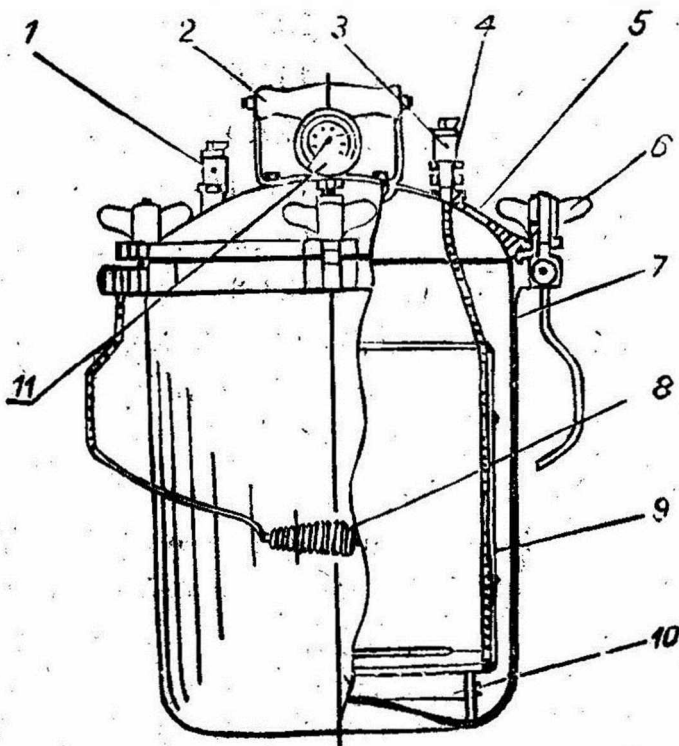
— Khi kim của áp kế chỉ đến vạch 0,5 atp thì mở van thông hơi để xả hết không khí trong nồi hơi ra làm cho trong nồi hơi nước không còn lẫn không khí nữa. Kim của áp kế trở về số 0.

— Đóng van thông hơi. Áp suất trong nồi hấp tăng dần, kim của áp kế chỉ đến 1,05 atp thì chú ý điều chỉnh nguồn nhiệt để duy trì ở trạng thái này trong thời gian cần thiết. Các nồi hấp dùng điện hiện nay có lắp bộ phận rơ-le điều chỉnh áp suất tự động, do đó trước khi hấp chỉ cần đặt ở áp suất xác định.

– Đạt tới thời gian cần thiết thì ngắt mạch hoặc cắt nguồn nhiệt. Áp suất trong nồi hạ dần, khi kim chỉ đến số 0 mới mở van thông hơi để hơi thoát hết ra ngoài. Vặn ngay ốc, mở nắp nồi hấp, lấy các đồ dùng trong nồi ra.

– Ghi ngày giờ hấp và đặt ở chỗ có lót vải hoặc bàn gỗ.

Để tạo điều kiện khử trùng thuận lợi trong mọi điều kiện và hoàn cảnh, người ta đã chế tạo ra nồi hấp xách tay đơn giản, tiện sử dụng (hình 10c).



Hình 10c

Nồi hấp xách tay

- 1) Van bảo hiểm
- 2) Tay xách bằng gỗ
- 3) Van xả hơi
- 4) Ống dẫn hơi
- 5) Nắp
- 6) Tai hông
- 7) Vỏ nồi
- 8) Quai xách
- 9) Thùng khử trùng
- 10) Giá đỡ thùng
- 11) Áp kế

2. Những điều cần chú ý.

– Khi hấp phải luôn luôn có mặt để theo dõi sự biến đổi của áp suất nồi, đặc biệt ở những nồi hấp không có bộ phận điều chỉnh tự động. Nếu vì lý do nào đó rô-le không hoạt động áp suất trong nồi tăng cao quá ảnh hưởng tới vật hấp và có thể xảy ra nổ nồi hấp.

– Tránh việc tăng giảm quá đột ngột áp suất nồi (khi tăng nhiệt ở các nồi hấp dùng than, củi, dầu hỏa hay trong trường hợp xả hơi) để giữ cho dụng cụ hay môi trường không bị ảnh hưởng.

– Hấp xong phải lấy dụng cụ ra ngay, không để trong nồi để tránh cho nắp không bị mót chặt vào doăng cao su và dụng cụ không bị ướt.

B - XỬ LÝ VÀ BAO GÓI DỤNG CỤ THỦY TINH

I - XỬ LÝ DỤNG CỤ THỦY TINH

Công tác đối với các dụng cụ thủy tinh mới, dụng cụ thủy tinh trước và sau khi làm thí nghiệm bao gồm hai công tác chính là trung tính và rửa các loại dụng cụ thủy tinh.

1. Phương pháp trung tính dụng cụ thủy tinh.

Trước hết cần phải xem dụng cụ có trung tính hay không? Phương pháp thử là lấy nước trung tính cho vào dụng cụ thủy tinh mới đem hấp ở nhiệt độ cao trong khoảng thời gian 30 phút đến 1 giờ. Lấy ra để nguội thử độ pH; nếu độ pH kiềm ($\text{pH} > 7$) thì ngâm dụng cụ vào dung dịch axit clohydric 2% trong thời gian 10 giờ. Sau thử lại nếu chưa trung tính lại tiếp hành ngâm tiếp. Nói chung dụng cụ thủy tinh đều kiềm.

2. Rửa các dụng cụ thủy tinh.

a) Dụng cụ mới:

Dùng chổi lông xát và phòng rửa sạch trong và ngoài dụng cụ. Các bình tròn hay các bình tam giác chai lọ có thể dùng bi nhỏ xát qua tro hoặc xà phòng để rửa bên trong. Rửa xong để dốc ngược cho khô nước.

b) Dụng cụ sau khi dùng:

Ống nghiệm: ống nghiệm đã dùng xong phải qua khử trùng trong nồi chung cao áp hay có thể xát trùng bằng cách ngâm trong dung dịch lyzol 2% trong 24 giờ. Đổ các vật phẩm trong ống nghiệm ra rồi ngâm vào trong nước ấm. Dùng que lấy hết vật phẩm trong ống nghiệm ra và rửa sạch bên ngoài ống bằng vải có thấm tro hoặc xà phòng. Bên trong ống có thể dùng bàn chải tròn hoặc que có vải bọc xoa xà phòng hoặc tro mịn cọ kỹ thành ống. Rửa lại hai ba lần bằng nước sạch. Nếu kiểm tra thấy sạch xếp vào giỏ lưới thép, đầu úp xuống cho hết nước. Gặp trời nắng có thể đem phơi khô nếu không nắng đợi ráo nước xong đem sấy trong tủ sấy.

Nếu rửa bằng cách trên chưa sạch có thể ngâm vào dung dịch thuốc tím (KMnO_4) 0,2% ngâm trong 1 đêm sáng hôm sau vớt ra và cho vào dung dịch HCl 0,2% để tẩy thuốc tím rửa

sạch như trên. Có thể dùng dung dịch sau để rửa. Dung dịch NaOH 4% ngâm trong 24 giờ, dung dịch HCl 0,2% ngâm trong 72 giờ dung dịch HNO₃ 20% ngâm trong 24 giờ, dung dịch Na₃PO₄ 5%, dung dịch H₂SO₄ 20% ngâm trong 24 giờ.

Ống hút (pipette) Dùng xong đem ngâm trong dung dịch Crêdin 2% hoặc ngâm trong dung dịch axit Cacbonic 5% khử trùng sau đó có thể ngâm vào dung dịch NaOH 0,4% hoặc dung dịch HgCl₂ 0,1%. Khi rửa dùng khăn xô chà phòng đánh sạch ngoài ống. Trong ống có thể dùng que nhỏ quần bông xô chà phòng để rửa

Ống hút có bầu có thể dùng bi chì nhỏ và nước xô phòng để rửa bên trong, sau đó hút dung dịch HCl 0,2% súc nhẹ và kỹ. Rửa sạch bằng nước cắm trên giá.

Hộp lồng (đĩa pettri). Để ngửa đĩa dùng vải chấm tro có xô chà phòng để rửa bên trong và các góc quanh đĩa. Úp sấp đĩa cọ sạch bên ngoài sau đó rửa lại bằng nước sạch nhiều lần đến khi xem thấy sạch rồi thì úp nghiêng chồng bên nhau vào giỏ lưới thép.

Chai lọ: Trước khi rửa đồ hết các chất còn trong chai lọ, ngâm nước một, hai ngày. Cọ xô phần bên ngoài của chai lọ trước dùng dung dịch xô phòng đặc và bi thủy tinh (hoặc đạn chì hay sạn nhỏ) súc rửa bên trong lọ nhiều lần; súc rửa lại với dung dịch HCl 0,2% sau đó dùng nước sạch súc rửa nhiều lần cho sạch, cắm chai lọ lên giá, đầu quay xuống.

Đối với các lọ đựng thuốc nhuộm thì cần ngâm trong dung dịch HCl hay cồn sau đó dùng nước để rửa sạch. Bình cầu hay bình tam giác cũng rửa như rửa chai lọ.

Phiến kính (Lame). Phiến kính có dầu trước khi rửa phải lau sạch ngâm phiến kính vào nước Crêdin 2% hoặc dung dịch axit Cacbonic 5% có thể ngâm trong dung dịch HgCl₂, 0,1% hay dung dịch lyzol 5%, đun trong nước xô phòng 5 phút, đợi nguội rửa bằng nước sạch để khô. Ngâm trong cồn 90° sau 12 giờ vớt ra lau sạch, sấy khô cất trong hộp. Có thể giữ phiến kính trong cồn khi dùng lấy ra lau khô, hơ trên lửa, như vậy tránh được bụi, phiến kính sẽ sạch hơn.

Có thể dùng dung dịch sau đây để làm sạch phiến kính

Bicromatkali (K ₂ Cr ₂ O ₇)	100g.
H ₂ SO ₄	250ml.
Nước	1000ml.

Ngâm phiến kính vào trong dung dịch này vài ngày, lấy ra rửa bằng nước sạch đun trong dung dịch nước xà phòng như trên, lấy ra rửa sạch nước, để khô. Dung dịch này có thể dùng làm nhiều lần đến khi nào oxy hóa đến màu đen thì thôi.

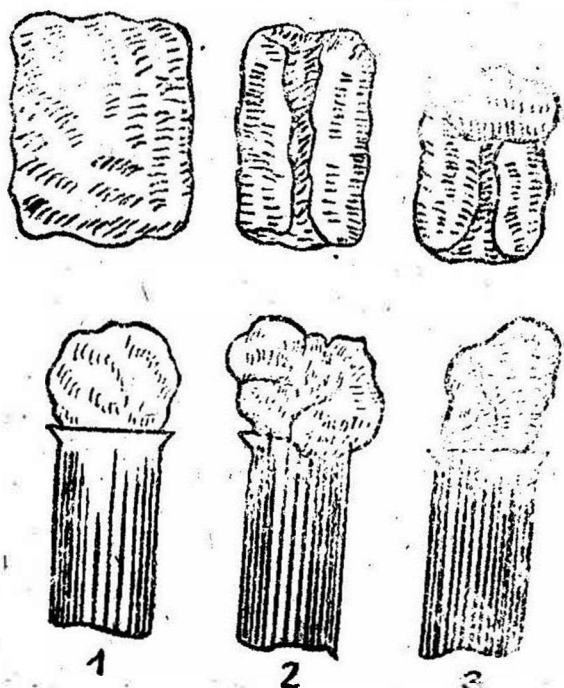
Dung dịch trên cũng có thể dùng để ngâm các dụng cụ thủy tinh khác, có tác dụng làm trong sáng thủy tinh.

II – BAO GÓI DỤNG CỤ THỦY TINH

Trước khi hấp khử trùng các dụng cụ, vật liệu thì phải tiến hành bao gói kỹ càng và đúng kỹ thuật để thuận tiện cho công tác khử trùng, tránh được hiện tượng vỡ dụng cụ hay bị nhiễm trùng lại sau khi hấp. Bao gói dụng cụ đúng kỹ thuật giúp cho quá trình thao tác thí nghiệm thuận tiện và bảo đảm vô trùng.

1. Cách làm nút bông.

Làm bằng bông không thấm nước loại sợi dài. Cắt bông thành miếng nhỏ hình vuông $7 \div 8$ cm (tùy theo đường kính miệng ống nhỏ hoặc to, có thể cắt bé hoặc to hơn) dàn thật đều, cuốn chặt từ hai góc đối xứng của hình vuông vào giữa thành một hình cuốn dài, gập hai đầu đối xứng của nó vào chính giữa tâm, sau đó lại gập đôi lại tạo thành nút bông không dài quá 4cm (hình 11) chú ý không làm nút bông chặt quá tránh vỡ ống nghiệm. Cũng không làm nút bông lỏng quá dễ gây nhiễm tạp môi trường có thể làm nút bông theo cách khác (hình 11).



Hình 11: Kết quả làm nút bông.
1 – Làm đúng
2-3 – Làm sai

Làm nút bông cho các bình lớn phải bọc thêm vải thưa hoặc gạc ở ngoài.

2. Làm nút ống hút

Dùng que nhỏ nhét vào miệng ống hút một viên bông nhỏ cách miệng ống 1 — 2cm. Không làm nút chặt quá vì sẽ khó hút các chất lên. Nếu lỏng quá nút bông có thể di động lên xuống. Nút ống hút có tác dụng ngăn ngừa các chất môi trường vào mồm và tránh nhiễm tạp từ mồm vào môi trường.

3. Bao gói dụng cụ.

Sau khi làm nút các dụng cụ phải được bao gói đúng quy cách để đem hấp.

Đối với ống nghiệm đựng môi trường sau khi làm nút bông cần dùng giấy bọc chặt phía đầu nút bông lại.

Chai lọ sau khi làm nút cũng bọc chặt phần nút bằng giấy. Hộp lồng dùng vải sạch hoặc giấy bao kín. Ống hút thì dùng những băng giấy dài quấn từ miệng xuống dưới thật kín. Có thể gói vài ống hút vào một gói. Có thể cho ống hút vào những ống giấy bồi cứng có nắp đậy để tránh được gãy và tiện dùng.

Các dụng cụ khác tùy theo yêu cầu mà có sự bao gói cho thích hợp. Nếu hấp ở nồi hấp cao áp thì không được bao gói bằng giấy thấm nước, phải dùng loại giấy dai không thấm nước.

Các dụng cụ bao gói phải thật khô, sạch, tránh vỡ trong khi hấp. Dụng cụ bao gói xong phải dán nhãn, để ngay đem hấp để tiện việc theo dõi sử dụng.

NỘI DUNG TƯỜNG TRÌNH

Quan sát và sử dụng các loại máy móc như: Tủ ẩm, tủ sấy và nồi hấp hơi nước cao áp, không xem sách, viết tóm tắt những điểm chính về thao tác sử dụng các loại máy trên.

— Thực tập cách làm nút bông và bao gói các dụng cụ thủy tinh có trong phòng thí nghiệm. Sau đó tiến hành hấp khử trùng ở trong nồi hấp khô và nồi hấp hơi nước cao áp.

— Có thể kết hợp với nội dung bài này với nội dung bài sau về làm môi trường nuôi cấy vi sinh vật và phương pháp nuôi cấy, phân lập vi sinh vật.

CHUẨN BỊ NGUYÊN LIỆU VÀ DỤNG CỤ

Dụng cụ:

Tủ ấm.

Tủ sấy; nồi hấp khô.

Nồi hấp ướt cao áp.

Thùng đựng nước.

Dụng cụ ngâm đồ thủy tinh.

Chậu rửa.

Dụng cụ thủy tinh.

Các loại chổi rửa dụng cụ thủy tinh.

Đũa tre; vải bông.

Bi thủy tinh hoặc đạn chì.

Dụng cụ để đồ thủy tinh như giá gỗ; giỏ lưới.

Nguyên liệu.

Tro sạch, xà phòng.

Dung dịch kiềm NaOH.

Dung dịch axit HCl 0,2% ; H₂SO₄ 20%.

Axit Cacbonic 5% ; HNO₃ 10%.

Dung dịch muối HgCl₂ 0,1% ; Na₃PO₄ 5%.

Dung dịch chất oxy hóa KMnO₄ 0,2% . K₂Cr₂O₇ 10%.

Dung dịch chất sát trùng Lyzol 2% ; Crêdin 2%.

BÀI 4

MÔI TRƯỜNG NUÔI CẤY VI SINH VẬT

Môi trường nuôi cấy vi sinh vật là thể lỏng hợp các chất được phối hợp và chế tạo theo yêu cầu sinh trưởng phát triển của vi sinh vật về các mặt dinh dưỡng; điều kiện và hoàn cảnh sống. Một môi trường được coi là thích hợp khi môi trường đó chứa đủ các chất dinh dưỡng cần thiết đối với hoạt động sống của một loại vi sinh vật nào đó; đồng thời những chất dinh

đưỡng này phải dễ dàng được loại vi sinh vật đó hấp thu. Và môi trường phải có điều kiện lý hóa phù hợp với điều kiện sống của vi sinh vật đó đòi hỏi như: độ pH, thế oxy hóa khử: nồng độ các chất; độ thoáng khí; sự tồn tại của chất độc hay các loại tạp khuẩn. .

A — CÁC LOẠI MÔI TRƯỜNG

I — CĂN CỨ VÀO TRẠNG THÁI VẬT LÝ CỦA MÔI TRƯỜNG

Căn cứ vào trạng thái vật lý của môi trường có thể phân môi trường thành các dạng sau đây.

1. Môi trường lỏng.

Hợp thành do sự hòa tan các chất dinh dưỡng cần thiết ở trong nước như môi trường nước thịt, nước púp tơn, nước các loại củ quả như cà rốt, xu hào, khoai tây, đậu...

2. Môi trường bán lỏng.

Trên cơ sở của môi trường lỏng cho vào một ít chất làm đông như thạch hay keo, làm cho môi trường đặc lại như có độ đông cứng kém. Môi trường bán rắn dùng để theo dõi sự di động của vi khuẩn. Môi trường này phù hợp với điều kiện sinh lý phát triển của vi khuẩn.

3. Môi trường rắn

Trên cơ sở của môi trường lỏng cho vào lượng chất làm đông rắn nhiều hơn để làm tăng độ đông cứng của môi trường. Tùy theo thực tế sử dụng người ta chế tạo thành các môi trường dạng thạch nghiêng hay thạch đĩa. Môi trường rắn được dùng trong nuôi dưỡng, giữ giống phân lập...

II — CĂN CỨ VÀO NGUỒN GỐC CÁC CHẤT DINH DƯỠNG TRONG MÔI TRƯỜNG

1. Môi trường tự nhiên.

Trong môi trường các chất dinh dưỡng được sử dụng từ nguồn gốc tự nhiên như: khoai tây, mầm thóc rỉ mật hay thịt...

trứng, sữa, huyết thanh... Thành phần hóa học của môi trường khá phức tạp, giá trị dinh dưỡng của môi trường đối với vi sinh vật tốt.

2. Môi trường tổng hợp.

Dinh dưỡng trong môi trường là sự tổng hợp của hai hay nhiều loại chất có thành phần hóa học xác định và do sự tổng hợp hóa học tạo thành (hóa chất tinh khiết) như đường glucoza; đường mantozơ; amôniasunfát, magiêsunfát...

3. Môi trường bán tổng hợp.

Thành phần các chất dinh dưỡng trong môi trường bao gồm một phần các chất hóa học với một phần các sản phẩm của tự nhiên như môi trường dùng cám có bổ xung thêm đường glucoz và amôniasunfát...

III — CĂN CỨ VÀO MỤC ĐÍCH VÀ PHƯƠNG PHÁP SỬ DỤNG

1. Môi trường cơ sở.

Môi trường phổ thông thường dùng nhất và trên cơ sở của môi trường này có thể chế ra các môi trường cần dùng khác nữa. Môi trường cơ sở thường thấy nhất là môi trường nước pépton, môi trường nước thịt pépton.

2. Môi trường phân lập.

Môi trường dùng trong phân lập vi sinh vật. Trong môi trường có chứa chất dinh dưỡng đặc trưng cho sự phát triển của một loại hình hay một nhóm vi sinh vật nào đó. Do đó giúp cho việc tách các nhóm vi sinh vật này ra khỏi một tập hợp nhiều nhóm vi sinh vật khác nhau. Trong phân lập nấm mốc có thể sử dụng môi trường Czapek hay phân lập nấm men có thể dùng môi trường Hansen.

3. Môi trường nuôi dưỡng.

Môi trường dùng để nhân giống và giữ giống. Các chất dinh dưỡng trong môi trường đủ đảm bảo cho một loại hình hay một nhóm vi sinh vật phát triển bình thường. Các chất dinh dưỡng phải đảm bảo cho sự phát triển đặc thù riêng của từng loài. Ví dụ: Nuôi cấy nấm men có thể dùng môi trường có chứa đường glucoza và các chất có chứa N khác, nhưng nuôi cấy vi trùng phải dùng môi trường có huyết thanh, thịt, gan hay các chất của nguồn động vật khác.

4. Môi trường giám định.

Dùng để nhận biết một loại hình hay một nhóm VSV. Trong môi trường ngoài những chất dinh dưỡng cơ bản còn cho thêm các chất đặc biệt như chất chỉ thị màu, chất ức chế, chất dinh dưỡng có kết cấu hóa học khác nhau. Ví dụ trong môi trường cơ sở có các loại đường khác nhau để thử khả năng lên men; môi trường thạch thì cho phép xác định được nhóm vi sinh vật có khả năng sinh H_2S ; môi trường EMB (Eosin Methylen Blen) có đường lactoz để phân biệt E.coli với Salmonella.

B — CÁCH CHẾ CÁC LOẠI MÔI TRƯỜNG

Đối với các loại môi trường khác nhau, cách chế tạo có những điểm giống nhau cơ bản, nghĩa là quy tắc chung giống nhau.

I — QUY TRÌNH CHUNG CHẾ TẠO MÔI TRƯỜNG

1. Phối hợp và hòa tan nguyên liệu.

Cân chính xác các nguyên liệu trong môi trường theo lượng đã định cho vào cốc nấu. Nếu chế môi trường lỏng thì đồng chỉnh các cho vào hỗn hợp các chất ở trên đun cho nóng chảy trong cốc nấu hoặc xoong nhôm, chú ý bổ xung lượng nước bốc hơi. Nếu chế môi trường rắn thì cân thạch ngậm vào trong nước trong vài giờ, sau đó vắt sạch nước và rửa lại bằng nước sạch 3 — 4 lần. Đong nước cho vào cốc nấu hoặc xoong nhôm, cho thạch vào đun cho chảy thạch vừa đun vừa ngoáy đều, tan thạch cho hóa chất vào.

2. Xác định độ pH.

Để kiểm tra độ pH của môi trường tốt nhất là dùng máy đo pH hoặc có thể dùng hộp so màu. Căn cứ vào độ pH đã được xác định, điều chỉnh độ pH của môi trường theo đúng yêu cầu nuôi cấy. Thông thường điều chỉnh độ pH của môi trường cao hơn so với yêu cầu một chút vì rằng theo kinh nghiệm, môi trường sau khi hấp khử trùng độ pH sẽ bị tụt xuống một ít, như môi trường (thạch rắn sau khi hấp, độ pH thấp xuống 0,4; môi trường thạch mềm pH hạ xuống 0,2, môi trường lỏng độ pH hạ xuống 0,1). Muốn điều chỉnh độ pH thường dùng dung dịch HCl, dung dịch NaOH hoặc dung dịch H_2SO_4 , dung dịch $NaHCO_3$... pha với nồng độ xác định.

3. Lọc và phân phối môi trường.

Có thể dùng giấy lọc, vải xô, bông để lọc... Với môi trường lỏng dùng ống seitz cỡ to cho ba lớp giấy lọc thường vào rồi lọc trong chân không (áp lực khoảng 1 atm hoặc dùng vải xô có lót bông để lọc. Với môi trường thạch lọc qua phễu lọc nóng có hai lớp vải xô giữa có bông để lọc.

Phân phối vào những dụng cụ cần làm, khi phân cần chú ý lượng môi trường không vượt quá tỉ lệ cho phép so với dung tích vật chứa để tránh môi trường bị trào ra ngoài. Khi hấp làm thạch nghiêng không đổ quá 1/4 dung tích của ống, làm thạch ống lượng môi trường không đổ quá 2/3 dung tích của ống, phân phối vào bình lượng môi trường không vượt quá 2/3 dung tích của bình.

4. Khử trùng.

Có nhiều phương pháp khử trùng nhưng thông thường khử trùng bằng khí trung cao áp. Các môi trường được khử trùng dưới áp lực 1 atm (120°) trong 30 phút. Có một số môi trường không khử trùng được ở nhiệt độ cao như môi trường có đường gelatin vì đường và gelatin dễ bị phá hủy ở nhiệt độ cao. Do đó cần khử trùng bằng khí chung cao áp ở nhiệt độ 115°C khoảng (0,7 atm) trong 20 phút hoặc tốt nhất dùng phương pháp hấp cách quãng (nhiệt độ 100°C trong 30 phút), trong 3 ngày liền.

5. Kiểm định.

Sau khi hấp khử trùng đặt môi trường trong tủ ấm ở 37°C thường xuyên theo dõi. Sau 24 — 48 giờ nếu không có vi khuẩn mọc thì coi như được.

6. Bảo quản.

Môi trường đã được kiểm định nếu chưa dùng ngay thì phải bảo quản ở nhiệt độ thấp và tránh ánh sáng, để làm môi trường không bị khô, bị oxy hóa hoặc có sự biến đổi về pH. Đồng thời giữ cho môi trường không bị nhiễm tạp. Nhưng chú ý là thời gian bảo quản không quá dài.

II – CÁCH CHẾ MỘT SỐ LOẠI MÔI TRƯỜNG

1. Môi trường canh thịt phổ thông.

Môi trường nước thịt pépton

Nước thịt cô đặc	500ml
Nước cất	500ml
Pépton	10g
NaCl	5g

Hỗn hợp các nguyên liệu trên đem đun sôi ở 100°C trong 5 phút để cố định phản ứng. Sửa độ pH=7,4–7,6 đun sôi ở 100°C trong 15 phút. Lọc qua vải, bông hoặc nhiều lớp vải xô. Đong vào ống nghiệm, bình hoặc lọ. Hấp khử trùng ở 120°C trong 30 phút.

Đề chế nước thịt cô đặc phải làm như sau.

Thịt bò nạc	500g
Nước cất	500gml

Thịt lọc bỏ hết gân mỡ, xay nhỏ trong cối hoặc băm nhỏ. Cân xong bỏ vào xoong nhôm, đổ nước cất vào giữ nguyên ngâm trong tủ lạnh một đêm hay trong tủ ấm 50°C khoảng 2 giờ. Sau đó đun sôi 100°C trong 30 phút để protit đông lại, khuấy đều vớt bọt đen đi. Để lắng cạn, lọc qua vải rồi phân vào dụng cụ thủy tinh. Hấp ở nồi chường cao áp 120°C trong 30 phút.

2. Môi trường canh thịt yếm khí

Thịt thái nhỏ đun sôi với nước trong 1 giờ, dùng nước rửa thật sạch, phân vào các ống nghiệm. Cho vào mỗi ống nghiệm này từ 3–5 ml nước thịt phổ thông đã chế sẵn ở trên. Đun chảy sáp, hoặc vazolin (hay dùng dầu parafin) đổ lên trên một lớp 1–2ml.

3. Môi trường thạch thường.

a) Môi trường thạch nước thịt:

Lấy môi trường nước thịt pépton đã chế được ở trên, cho vào một ít thạch sợi (cứ 100ml, môi trường cho vào 1,8 – 2,0g thạch sợi trước khi cho vào thạch phải qua xử lý. Gói thạch vào vải, ngâm nước, vắt sạch nước, rửa lại nước sạch trong 3–4 lần. Nhặt các sợi bẩn, vắt kiệt nước. Như vậy thạch được rửa sạch và được trung tính vì thạch có tính axit,

Sau khi cho thạch vào nước thịt pépton đem đun sôi 100°C trong 5 phút cho tan thạch. Quay đều sửa độ pH=7,4.

Nấu lại đến nhiệt độ 50–55°C rồi thêm lòng trắng trứng cứ 500ml môi trường cho vào 1 lòng trắng trứng (lòng trắng cho vào 15ml nước cất, đánh nhuyễn cho nổi bọt rồi mới cho vào môi trường).

Nấu ở 100°C trong 60 phút, lọc qua bông hay gạc và phân vào các dụng cụ cần dùng. Hấp khử trùng ở 120°C trong 30 phút

b) Môi trường thạch Hansen.

Nguyên liệu :

Glucos (Mantoz – saccharoz)	50g
Pépton	10g
KH_2PO_4	3g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2–5g
Thạch	20g
Nước cất	1000ml

Hỗn hợp các nguyên liệu trên (trừ thạch) trong nước. Đun sôi ở 100°C trong 5–10 phút, cho thạch đã được xử lý như trên vào khuấy đều cho tan thạch. Có thể dùng lòng trắng trứng xử lý sau đem lọc. Hấp khử trùng ở nồi chung cao áp 110°C trong 30 phút.

Các môi trường thạch trên, tùy theo mục đích sử dụng mà có thể chế thành các dạng sau đây :

Thạch nghiêng: Môi trường sau khi lọc xong phân vào các ống nghiệm, hấp khử trùng, sau khi hấp lấy các ống môi trường thạch ra xếp nằm nghiêng trên bàn 10° tạo thành mặt nghiêng từ giữa đáy ống đến cách miệng ống khoảng 3–4cm.

Thạch đĩa: Môi trường qua lọc xong phân vào bình tam giác pètri đem hấp cùng với hộp lồng (đĩa pètri) đã được bao gói sau khi hấp được lấy ra lập tức phân ngay ra các hộp lồng. Độ dày của thạch vừa phải trong khoảng 0,3 – 0,5cm. Khi phân chú ý thao tác vô trùng.

4. Môi trường thạch mềm.

Trên cơ sở môi trường lỏng ở trên cho vào lượng thạch bằng 1/4 lượng thạch cho vào để chế môi trường thạch thường.

Cách làm theo thứ tự như trên, nhưng cần chú ý là, khi hấp khử trùng xong lấy ra để đứng thẳng. Môi trường này dùng để quan sát sự di động của vi khuẩn.

NỘI DUNG THỰC TẬP VÀ TUỜNG TRÌNH

Thực tập làm môi trường thạch Hansen với các dạng môi trường thạch nghiêng, thạch đĩa. Chú ý cách bao gói để hấp khử trùng như đã học ở bài trên. Nêu tóm tắt cách làm môi trường và xác định hiệu quả khử trùng môi trường trên.

Quan sát các dạng môi trường và các loại môi trường đã được chế sẵn. Nêu rõ đặc điểm, hình dạng của từng loại môi trường.

CHUẨN BỊ NGUYÊN LIỆU VÀ DỤNG CỤ

Dụng cụ :

Cốc nấu 1000ml
Cốc nấu 250 – 500ml
Phễu thủy tinh $\Phi 10$ và $\Phi 15$
Ống nghiệm 16×160 mm
Bình tam giác 100 – 250ml
Đèn cồn
Đũa thủy tinh
Chậu thủy tinh
Hộp so màu
Hộp lồng
Ống đong 500ml
Xoong nhôm
Bếp dầu (bếp điện)
Nồi hấp khử trùng

Nguyên liệu :

Bông thấm nước
Bông không thấm nước
Vải xô
Dung dịch HCl 0.1N hoặc H_2SO_4 0,1N
Dung dịch NaOH; hoặc dung dịch $NaHCO_3$