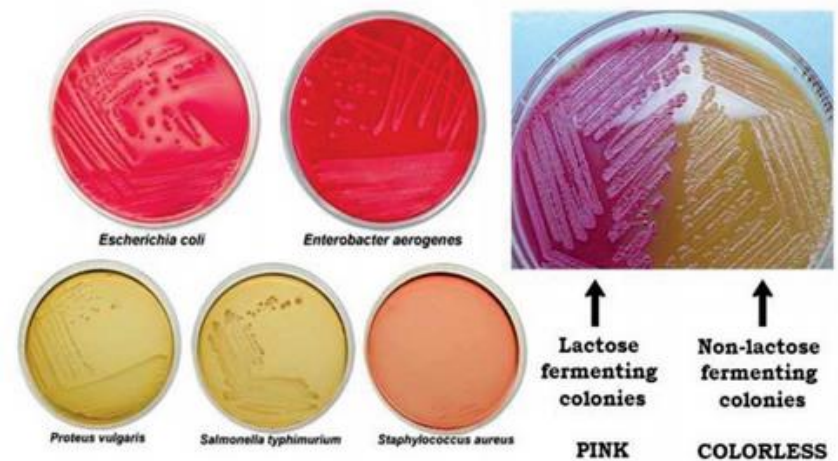


TS TRỊNH KHÁNH SƠN



CÁC KỸ THUẬT CƠ BẢN TRONG THỰC NGHIỆM VI SINH VẬT HỌC



NHÀ XUẤT BẢN
ĐẠI HỌC QUỐC GIA TP. HỒ CHÍ MINH

TS TRỊNH KHÁNH SƠN

CÁC KỸ THUẬT CƠ BẢN TRONG THỰC NGHIỆM VI SINH VẬT HỌC

NHÀ XUẤT BẢN ĐẠI HỌC QUỐC GIA
THÀNH PHỐ HỒ CHÍ MINH – 2018

LỜI NÓI ĐẦU

Cuốn sách “*Các kỹ thuật cơ bản trong thực nghiệm vi sinh vật học*” được biên soạn dành cho sinh viên hệ đại học và cao học ngành công nghệ thực phẩm, công nghệ sinh học, công nghệ chế biến thủy sản..., bao gồm một số kiến thức và hướng dẫn thao tác các kỹ thuật cơ bản và phổ biến trong thực nghiệm vi sinh vật. Với mỗi kỹ thuật, phần kiến thức lý thuyết cơ bản sẽ được trình bày một cách ngắn gọn. Tiếp theo, phần hướng dẫn thao tác sẽ được mô tả súc tích thành từng bước để người thực hiện có thể dễ dàng làm theo.

Để làm rõ những nội dung được trình bày trong sách, chúng tôi sử dụng một số hình ảnh minh họa nhằm giúp người đọc nắm bắt vấn đề một cách dễ dàng và trực quan hơn. Phần lớn các hình ảnh minh họa được trình bày và chú thích đầy đủ. Ngoài ra, nhiều thuật ngữ chuyên ngành cũng được chúng tôi sử dụng song song bằng cả tiếng Việt và tiếng Anh (in nghiêng, trong ngoặc kép), điều này giúp người đọc tránh nhầm lẫn do việc chuyển ngữ cũng như giúp người đọc có điều kiện nắm rõ hơn các thuật ngữ chuyên ngành bằng tiếng Anh.

Nội dung các bài thực nghiệm thường bao gồm 4 phần:

- (1) **Giới thiệu:** trình bày các kiến thức lý thuyết cơ bản phù hợp với nội dung bài thực nghiệm.
- (2) **Vật liệu:** các vật liệu chính cần thiết cho bài thực nghiệm.
- (3) **Cách tiến hành:** trình tự các bước thực nghiệm cùng với các lưu ý (nếu có).
- (4) **Câu hỏi kiểm tra:** nhằm hệ thống hóa các kiến thức lý thuyết và kỹ thuật thực nghiệm giúp người đọc củng cố kiến thức.

Hy vọng rằng cuốn sách sẽ thực sự hữu ích cho tất cả các bạn đọc.

Tác giả

TS Trịnh Khánh Sơn

MỤC LỤC

LỜI NÓI ĐẦU	3
MỤC LỤC	5
DANH MỤC HÌNH	7
DANH MỤC BẢNG	10
CÁC QUY ĐỊNH TRONG PHÒNG THÍ NGHIỆM VI SINH VẬT HỌC	11
AN TOÀN SINH HỌC TRONG PHÒNG THÍ NGHIỆM VI SINH VẬT HỌC	13
Chương 1: CÁC LOẠI KÍNH HIỂN VI QUANG HỌC	16
Bài 1.1: KÍNH HIỂN VI QUANG HỌC NỀN SÁNG	17
Bài 1.2: KÍNH HIỂN VI QUANG HỌC NỀN TỐI	26
Bài 1.3: KÍNH HIỂN VI TƯƠNG PHẢN PHA	29
Bài 1.4: KÍNH HIỂN VI HUỖNH QUANG	33
Chương 2: CÁC KỸ THUẬT QUAN SÁT VI SINH VẬT	36
Bài 2.1: TIÊU BẢN GIỌT TREO VÀ TIÊU BẢN GIỌT ÉP	37
Bài 2.2: TẠO VẾT BÔI VÀ NHUỘM ĐƠN	41
Bài 2.3: NHUỘM ÂM BẢN	47
Bài 2.4: NHUỘM GRAM	51
Bài 2.5: NHUỘM KHÁNG ACID (Phương pháp Ziehl-Neelsen và Kinyoun)	56
Bài 2.6: NHUỘM BẢO TỬ (Phương pháp Schaeffer-Fulton và Wirtz-Conklin)	60
Bài 2.7: NHUỘM VỎ NHẦY	64
Bài 2.8: NHUỘM TIỀN MAO (Phương pháp West và Difco's SpotTest)	68
Chương 3: CÁC KỸ THUẬT NUÔI CẤY VI SINH VẬT	73
Bài 3.1: CHUẨN BỊ MÔI TRƯỜNG NUÔI CẤY VI SINH VẬT VÀ TIỆT TRÙNG	74
Bài 3.2: CHUYỂN GIỐNG VI SINH VẬT, PHÂN LẬP VÀ BẢO QUẢN GIỐNG THUẦN KHIẾT	85

Bài 3.3: KỸ THUẬT TRÁI ĐĨA	96
Bài 3.4: KỸ THUẬT ĐỔ ĐĨA	100
Bài 3.5: KỸ THUẬT CÂY RIA	103
Bài 3.6: MÔI TRƯỜNG CHỌN LỌC VÀ MÔI TRƯỜNG CHUYÊN BIỆT	106
Bài 3.7: NUÔI CẤY VI KHUẨN KỊ KHÍ	110
Bài 3.8: ĐỊNH LƯỢNG VI KHUẨN	118
PHỤ LỤC: CÁC LOẠI DUNG DỊCH, THUỐC THỬ, THUỐC NHUỘM, MÔI TRƯỜNG.....	124
TÀI LIỆU THAM KHẢO.....	131

DANH MỤC HÌNH

Hình 1. Cách cầm và di chuyển kính hiển vi	22
Hình 2. Nguyên tắc hoạt động của kính hiển vi quang học nền sáng	23
Hình 3. Cấu tạo kính hiển vi quang học nền sáng	23
Hình 4. Cách sử dụng kính hiển vi quang học nền sáng	24
Hình 5. Ánh sáng được truyền qua tiêu bản, dầu soi kính và vật kính	24
Hình 6. Cách gắn thước đo vào thị kính	24
Hình 7. Một loại thước đo chuẩn	25
Hình 8. Cách hiệu chỉnh thước đo bằng thước đo chuẩn	25
Hình 9. Nguyên tắc hoạt động của kính hiển vi quang học nền tối	27
Hình 10. So sánh nguyên tắc hoạt động của kính hiển vi quang học nền sáng và kính hiển vi quang học nền tối	28
Hình 11. Ảnh quan sát được bằng các loại kính hiển vi quang học nền sáng (a) và kính hiển vi quang học nền tối (c)	28
Hình 12. Cấu tạo của kính hiển vi tương phản pha	31
Hình 13. Nguyên tắc hoạt động của tấm pha trong kính hiển vi tương phản pha	31
Hình 14. Ảnh quan sát được nhờ kính hiển vi quang học nền sáng (trái) và kính hiển vi tương phản pha (phải)	32
Hình 15. Đường truyền của tia sáng trong kính hiển vi tương phản pha	32
Hình 16. Cấu tạo kính hiển vi huỳnh quang	35
Hình 17. Nguyên tắc hoạt động của kính hiển vi huỳnh quang	35
Hình 18. Cách tiến hành làm tiêu bản giọt treo	39
Hình 19. Cách tiến hành làm tiêu bản giọt ép	40
Hình 20. Cách tạo vết bôi vi khuẩn	45
Hình 21. Hình dạng và cách sắp xếp tế bào vi khuẩn	46
Hình 22. Cách chuẩn bị một vết bôi mỏng và nhuộm âm bản	49

Hình 23. Ảnh nhuộm âm bản của một số vi khuẩn	50
Hình 24. Cấu tạo vách tế bào vi khuẩn Gram (+) và Gram (-)	55
Hình 25. Các giai đoạn của quá trình nhuộm Gram	55
Hình 26. Cách tiến hành nhuộm kháng acid theo phương pháp Zeihl-Neelsen	59
Hình 27. Sự hình thành nội bào tử của <i>Bacillus anthracis</i>	62
Hình 28. Cách tiến hành nhuộm nội bào tử	63
Hình 29. Hình thái của nội bào tử	63
Hình 30. Cách tiến hành nhuộm vỏ nhầy	67
Hình 31. Kết quả nhuộm vỏ nhầy theo phương pháp của Anthony	67
Hình 32. Phương pháp nhuộm tiên mao (theo phương pháp West)	71
Hình 33. Vị trí của tiên mao trên vi khuẩn	72
Hình 34. Tiêu bản nhuộm tiên mao theo phương pháp West được quan sát bằng kính hiển vi quang học nền sáng	72
Hình 35. Các hình thức môi trường nuôi cấy khác nhau với thể tích phù hợp cho mỗi loại	79
Hình 36. Bơm tiêm tự động dùng để phân phối môi trường	80
Hình 37. Một số loại màng lọc	80
Hình 38. Bộ bơm tiêm và phễu lọc cùng với màng lọc dùng để tiệt trùng một thể tích nhỏ môi trường	81
Hình 39. Autoclave loại một lớp vỏ bao	82
Hình 40. Autoclave loại hai lớp vỏ bao	82
Hình 41. Tương quan giữa nhiệt độ và áp suất trong autoclave	83
Hình 42. Chuẩn bị môi trường đĩa thạch	84
Hình 43. Pipette thủy tinh	90
Hình 44. Micropipette đơn kênh (trái) và đa kênh (phải)	90
Hình 45. Cách đọc thể tích trên pipette	91
Hình 46. Dụng cụ hút pipette (A) và các loại bầu bóp (B, C và D)	91
Hình 47. Đèn Bunsen (A) và thiết bị Bacti-Cinerator (B)	92
Hình 48. Quc cấy thẳng (a) và quc cấy vòng (b)	92

Hình 49. Kỹ thuật lấy giống và chuyển giống vô trùng	93
Hình 50. Kỹ thuật lấy giống và chuyển giống vô trùng (tiếp theo)	94
Hình 51. Các kỹ thuật cấy chuyển	95
Hình 52. Một số kiểu hình sinh trưởng của vi khuẩn	95
Hình 53. Kỹ thuật trải đĩa	98
Hình 54. Vi sinh vật được trải trên đĩa thạch	98
Hình 55. Đặc điểm của khuẩn lạc vi khuẩn trên môi trường agar được nhìn bằng mắt thường	99
Hình 56. Kỹ thuật đổ đĩa	102
Hình 57. Kỹ thuật cấy ria	105
Hình 58. Sự phát triển của các loại vi khuẩn trên môi trường Mannitol Salt agar	109
Hình 59. Sự phát triển của các loại vi khuẩn trên môi trường Eosin methylene blue agar	109
Hình 60. Sự phát triển của các loại vi khuẩn trên môi trường MacConkey's agar	109
Hình 61. Vi sinh vật được nuôi cấy trên môi trường thạch sâu	115
Hình 62. Cách chuẩn bị môi trường ống nghiệm kỵ khí Wright's	116
Hình 63. Môi trường đĩa petri Brewer's	116
Hình 64. Bình kỵ khí GasPak	117
Hình 65. Cách sử dụng túi GasPak	117
Hình 66. Quy trình định lượng vi khuẩn bằng phương pháp đổ đĩa	121
Hình 67. Thiết bị đếm khuẩn lạc Quebec	122
Hình 68. Cách pha loãng mẫu bậc hai	122
Hình 69. Nguyên tắc hoạt động của máy quang phổ kế (spectrophotometer) (phải) và cuvette chứa mẫu (trái)	123
Hình 70. Ví dụ về đường tương quan tuyến tính giữa giá trị độ hấp thu ở bước sóng 600 nm (OD600) và mật độ vi khuẩn (CFU/ml)	123

DANH MỤC BẢNG

Bảng 1. Phân loại các vi sinh vật có khả năng lây nhiễm trong phòng thí nghiệm vi sinh vật học.....	14
Bảng 2. Một số vấn đề gặp phải khi sử dụng kính hiển vi	21

CÁC QUY ĐỊNH TRONG PHÒNG THÍ NGHIỆM VI SINH VẬT HỌC

Các vi sinh vật được sử dụng trong các nội dung thí nghiệm sau đây có thể gây bệnh cho người và động vật, vì thế các quy định được đưa ra nhằm ngăn ngừa nguy cơ nhiễm bệnh cho người thực hiện. Vì lý do này, bất kỳ cá nhân nào không tuân thủ hoặc tuân thủ không đầy đủ các quy định hoặc bất kỳ cá nhân nào có khả năng gây nguy hại cho người khác đều không được phép vào phòng thí nghiệm. Khi có bất kỳ thắc mắc nào, người làm việc trong phòng thí nghiệm vi sinh phải trình bày với giảng viên đang đứng lớp hoặc cán bộ phòng thí nghiệm để có giải đáp kịp thời.

1.1. CÁC QUY ĐỊNH CHUNG

- Người làm việc trong phòng thí nghiệm vi sinh phải mặc trang phục bảo hộ (áo khoác trắng) và phải đeo băng tên.
- Sinh viên phải tham dự 100% các buổi thí nghiệm và 100% thời gian trong từng buổi thí nghiệm.
- Khi làm đổ/tràn các dung dịch hoặc làm bể dụng cụ thủy tinh, sinh viên phải báo cáo cho cán bộ phòng thí nghiệm và xin ý kiến giải quyết.
- Sinh viên phải nắm vững các thao tác vô trùng: vệ sinh và tiệt trùng (trong autoclave, 121°C trong 15-30 phút) tất cả môi trường, mẫu sinh vật và dụng cụ đã qua thao tác thí nghiệm.
- Giảm thiểu sự hình thành khí dung khi thao tác.
- Rửa tay trước và sau khi thí nghiệm.
- Không được ăn/uống trong phòng thí nghiệm.
- Không được nằm trong phòng thí nghiệm.
- Đọc kỹ và làm theo các nội quy/quy định trong bài thực hành.
- Vệ sinh bàn/ghế/kệ...và các dụng cụ trước và sau khi làm thí nghiệm.
- Đồ bỏ rác thải đúng quy trình, đúng nơi quy định.
- Không ngậm các đồ dùng (bút, mắt kính,...) trong miệng.

- Trả đầy đủ dụng cụ sau khi hoàn thành xong bài thí nghiệm (*dụng cụ đã được tiệt trùng và rửa sạch*).
- Vệ sinh phòng thí nghiệm.

1.2. CÁC YÊU CẦU AN TOÀN

- Cột tóc, mặc các trang phục bảo hộ (áo khoác trắng, găng tay chống nhiệt...) và sử dụng dụng cụ/thiết bị đúng lúc, đúng nơi.
- Nghiêm cấm dùng miệng hút pipet.

1.3. TRONG CÁC TÌNH HUỐNG KHẨN CẤP

- Lưu ý các trang bị cấp cứu khi cần (dụng cụ y tế, bình cứu hỏa, vòi nước, cầu dao điện, điện thoại và số điện thoại cấp cứu,...).
- Báo cáo các tình huống khẩn cấp ngay lập tức cho giáo viên hướng dẫn hoặc cán bộ trong phòng thí nghiệm.
- Bình tĩnh khi có tình huống khẩn cấp.

AN TOÀN SINH HỌC TRONG PHÒNG THÍ NGHIỆM VI SINH VẬT HỌC

1. GIỚI THIỆU

Trong kỷ nguyên có nhiều thay đổi hiện nay, các yếu tố sinh học gây nguy hiểm và gây bệnh đang ở mức báo động. Con người phải làm nhiều công việc tiếp xúc với các tác nhân sinh học nguy hiểm trong các phòng thí nghiệm, các cơ sở nghiên cứu...Hiện nay, người ta đã ghi nhận các nguy cơ mới về khủng bố sinh học. Vì tất cả những lý do này, những người chịu trách nhiệm quản lý các tổ chức nghiên cứu, các phòng thí nghiệm,...bắt buộc phải tiến hành đánh giá và đảm bảo tính hiệu quả của các chương trình an toàn sinh học, năng lực của nhân viên, năng lực của trang thiết bị và các công cụ quản lý để ngăn chặn và đảm bảo an ninh cho các vấn đề liên quan đến vi sinh vật. Bên cạnh đó, các nhân viên làm việc với các tác nhân vi sinh vật phải nắm rõ cách thức kiểm soát các tác nhân gây hại. Các kiến thức và các công cụ cần thiết phải được thiết lập để đảm bảo nhân viên tránh bị phơi nhiễm bởi các tác nhân gây hại nói trên.

2. CÁC TIÊU CHÍ ĐỀ THIẾT LẬP CÁC CẤP ĐỘ VỀ AN TOÀN SINH HỌC

Có bốn mức độ an toàn sinh học được thiết lập căn cứ theo các nguy cơ đó là khả năng lây nhiễm (*infectivity*), khả năng gây bệnh (*severity of disease*), khả năng truyền bệnh (*transmissibility*) và bản chất của công việc đang được tiến hành. Một trong những yếu tố nguy cơ quan trọng nữa là nguồn gốc (bản địa hoặc ngoại lai) của các tác nhân gây bệnh. Do đó, những người làm việc trong phòng thí nghiệm vi sinh phải nắm rõ các kỹ thuật thực nghiệm cơ bản và các trang thiết bị sử dụng phải phù hợp phải được sử dụng.

An toàn sinh học cấp độ 1 (*BSL-1*) là cấp độ bảo vệ cơ bản, tương ứng với các tác nhân không gây bệnh ở người bình thường. An toàn sinh học cấp độ 2 (*BSL-2*) tương ứng với các tác nhân có nguy cơ ở mức trung bình và có thể gây bệnh cho người ở nhiều mức độ khác nhau thông qua đường tiêu hóa, qua da hoặc màng nhầy. An toàn sinh học cấp độ 3 (*BSL-3*) tương ứng với các tác nhân gây bệnh có khả năng lan truyền ở dạng khí dung (*aerosol transmission*), các tác nhân gây bệnh này (có nguồn gốc bản địa hoặc ngoại lai) có khả năng gây các bệnh nguy hiểm hoặc các bệnh có thể gây chết người. An toàn sinh học cấp độ 4 (*BSL-4*) tương ứng với các tác nhân gây bệnh ngoại lai có khả năng đe dọa cao đến sự

sống bằng cách lây nhiễm qua đường khí dung và không có khả năng chữa khỏi; các tác nhân này bắt buộc phải được kiểm soát chặt chẽ trong các phòng thí nghiệm.

Các tác nhân nói ở trên bao gồm:

- 1) Các tác nhân đã được chứng minh là có khả năng gây nguy hiểm cho người làm việc trong phòng thí nghiệm khi tiếp xúc với mẫu vật có khả năng lây nhiễm.
- 2) Các tác nhân có nguy cơ cao gây ra nhiễm trùng cơ hội trong phòng thí nghiệm (LAIs, *laboratory-associated infections*) ngay cả khi chưa có trường hợp nào được ghi nhận.
- 3) Các tác nhân gây bệnh nguy hiểm hay gây nguy hiểm cho sức khỏe cộng đồng.

Cần lưu ý rằng, việc xác định cấp độ an toàn sinh học phải được căn cứ vào sự có mặt của các tác nhân gây bệnh chứ không căn cứ vào sự vắng mặt của một tác nhân nào đó.

3. CÁC TÁC NHÂN GÂY NGUY HẠI TRONG PHÒNG THÍ NGHIỆM VI SINH VẬT HỌC

Các con đường lan truyền các tác nhân gây bệnh trong phòng thí nghiệm vi sinh vật học bao gồm: (1) qua da, mắt hay màng nhầy khi tiếp xúc trực tiếp với tác nhân gây bệnh; (2) bị tổn thương bởi kim tiêm, vật sắc nhọn, bị cắn/đốt bởi động vật mang tác nhân gây bệnh hay vật trung gian truyền bệnh; (3) qua đường tiêu hóa do ăn/nuốt phải tác nhân gây bệnh hoặc qua đường tay-miệng; và (4) hít phải khí dung mang tác nhân gây bệnh.

Bảng 1. Phân loại các vi sinh vật có khả năng lây nhiễm trong phòng thí nghiệm vi sinh vật học

Nhóm nguy cơ	Đặc điểm
Nhóm 1	Không có khả năng gây bệnh trên người và động vật. Không có nguy cơ gây bệnh đến cá thể hoặc cộng đồng.
Nhóm 2	Gây bệnh cho người và động vật nhưng ở mức độ không nghiêm trọng. Có biện pháp phòng ngừa sự lây nhiễm và có các biện pháp điều trị các bệnh. Nguy cơ gây bệnh lên cá thể ở mức trung bình, nguy cơ gây bệnh trên cộng đồng thấp.

Nhóm 3	Gây bệnh nguy hiểm, có thể gây chết người và động vật. Có các biện pháp phòng ngừa sự lây nhiễm và các biện pháp điều trị bệnh. Nguy cơ gây bệnh trên cá thể cao, nguy cơ gây bệnh trên cộng đồng thấp. Không lây truyền từ cá thể này sang cá thể khác.
Nhóm 4	Gây bệnh nguy hiểm, có thể gây chết người và động vật. Thường không có biện pháp phòng ngừa hay các biện pháp điều trị bệnh. Nguy cơ gây bệnh trên cá thể và trên cộng đồng cao. Có thể lây truyền gián tiếp hoặc trực tiếp từ cá thể này sang cá thể khác.

4. XÁC ĐỊNH CÁC YẾU TỐ NGUY CƠ VÀ THIẾT LẬP BIỆN PHÁP PHÒNG NGỪA PHÙ HỢP

Đánh giá các nguy cơ về an toàn sinh học là một quy trình đòi hỏi phải xem xét về các đặc điểm nguy hại của các tác nhân và thường dựa trên những thông tin không hoàn toàn đầy đủ. Không có các chuẩn mực rõ ràng cho việc đánh giá các nguy cơ về an toàn sinh học, tuy nhiên có thể liệt kê thành năm bước cơ bản như sau:

- 1) Xác định các tác nhân nguy hại và đánh giá các nguy cơ có thể có.
- 2) Xác định các nguy cơ từ các quy trình trong phòng thí nghiệm.
- 3) Xác định chính xác cấp độ an toàn sinh học và xác định các biện pháp phòng ngừa trên căn cứ đánh giá các nguy cơ có thể có.
- 4) Đánh giá sự thông thạo của những người làm việc về kỹ năng thực hành an toàn cũng như sự sẵn có của các thiết bị an toàn trong phòng thí nghiệm vi sinh vật học.
- 5) Nhờ sự trợ giúp để xem xét lại việc đánh giá các nguy cơ có thể có từ các chuyên gia về an toàn sinh học.

Chương 1

CÁC LOẠI KÍNH HIỂN VI QUANG HỌC

Có nhiều loại kính hiển vi quang học được sử dụng trong các phòng thí nghiệm vi sinh vật, bao gồm: kính hiển vi quang học nền sáng (*bright-field microscope*), kính hiển vi quang học nền tối (*dark-field microscope*), kính hiển vi tương phản pha (*phase-contrast microscope*) và kính hiển vi huỳnh quang (*fluorescence microscope*). Kính hiển vi quang học được sử dụng để nghiên cứu về hình thái, cấu trúc, sự chuyển động của vi sinh vật cũng như các tính chất của vi sinh vật khi được nhuộm bằng các loại thuốc nhuộm khác nhau. Vì lý do đó, các kỹ năng sử dụng các loại kính hiển vi cần được tích lũy ngay từ những buổi học đầu tiên trong thực nghiệm về vi sinh vật.

Trong nội dung chương này, một số kiến thức cơ bản về kính hiển vi quang học nền sáng, kính hiển vi quang học nền tối, kính hiển vi tương phản pha và kính hiển vi huỳnh quang sẽ được trình bày. Trong đó, những nội dung có liên quan đến việc hướng dẫn cụ thể cách sử dụng các loại kính hiển vi này sẽ được trình bày chi tiết hơn để giúp người làm thực nghiệm có thể áp dụng cho các nghiên cứu cụ thể của mình.

Bài 1.1

KÍNH HIỂN VI QUANG HỌC NỀN SÁNG

1. GIỚI THIỆU

Kính hiển vi là một dụng cụ rất quan trọng trong phòng thí nghiệm vi sinh. Có nhiều loại kính hiển vi khác nhau, trong đó loại thường dùng nhất là kính hiển vi quang học nền sáng (*bright-field light microscope*) (Hình 3). Kính hiển vi này có nhiều thấu kính và có một nguồn ánh sáng trắng (Hình 2). Chúng phóng đại và chiếu sáng các vật thể nhỏ bé như vi khuẩn và các vi sinh vật khác mà chúng ta không thể nhìn thấy bằng mắt thường. Đầu tiên, ánh của vật sẽ được phóng đại khi đi qua vật kính (*objective lens*). Hầu hết các kính hiển vi quang học nền sáng hiện nay đều có ít nhất ba vật kính được gắn trên cổ quay (*rotating base*), một trong số chúng sẽ được quay để thẳng hàng với thị kính (*eyepiece, ocular lens*) và ánh của vật sẽ lại được tiếp tục phóng đại khi đi qua thị kính.

Kính hiển vi quang học nền sáng được đặt trên một chân đế (*base*) vững chắc và có một bộ phận tay cầm (*arm*) để chúng ta có thể di chuyển kính hiển vi đến vị trí khác. (Lưu ý: khi cầm hoặc mang kính hiển vi đi nơi khác, luôn phải sử dụng cả hai tay; một tay nắm lấy bộ phận tay cầm trong khi tay khác đỡ vào chân đế) (Hình 1). Không bao giờ được nhấc kính lên bằng cách nắm vào các thấu kính.

Bàn chứa tiêu bản (Hình 3) nằm giữa hệ các thấu kính bên trên và một bộ phận cung cấp ánh sáng bên dưới. Bàn chứa tiêu bản có một lỗ tròn ở vị trí trung tâm. Nó cho phép ánh sáng từ bên dưới đi xuyên qua và đến được các thấu kính bên trên. Tiêu bản cần quan sát sẽ được đặt trên bàn chứa tiêu bản, nơi mà có ánh sáng chiếu từ bên dưới tới. Nút điều chỉnh bên cạnh bàn chứa tiêu bản dùng để di chuyển tiêu bản qua trái/phải hoặc trước/sau trên bàn chứa tiêu bản. Bàn chứa tiêu bản loại này gọi là bàn chứa tiêu bản cơ khí (*mechanical stage*).

Một đèn chiếu được đặt trong chân đế (Hình 3). Ánh sáng sẽ đi xuyên qua tụ quang Abbe (*Abbe condenser*). Tụ quang có chứa các thấu kính. Chúng có tác dụng tập trung các tia sáng vào tiêu bản. Tụ quang có cửa sập (*iris diaphragm, shutter*) dùng để điều chỉnh lượng ánh sáng. Một thanh gạt (*rotating knob*) được gắn kèm theo để điều chỉnh cửa sập. Tụ quang có thể được nâng lên hay hạ xuống nhờ một nút điều chỉnh (*adjustment knob*). Khi hạ kính tụ quang xuống sẽ làm giảm lượng tia sáng chiếu vào tiêu bản (điều này thường không được thực hiện khi

nghiên cứu vi sinh vật). Cách tốt nhất là giữ tụ quang ở vị trí cao nhất và chỉ điều chỉnh lượng sáng bằng cách đóng/mở cửa sập.

Phía trên bàn chứa tiêu bản, được gắn với tay cầm, là một ống tròn (*tube*) có các thấu kính phóng đại (*Hình 3*). Bên dưới ống tròn là một cổ xoay (*rotating nosepiece*) được gắn với ba hay bốn vật kính (*objective lenses*). Khi xoay cổ xoay, một trong số các vật kính sẽ được đặt đúng vào vị trí lỗ tròn trên bàn chứa tiêu bản. Bên trên ống tròn là thị kính (*ocular lens, eyepiece*) (kính hiển vi có thể có một thị kính; loại hai thị kính cho phép chúng ta có thể nhìn bằng cả hai mắt).

Tùy loại kính hiển vi đang sử dụng mà cổ xoay và bàn chứa tiêu bản có thể được nâng lên hay hạ xuống bằng núm sơ cấp (*coarse adjustment knob*) và núm thứ cấp (*fine adjustment knob*). Trong một số loại kính hiển vi, chúng được đặt tại hai vị trí riêng hoặc sẽ được đặt cái này bên trên cái kia (*Hình 3*). Khi sử dụng phải vặn núm sơ cấp một cách nhẹ nhàng để nâng hoặc hạ bàn chứa tiêu bản. Đầu tiên, điều chỉnh cho bàn chứa tiêu bản được nâng lên tối đa gần sát với vật kính, đồng thời phải đưa mắt nhìn từ phía bên ngoài để tránh việc vật kính đâm thủng tiêu bản, từ đó làm hỏng vật kính (*Hình 3*). Núm thứ cấp sẽ làm di chuyển bàn chứa tiêu bản một cách rất chậm chạp vì vậy không thể thấy sự di chuyển này khi nhìn bên ngoài. Ta sử dụng núm thứ cấp khi mắt đang nhìn vào thị kính và điều chỉnh nhẹ nhàng để chỉnh rõ nét ảnh đang quan sát.

Lưu ý chỉ được hạ bàn chứa tiêu bản đi xuống khi đưa mắt vào quan sát ở thị kính để tránh trường hợp vật kính đâm thủng tiêu bản; chỉ khi người kỹ thuật viên quan sát từ bên ngoài mới cho phép nâng bàn chứa tiêu bản lên (*Hình 3*). Khi xoay núm thứ cấp quá nhanh có thể làm cho núm xoay bị kẹt cứng, khi đó không được cố xoay tiếp mà phải thông báo ngay cho giáo viên hướng dẫn.

Tổng số lần phóng đại tùy thuộc vào vật kính và thị kính đang dùng. Nhìn vào thị kính, chúng ta sẽ thấy ký hiệu “10×”, có nghĩa là phóng đại 10 lần. Nhìn vào các vật kính sẽ thấy ký hiệu “4×”, “10×”, “40×” và “100×”, tương ứng với độ phóng đại 4, 10, 40, và 100 lần. Vật kính *low-power* còn được gọi là vật kính 10× hay 16 mm. Vật kính *high-dry (high-power)* còn được gọi là vật kính 40× hay 4 mm. Vật kính dầu còn gọi là vật kính 90×, 100× hay 1.8 mm. Khi độ phóng đại tăng, kích thước của đầu vật kính sẽ nhỏ dần và cho phép ít ánh sáng đi qua. Đó là lý do mà người sử dụng kính hiển vi cần phải điều chỉnh vị trí của tụ quang và cửa sập chắn sáng khi dùng các vật kính khác nhau để có thể nhìn tiêu bản được rõ ràng hơn. Tụ quang tập trung ánh sáng lên một vùng nhỏ bên trên bàn chứa tiêu bản, còn cửa sập điều chỉnh lượng sáng đi vào tụ quang. Khi sử dụng dầu soi kính thì dầu soi kính sẽ được đặt ở

vị trí giữa tiêu bản và vật kính. Do dầu soi kính có tác dụng khúc xạ giống như thủy tinh nên sẽ giảm thiểu lượng tia sáng bị mất đi (*Hình 5*). Dầu soi kính giúp cải thiện độ phân giải của ảnh được phóng đại và làm cho ảnh sắc nét hơn. Dầu soi kính ngăn cản sự tán xạ của ánh sáng (làm ánh sáng đi lệch ra khỏi vật cần quan sát) và giúp điều chỉnh ánh sáng đi thẳng vào vật kính. Cần lưu ý rằng, độ phóng đại càng cao thì cường độ ánh sáng càng phải lớn. Tuy nhiên, cường độ sáng còn phụ thuộc vào mật độ của mẫu. Chẳng hạn như với mẫu nhuộm màu sẽ cần cường độ sáng lớn hơn mẫu không nhuộm màu.

Thị kính được đặt trên đầu của một ống kim loại sẽ phóng đại ảnh được truyền từ vật kính. Kết quả là độ phóng đại chung nhận được sẽ là tích số độ phóng đại của vật kính với độ phóng đại của thị kính. Ví dụ, khi sử dụng thị kính 10× và vật kính 100× thì độ phóng đại chung là $10 \times 100 = 1000$ lần.

Độ dài tiêu cự (*focal length*) của một vật kính tỷ lệ với đường kính của vật kính đó. Lưu ý, trước khi chỉnh một vật kính sang vị trí thẳng đứng với lỗ tròn trên bàn chứa tiêu bản, phải đảm bảo vật kính sẽ không đâm thủng tiêu bản. Nếu chưa chắc chắn, tốt nhất nên hạ bàn chứa tiêu bản xuống tận dưới cùng trước khi chuyển sang sử dụng một vật kính khác.

Lưu ý sử dụng một mảnh vải mềm và sạch để lau nhẹ nhàng các thấu kính và phía trên tụ quang khi chúng bị bám bụi. Chỉ duy nhất nhân viên phòng thí nghiệm mới được lấy vật kính hay thị kính ra khỏi kính hiển vi (vì một lý do nào đó). Chỉ những người đã học cách sử dụng mới được dùng kính hiển vi.

Trong một số trường hợp, nhà nghiên cứu cần phải đo kích thước vi sinh vật đang được quan sát bằng kính hiển vi quang học. Thước đo (*ocular micrometer*) là một phiên kính nhỏ có thang đo trong khoảng từ 0-100 được gắn vào thị kính của kính hiển vi (*Hình 6*). Sử dụng thước đo chuẩn (*stage micrometer*) (*Hình 7*) đặt vào bàn chứa tiêu bản của kính hiển vi để tiến hành hiệu chỉnh sao cho các vạch 0 (bên trái) trên thước đo trùng với một vạch trên thước đo chuẩn. Theo *Hình 8*, khoảng cách giữa hai vạch nhỏ nhất trên thước đo chuẩn là 0.01 mm. Trong đó, 40 vạch trên thước đo tương ứng với 10 vạch trên thước đo chuẩn. Như vậy, khoảng cách giữa hai vạch nhỏ nhất trên thước đo tương ứng với $0.01 \text{ mm} \times 10/40 = 0.025 \text{ mm} = 25 \text{ }\mu\text{m}$. Cần phải lưu ý rằng, vi sinh vật trên các tiêu bản được làm khô, cố định bằng nhiệt, hoặc trên các vết bôi đã được nhuộm có kích thước bị giảm đi từ 10 đến 20% so với khi còn ở trạng thái sống. Do vậy, khi cần đo kính thước của vi sinh vật, nên sử dụng tiêu bản giọt ép là tốt nhất.

2. VẬT LIỆU

- Kính hiển vi quang học nền sáng.
- Dầu soi kính.
- Tiêu bản nhuộm của một số giống vi khuẩn (hình cầu, hình que...), nấm mốc, nấm men, tảo, động vật nguyên sinh.
- Phiến kính hình chữ nhật (*glass slide*) và phiến kính hình vuông (*coverslips*).

3. THỰC HÀNH TRÊN KÍNH HIỂN VI QUANG HỌC NỀN SÁNG VỚI TIÊU BẢN

- 1) Phòng thí nghiệm sẽ cung cấp cho sinh viên một tiêu bản nhuộm đơn nấm men (*Saccharomyces cerevisiae*). Tế bào nấm men đủ lớn để sinh viên có thể quan sát dễ dàng với vật kính *low-power*. Với các vật kính có độ phóng đại lớn hơn, sinh viên có thể quan sát thấy những cấu trúc khác của tế bào nấm men. Sinh viên chưa cần phải quan tâm đến hình thái của vi sinh vật trong phần thực hành này.
- 2) Đặt tiêu bản lên bàn chứa tiêu bản và kẹp lại chắc chắn. Đặt tiêu bản ở vị trí sao cho tia sáng đi từ tụ quang xuyên qua trung tâm phần được nhuộm màu.
- 3) Đặt vật kính *low-power* vào vị trí thẳng đứng và đưa bàn chứa tiêu bản thật gần vật kính. Lưu ý: quan sát từ phía bên ngoài.
- 4) Đặt mắt vào thị kính để quan sát. Nếu sử dụng loại kính đơn trông (*monocular scope*), sinh viên phải mở cả hai mắt (sinh viên sẽ làm quen dần với việc chỉ tập trung vào ảnh đang quan sát trong kính hiển vi thay vì các ảnh khác bên ngoài). Nếu sử dụng loại kính hai trông (*binocular scope*), sinh viên hiệu chỉnh hai trông kính qua lại để khi nhìn vào thị kính chỉ thấy một thị trường duy nhất. Phải đảm bảo tụ quang đang ở vị trí cao nhất và chỉnh cửa sập sao cho ánh sáng xuyên qua là vừa đủ sáng để quan sát. Hạ bàn chứa tiêu bản xuống từ từ bằng nút sơ cấp cho đến khi thấy những vật thể có màu xuất hiện trong thị trường.
- 5) Sử dụng nút thứ cấp để chỉnh cho ảnh rõ nét nhất. Di chuyển tiêu bản theo hướng tới/lui và trái/phải. Vật kính *low-power* cho một cái nhìn toàn cảnh về tiêu bản và giúp sinh viên lựa chọn một thị trường (vùng quan sát được) vừa ý. Để quan sát rõ hơn cần phải chuyển sang một độ phóng đại cao hơn.

- 6) Khi đã lựa chọn được thị trường vừa ý, xoay vật kính *high-dry* vào vị trí thẳng đứng. Nếu độ sắc nét của ảnh chưa đạt, sinh viên chỉnh lại bằng nút thứ cấp. Nếu không thấy ảnh trong thị trường, sinh viên hãy nhìn từ bên ngoài đồng thời quan sát và chỉnh cho vật kính gần sát vào tiêu bản (không được chạm vào tiêu bản). Sau đó nhìn vào thị kính, chỉnh cho bản chứa tiêu bản hạ xuống từ từ, đầu tiên bằng nút sơ cấp, sau đó bằng nút thứ cấp cho đến khi ảnh rõ nét nhất. Lưu ý: sinh viên cần so sánh về cấu trúc của ảnh quan sát được ở các độ phóng đại khác nhau.
- 7) Di chuyển vật kính *high-dry* sang một tư thế hơi nghiêng một chút rồi nhỏ một giọt dầu soi kính lên trên tiêu bản. Sinh viên quan sát từ bên ngoài và chuyển vật kính dầu sang vị trí thẳng đứng (tránh để chạm vào tiêu bản). Sử dụng nút thứ cấp để chỉnh ảnh cho rõ nét.
- 8) Ghi nhận lại ảnh quan sát được bằng cách vẽ vào trong một hình tròn một số tế bào vi sinh vật mà sinh viên nhìn thấy (hoặc chụp ảnh).
- 9) Sau khi hoàn tất việc quan sát, lấy tiêu bản ra khỏi kính hiển vi (không được để dầu soi kính dính vào vật kính *high-dry*).

Bảng 2. Một số vấn đề gặp phải khi sử dụng kính hiển vi

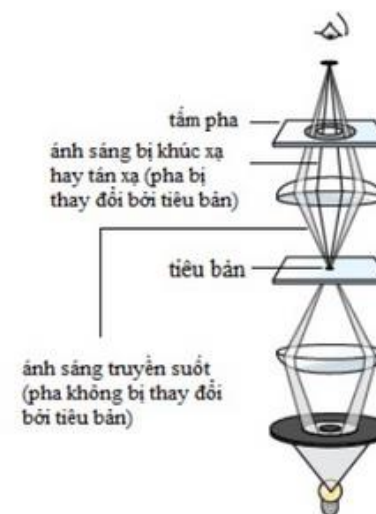
Vấn đề gặp phải	Cách xử lý
1. Không đủ ánh sáng khi nhìn vào thị kính	- Nâng tụ quang lên - Mở cửa sập - Kiểm tra lại tiêu bản: đặt sai vị trí - Lau nhẹ nhàng vật kính và thị kính
2. Bụi hay sợi vải được nhìn thấy trong thị trường	- Gây ra bởi các bọt khí trong dầu soi kính; kiểm tra lại tiêu bản
3. Những hạt nhỏ di chuyển trong một thị trường mờ	- Phải chắc rằng đang sử dụng vật kính dầu chứ không phải là vật kính <i>high-dry</i> - Đảm bảo rằng dầu soi kính đang ngập trong dầu

4. CÂU HỎI KIỂM TRA

- 1) Tại sao vật kính *low-power* (10×) luôn phải đặt ở vị trí thẳng hàng với thị kính khi không sử dụng hoặc khi di chuyển kính hiển vi?
- 2) Tại sao đầu soi kính cần phải được sử dụng khi sử dụng vật kính 90× hay 100×?
- 3) Chức năng của bộ tụ quang và cửa sập là gì? Cửa sập tương ứng với bộ phận nào trong mắt của người?
- 4) Trong các nghiên cứu về vi sinh vật học, vật kính thường dùng là loại nào? Giải thích?
- 5) Với vật kính 40×, nếu thị kính 5× được sử dụng thay cho thị kính 10× thì ảnh của vật sẽ được phóng đại bao nhiêu lần?
- 6) Liệt kê các bộ phận của kính hiển vi quang học nền sáng. Làm thế nào để đạt được độ phóng đại và độ phân giải mong muốn?
- 7) Tại sao cần phải hiệu chỉnh lại thước đo khi thay đổi vật kính?
- 8) Tại sao khi xác định kích thước của vi sinh vật nên sử dụng tiêu bản giọt ép?
- 9) Thước đo chuẩn là gì?



Hình 1. Cách cầm và di chuyển kính hiển vi



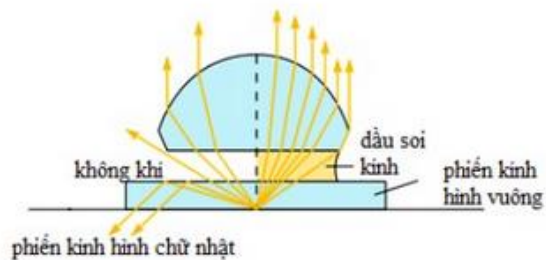
Hình 2. Nguyên tắc hoạt động của kính hiển vi quang học nền sáng



Hình 3. Cấu tạo kính hiển vi quang học nền sáng



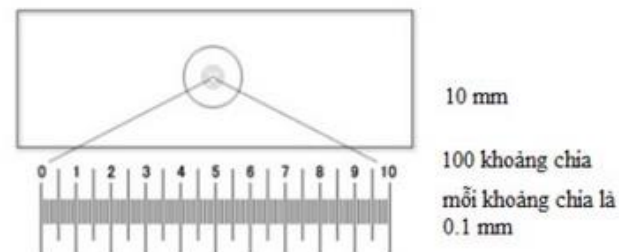
Hình 4. Cách sử dụng kính hiển vi quang học nền sáng để quan sát tiêu bản



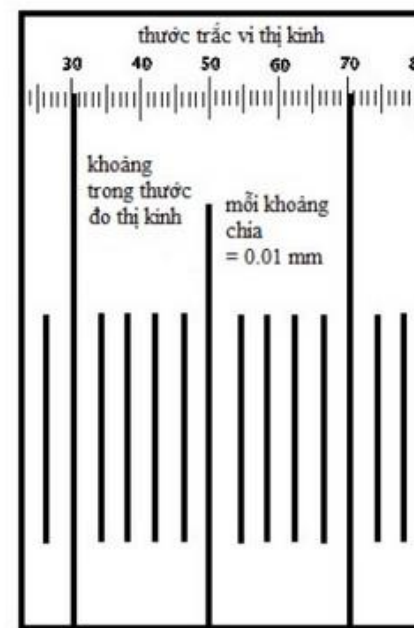
Hình 5. Ánh sáng được truyền qua tiêu bản, dầu soi kính và vật kính



Hình 6. Cách gắn thước đo vào thị kính



Hình 7. Một loại thước đo chuẩn



Hình 8. Cách hiệu chỉnh thước đo bằng thước đo chuẩn

Bài 1.2

KÍNH HIỂN VI QUANG HỌC NỀN TỐI

1. GIỚI THIỆU

Kính hiển vi có thể được trang bị một tụ quang nền tối (*dark-field condenser*) có khẩu độ (độ phân giải) lớn hơn vật kính. Bộ tụ quang của kính được trang bị bộ chặn sáng (*dark-field stop, light ring/mask, light stop*) (Hình 9). Ánh sáng đi xuyên qua tiêu bản thì bị tán xạ và đi vào vật kính. Trong khi đó, phần ánh sáng không bị tán xạ sẽ không đi vào vật kính. Kết quả là có một ánh sáng hiện ra trên nền tối. Do bởi ánh của mẫu cần quan sát hiện ra trên nền tối nên có thể quan sát được ảnh rất rõ ràng. Kính hiển vi quang học nền tối rất hữu dụng khi dùng để quan sát các vi sinh vật sống (không nhuộm màu) hoặc các vi sinh vật khó bắt màu với thuốc nhuộm hoặc các xoắn khuẩn, những mẫu mà rất khó quan sát khi sử dụng kính hiển vi quang học nền sáng (Hình 11).

2. VẬT LIỆU

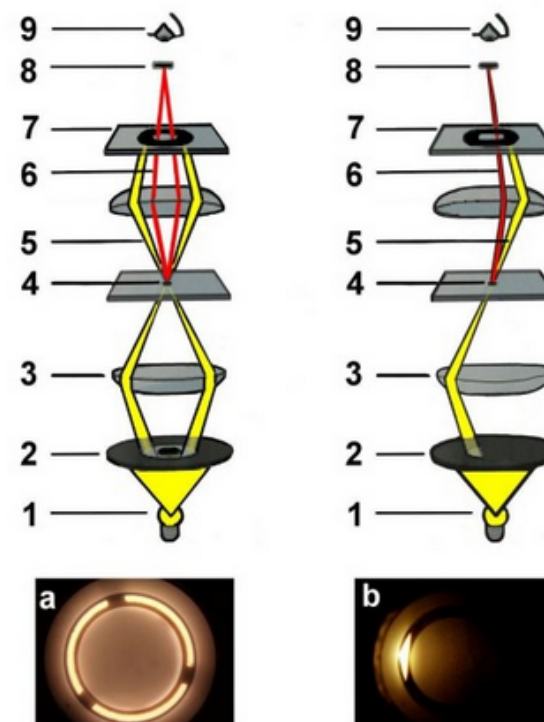
- Kính hiển vi quang học nền tối.
- Dầu soi kính.
- Phiến kính hình chữ nhật và phiến kính hình vuông.
- Tiêu bản chuẩn bị sẵn: xoắn khuẩn (ví dụ *Treponema denticola*), động vật nguyên sinh,...

3. CÁCH TIẾN HÀNH

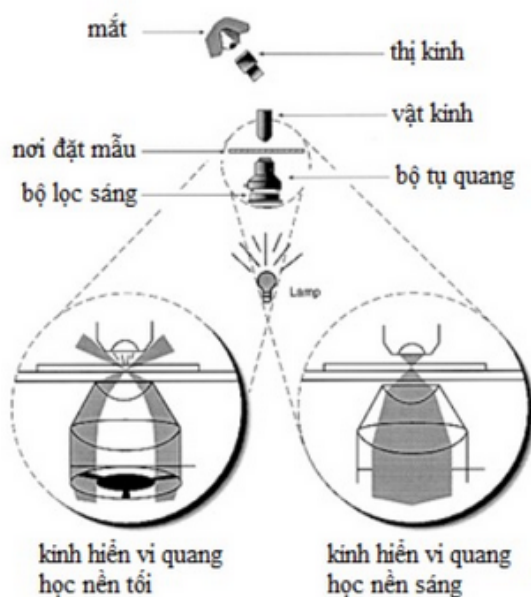
- 1) Nhỏ một giọt dầu soi kính trực tiếp lên ống kính của bộ tụ quang nền tối (*dark-field condenser lens*) (Hình 9, 10).
- 2) Đặt phiến kính chứa tiêu bản chuẩn bị sẵn lên vị trí đặt tiêu bản ngay chỗ có luồng sáng.
- 3) Nâng bộ tụ quang lên để giọt dầu soi kính vừa chạm vào phiến kính chứa tiêu bản.
- 4) Sử dụng vật kính 10×, chỉnh nút sơ cấp và thứ cấp để nhìn rõ ảnh. Sau đó chuyển sang vật kính 40× hoặc 100×, chỉnh nút sơ và thứ cấp để nhìn rõ ảnh. Chụp ảnh tiêu bản.

4. CÂU HỎI KIỂM TRA

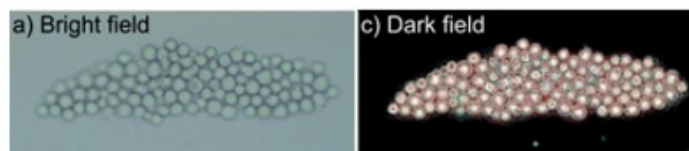
- 1) Nêu nguyên tắc hoạt động của kính hiển vi quang học nền tối.
- 2) Khi nào chúng ta nên sử dụng kính hiển vi quang học nền tối?
- 3) Khi sử dụng kính hiển vi quang học nền tối để quan sát tiêu bản, tại sao ảnh có màu sáng còn nền xung quanh có màu tối?



Hình 9. Nguyên tắc hoạt động của kính hiển vi quang học nền tối
(1: nguồn sáng; 2: bộ chặn sáng; 3: tụ quang; 4: mẫu; 5: lỗ sáng; 6: tia sáng bị bẻ cong bởi mẫu; 7: bộ chặn tia hình vành khăn; 8: thị kính; 9: mắt)



Hình 10. So sánh nguyên tắc hoạt động của kính hiển vi quang học nền sáng và kính hiển vi quang học nền tối



Hình 11. Ảnh quan sát được bằng các loại kính hiển vi quang học nền sáng (a) và kính hiển vi quang học nền tối (c)

Bài 1.3

KÍNH HIỂN VI TƯƠNG PHẢN PHA

1. GIỚI THIỆU

Khi sử dụng kính hiển vi quang học nền sáng hay kính hiển vi quang học nền tối, hầu như chúng ta rất khó khăn để quan sát được những tế bào vi sinh vật không màu, trong suốt cũng như các bào quan bên trong tế bào của chúng bởi vì chúng không hấp thụ, phản xạ, khúc xạ hoặc nhiễu xạ đủ lượng ánh sáng để có thể phân biệt rõ với môi trường xung quanh hoặc những phần còn lại của tế bào. Vi sinh vật và các bào quan của chúng chỉ có thể nhìn thấy được khi chúng hấp thụ, phản xạ, khúc xạ hoặc nhiễu xạ lượng ánh sáng nhiều hơn môi trường xung quanh. Kính hiển vi tương phản pha (*phase-contrast microscope*) (Hình 12, 14, 15) cho phép quan sát được vi sinh vật mà không cần nhuộm màu.

Trong kính hiển vi tương phản pha, có bộ tụ quang với một màn chắn hình khuyên (*annular diaphragm, condenser annulus*) giúp tạo vùng tia sáng hình nón rộng; vật kính có một đĩa thủy tinh (tấm pha, *phase plate*) có tráng một màng mỏng vật liệu trong suốt cho phép làm rõ sự thay đổi pha của tiêu bản. Pha của tiêu bản thay đổi là do sự khác biệt về cường độ sáng. Có hai loại tấm pha (Hình 13): (a) với tấm pha dương (*positive phase plate*) chúng ta sẽ có kính hiển vi đảo pha tối (*dark-phase-contrast microscope*); (b) với tấm pha âm (*negative phase plate*) chúng ta sẽ có kính hiển vi đảo pha sáng (*bright-phase-contrast microscope*).

2. VẬT LIỆU

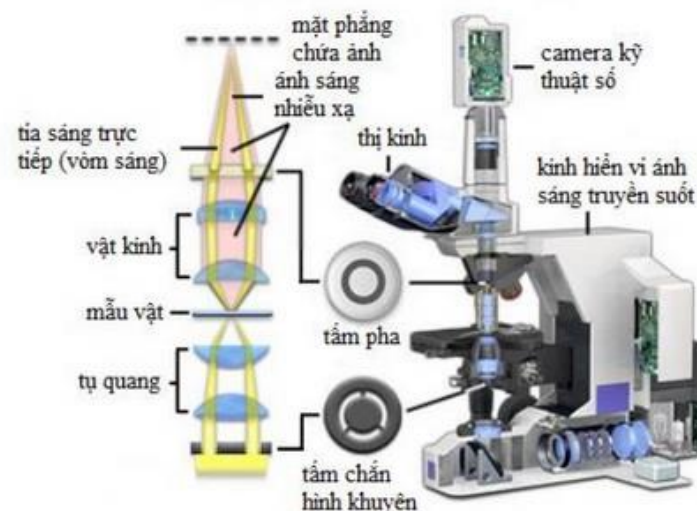
- Kính hiển vi tương phản pha.
- Phiến kính hình chữ nhật và phiến kính hình vuông.
- Pipette.
- Nhíp.
- Methyl cellulose (Protoslo, Carolina Biological Supply).
- Nước ao hồ.
- Tiêu bản chuẩn bị trước của *Bacillus* và *Clostridium* có nội bào tử.

3. CÁCH TIẾN HÀNH

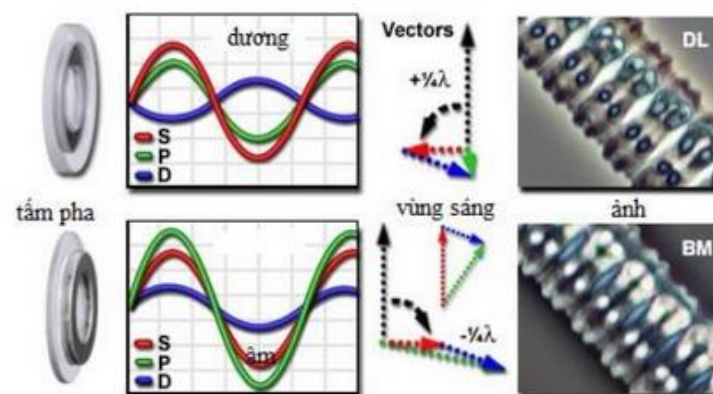
- 1) Làm tiêu bản giọt ướt mẫu nước ao hồ: nhỏ một giọt methyl cellulose (Protoslo) để làm chậm sự di động của vi sinh vật.
- 2) Chuẩn bị tiêu bản giọt ép của *Bacillus* hoặc *Clostridium*.
- 3) Đặt phiến kính chứa tiêu bản lên bàn chứa tiêu bản của kính hiển vi tương phản pha đúng vị trí có tia sáng truyền qua (Hình 12).
- 4) Đặt vật kính 10× vào vị trí quan sát. Nhất thiết chụp hình trụ của tia sáng tạo bởi màng chắn hình khuyên bên dưới bộ tụ quang phải hội tụ chính xác trên tấm pha của vật kính. Có ba loại màng chắn hình khuyên phù hợp với tấm pha của ba loại vật kính (10×, 40× và 90× hay 100×). Có một bộ phận bên dưới bộ tụ quang chứa một đĩa có thể xoay để đặt màng chắn hình khuyên vào đúng vị trí.
- 5) Chính tiêu cự bằng vật kính 10× để quan sát vi sinh vật.
- 6) Tiếp tục sử dụng vật kính 40× để quan sát.
- 7) Tiếp tục sử dụng vật kính 100× và đầu soi kính để quan sát. Chụp ảnh tiêu bản.

4. CÂU HỎI KIỂM TRA

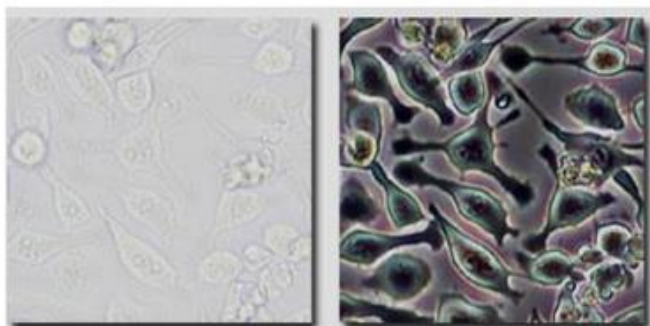
- 1) Trong kính hiển vi tương phản pha, màng chắn hình khuyên đóng vai trò gì?
- 2) Trong trường hợp nào chúng ta có thể sử dụng kính hiển vi tương phản pha để quan sát vi sinh vật?
- 3) Giải thích vai trò của tấm pha trong kính hiển vi tương phản pha và cách để quan sát một ánh sáng trên một nền tối?
- 4) Việc sử dụng tấm pha dương và tấm pha âm tạo sự khác biệt như thế nào đến ảnh quan sát được khi sử dụng kính hiển vi tương phản pha? Lý do của sự khác biệt này?
- 5) Nêu rõ ưu điểm của kính hiển vi tương phản pha so với kính hiển vi quang học nền sáng?
- 6) Kính hiển vi đảo pha tối và kính hiển vi đảo pha sáng khác nhau như thế nào?
- 7) Thuật ngữ “pha” (phase), trong nguyên tắc hoạt động của kính hiển vi tương phản pha có nghĩa gì?



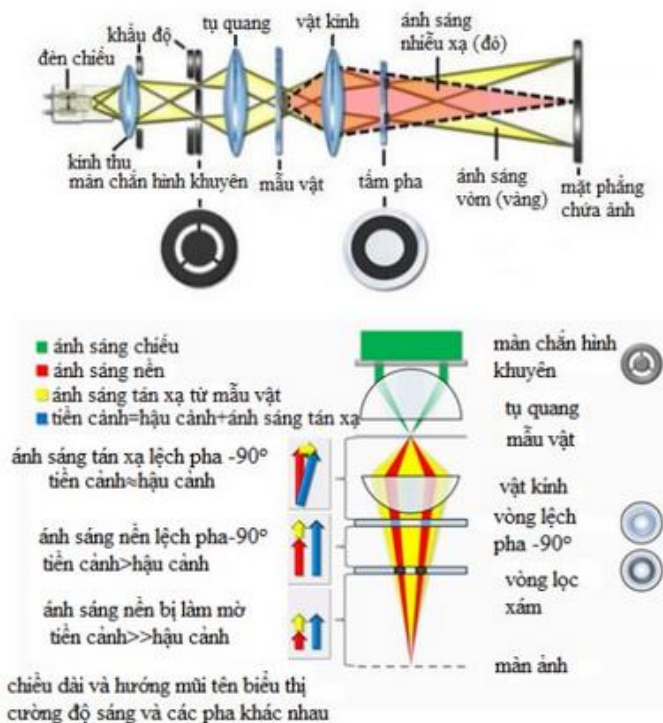
Hình 12. Cấu tạo của kính hiển vi tương phản pha



Hình 13. Nguyên tắc hoạt động của tấm pha trong kính hiển vi tương phản pha



Hình 14. Ảnh quan sát được nhờ kính hiển vi quang học nền sáng (trái) và kính hiển vi tương phản pha (phải)



Hình 15. Đường truyền của tia sáng trong kính hiển vi tương phản pha

Bài 1.4

KÍNH HIỂN VI HUỖNH QUANG

1. GIỚI THIỆU

Kính hiển vi huỳnh quang (Hình 16) là một loại kính hiển vi quang học sử dụng tia huỳnh quang (*fluorescence*) hoặc lân quang (*phosphorescence*) để nghiên cứu các tính chất của các chất hữu cơ hoặc vô cơ. Kính hiển vi huỳnh quang là những loại kính hiển vi sử dụng ánh sáng huỳnh quang để quan sát ảnh của vật, ví dụ như kính hiển vi đồng tiêu (*confocal microscopy*) hoặc kính hiển vi epifluorescence.

Tiêu bản được chiếu sáng bởi các tia sáng có bước sóng đặc biệt có thể được hấp thụ bởi các chất huỳnh quang (*fluorophores*). Các tia sáng phản quang sẽ có bước sóng dài hơn (có màu khác bước sóng mà tiêu bản hấp thụ). Ánh sáng chiếu tới tiêu bản sẽ được phân tách với ánh sáng huỳnh quang phản quang từ tiêu bản bằng một bộ lọc quang phổ (*spectral emission filter*) (Hình 17). Kính hiển vi huỳnh quang thông dụng nhất là loại kính hiển vi epifluorescence. Các loại kính hiển vi huỳnh quang khác có nhiều ưu điểm vượt trội hơn có thể kể đến là kính hiển vi đồng tiêu (*confocal microscopy*) hoặc kính hiển vi TIRF (*total internal reflection fluorescence microscope*).

Hai loại thuốc nhuộm huỳnh quang phổ biến là: (a) DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole), thuốc nhuộm gắn vào vùng giàu A-T của DNA; (b) Propidium-iodine, một loại thuốc nhuộm DNA không thấm qua màng tế bào, dùng để phân biệt tế bào sống hay chết vì thuốc nhuộm này không thấm được qua màng tế bào nguyên vẹn.

2. VẬT LIỆU

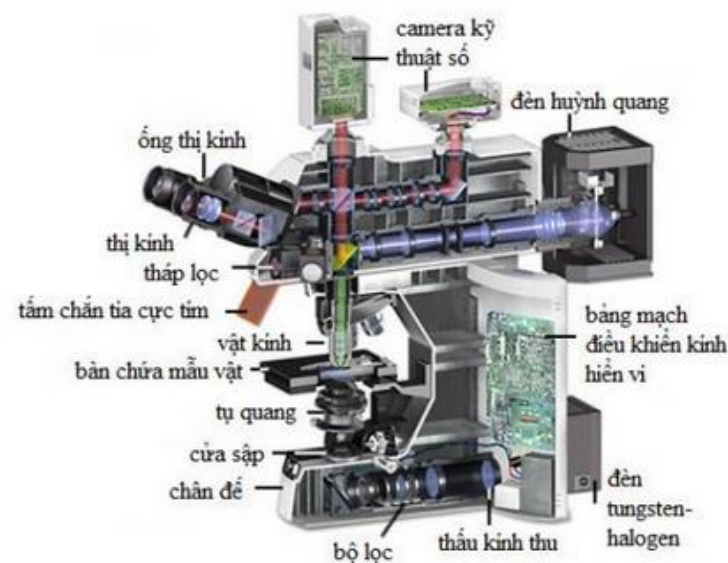
- Kính hiển vi huỳnh quang.
- Kính bảo hộ chống tia UV.
- Dầu soi kính có chỉ số huỳnh quang thấp.
- Tiêu bản một số vi khuẩn đã được nhuộm với thuốc nhuộm huỳnh quang.

3. CÁCH TIẾN HÀNH

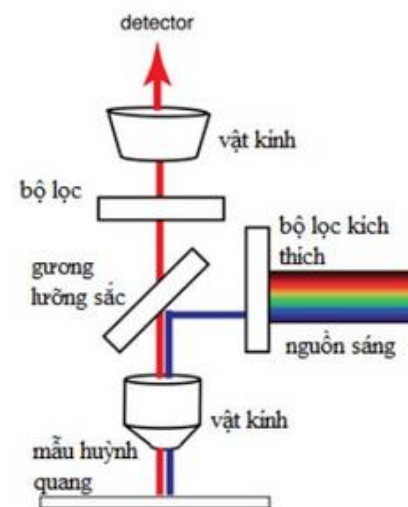
- 1) Bật nguồn sáng tia UV 30 phút trước khi sử dụng kính hiển vi huỳnh quang (Hình 16). Lưu ý, luôn sử dụng kính bảo hộ chống tia UV khi sử dụng kính hiển vi huỳnh quang vì tia UV có thể làm tổn thương võng mạc và gây mù.
- 2) Đảm bảo rằng các bộ lọc phù hợp đã được gắn đúng vị trí.
- 3) Nhỏ một giọt dầu soi kính có chỉ số huỳnh quang thấp lên bộ tụ quang. Lưu ý không sử dụng dầu soi kính thông thường khi quan sát mẫu bằng kính hiển vi huỳnh quang.
- 4) Đặt tiêu bản vào bộ chứa tiêu bản (stage) nơi có ánh sáng truyền qua.
- 5) Nâng tụ quang lên sao cho giọt dầu soi kính chạm vào mặt dưới tiêu bản.
- 6) Bật đèn phát nguồn fluorescent (đèn thủy ngân), cần ít nhất 30 phút để làm nóng đèn. Sau đó, bật đèn tungsten-halogen (nguồn sáng cho chế độ hiển vi quang học nền sáng). Lưu ý không bật tắt đèn thủy ngân trong quá trình sử dụng kính hiển vi.
- 7) Sử dụng vật kính 10×, chỉnh tiêu cự để nhìn rõ ảnh.
- 8) Chuyển sang vật kính 90× hoặc 100×, chỉnh tiêu cự để nhìn rõ ảnh. Mở nguồn sáng fluorescent để chuyển sang chế độ quan sát huỳnh quang. So sánh ảnh nhìn thấy giữa chế độ hiển vi quang học nền sáng và hiển vi huỳnh quang.

4. CÂU HỎI KIỂM TRA

- 1) Nguồn ánh sáng nào được sử dụng để quan sát vi sinh vật đã được nhuộm huỳnh quang ở chế độ hiển vi huỳnh quang?
- 2) Liệt kê hai loại thuốc nhuộm huỳnh quang phổ biến dùng để nhuộm vi sinh vật?
- 3) Liệt kê một số lưu ý quan trọng khi quan sát tiêu bản bằng kính hiển vi huỳnh quang?



Hình 16. Cấu tạo kính hiển vi huỳnh quang



Hình 17. Nguyên tắc hoạt động của kính hiển vi huỳnh quang

Chương 2

CÁC KỸ THUẬT QUAN SÁT VI SINH VẬT

Vi sinh vật có thể được quan sát trực tiếp bằng các loại kính hiển vi quang học. Việc quan sát trực tiếp rất cần thiết khi mô tả hình thái học của vi sinh vật, đặc biệt là sự di động của chúng.

Tế bào vi sinh vật còn sống nhìn chung là không màu và rất khó quan sát bởi vì tế bào của chúng có độ tương phản kém với môi trường xung quanh. Việc nhuộm màu tế bào vi sinh vật có thể giúp quan sát các bào quan bên trong tế bào.

Bài 2.1

TIÊU BẢN GIỌT TREO VÀ TIÊU BẢN GIỌT ÉP

1. GIỚI THIỆU

Một số vi khuẩn không di động (*non-motile*) nhưng trong môi trường lỏng chúng thường di chuyển hỗn loạn, gọi là chuyển động Brown (*Brownian movement*). Đây là kết quả chuyển động của các phân tử nước từ đó kéo các vi khuẩn chuyển động theo.

Sự di chuyển thật sự (động lực tự thân, *self-propulsion*) được thấy ở một số vi khuẩn nhờ một số cơ chế khác nhau. Vi khuẩn di chuyển nhờ tiên mao (*flagellar motion*). Các xoắn khuẩn (*helical-shaped spirochetes*) có các lông mao xung quanh (*axial fibrils*) xoắn xung quanh tế bào vi khuẩn sẽ di chuyển theo kiểu xoắn ốc (*corkscrew-type motion*) và kiểu uốn khúc (*bending-type motion*). Một số vi khuẩn khác thì trượt nhẹ nhàng (*gliding motion*).

Các kiểu di động hay không di động có thể được quan sát bằng tiêu bản giọt treo (*hanging drop slide*) (Hình 18). Tiêu bản giọt treo cũng dùng để quan sát hình dạng cơ bản của vi khuẩn ở trạng thái sống cũng như sự sắp xếp của các tế bào vi khuẩn khi chúng kết hợp với nhau (Hình 21). Một vòng vaseline xung quanh gờ của chỗ lõm (*coverslip*) sẽ giúp tiêu bản không bị khô.

2. VẬT LIỆU

- Huyền phù nuôi cấy 24 – 48 giờ của *Lactobacillus* sp. hoặc *Bacillus cereus*, *Acetobacter* sp., *Escherichia coli*, *Streptococcus* sp., *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces boulardii*,...
- Kính hiển vi quang học nền sáng.
- Phiến kính lõm, phiến kính hình vuông.
- Dầu soi kính.
- Tăm tre.
- Đèn cồn.
- Khăn giấy.
- Vaseline.
- Nước vô trùng.

3. CÁCH TIẾN HÀNH

3.1. Tiêu bản giọt treo

- 1) Dùng que tăm, vẽ một vòng tròn nhỏ bằng vaseline xung quanh chỗ lõm (*concavity*) của phiến kính (*Hình 18*). Không nên dùng nhiều vaseline.
- 2) Sau khi lắc thật kỹ huyền phù vi sinh vật, bằng thao tác vô trùng, dùng que cấy vòng đã vô trùng đặt một giọt huyền phù này lên giữa phiến kính hình vuông (*coverslip*). Với mẫu lấy từ khuẩn lạc vi khuẩn, phải tiến hành huyền phù hóa sinh khối tế bào (với nước vô trùng) trước khi tiến hành làm tiêu bản giọt treo.
- 3) Đưa phiến kính lõm (*depression slide*) úp lên phiến kính hình vuông (*coverslip*), sao cho chỗ lõm của phiến kính hướng xuống dưới và giọt huyền phù vi sinh vật nằm lọt vào chỗ lõm. Nhấn xuống nhẹ nhàng để hai phiến kính gắn vào nhau.
- 4) Lật ngược hai phiến kính lại và đặt lên kính hiển vi để quan sát với vật kính đầu (100×).
- 5) Lưu ý đóng cửa sập đến mức tối đa có thể để tăng độ tương phản. Ghi nhận lại hình dạng, kích thước, sự sắp xếp của các tế bào và sự chuyển động của vi khuẩn (tại vị trí rìa giọt nước). Lưu ý sự khác biệt giữa sự di chuyển thật sự và chuyển động Brown. Chụp ảnh và quay một đoạn video clip.
- 6) Phiến kính sau khi sử dụng được ngâm trong dung dịch ethanol 70% để tránh phát tán vi khuẩn ra ngoài môi trường.

3.2. Tiêu bản giọt ép

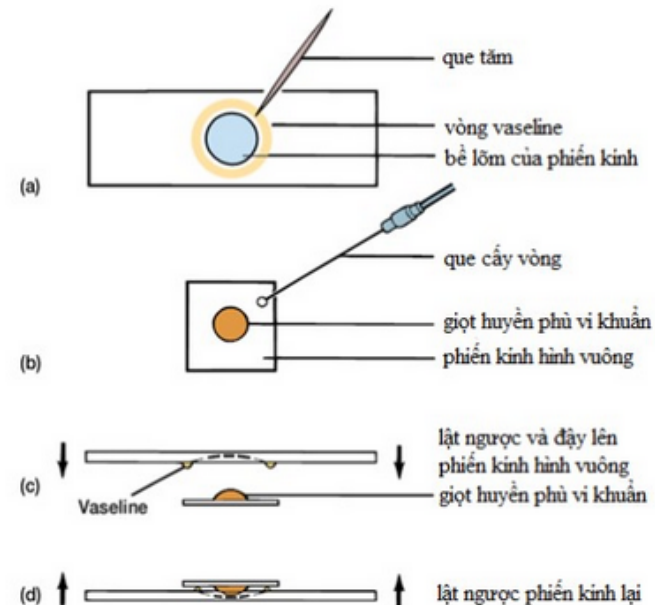
- 1) Đặt một ít huyền phù vi khuẩn lên phiến kính hình chữ nhật (*Hình 19*). Cho một giọt nước vô trùng lên phiến kính hình chữ nhật. Với mẫu lấy từ khuẩn lạc vi khuẩn, dùng que cấy vòng chuyển một ít sinh khối vi khuẩn và hòa đều vào giọt nước đã được đặt lên phiến kính hình chữ nhật. Lưu ý, chỉ lấy một lượng rất ít sinh khối vi khuẩn.
- 2) Dùng phiến kính hình vuông nhẹ nhàng đặt đè lên giọt nước chứa vi khuẩn. Tránh không để hình thành bọt khí.
- 3) Đặt lên kính hiển vi để quan sát với vật kính đầu (100×).
- 4) Lưu ý đóng cửa sập đến mức tối đa có thể để tăng độ tương phản. Ghi nhận lại hình dạng, kích thước, sự sắp xếp của các tế bào và sự chuyển động của vi khuẩn. Chụp ảnh và quay một

đoạn video clip. Lưu ý sự khác biệt giữa sự di chuyển thật sự và chuyển động Brown.

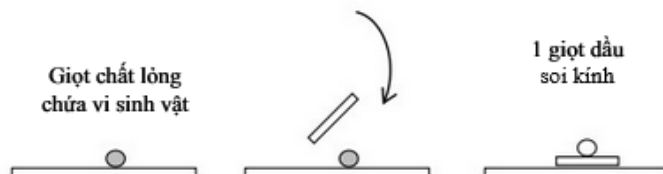
- 5) Phiến kính sau khi sử dụng được ngâm trong dung dịch ethanol 70% để tránh phát tán vi khuẩn ra ngoài môi trường.

4. CÂU HỎI KIỂM TRA

- 1) Chuyển động thật sự của vi khuẩn và chuyển động Brown khác nhau như thế nào?
- 2) Đặc điểm hình thái có liên quan như thế nào đến sự chuyển động của vi khuẩn?
- 3) Tại sao tiêu bản giọt ép phải được cho vào dung dịch khử trùng sau khi sử dụng xong?
- 4) Mục đích của việc chuẩn bị và quan sát tiêu bản giọt treo?
- 5) Mục đích của việc chuẩn bị và quan sát tiêu bản giọt ép?



Hình 18. Cách tiến hành làm tiêu bản giọt treo



Hình 19. Cách tiến hành làm tiêu bản giọt ép

Bài 2.2

TẠO VẾT BÔI VÀ NHUỘM ĐƠN

1. GIỚI THIỆU

Tiêu bản giọt ép đem lại rất nhiều thông tin nhưng chúng cũng có những nhược điểm nhất định. Vi khuẩn di chuyển trong dịch lỏng bởi chuyển động Brown hay tự chuyển động nên rất khó khăn trong việc quan sát. Chúng ta có thể thấy được hình dạng và hoạt động của vi khuẩn nhưng không thể xác định chính xác hình thái của chúng.

Vấn đề mấu chốt ở đây là do kích thước của vi khuẩn và số lượng các chất trong tế bào rất nhỏ bé cho nên chúng hầu như trong suốt ngay cả khi đã được phóng đại và làm giảm độ chiếu sáng. Do đó cần phải tìm cách để chúng không di động và cố định lại để dễ quan sát hơn. Một trong những cách đơn giản nhất là tạo vết bôi vi khuẩn lên phiến kính thủy tinh và “cố định” chúng trên đó, sau đó nhuộm chúng bằng phẩm nhuộm (Hình 20).

Phẩm nhuộm vi khuẩn tốt nhất là loại aniline (phẩm nhuộm hữu cơ được làm từ nhựa than đá). Khi chúng ta sử dụng trực tiếp lên vết bôi vi khuẩn đã cố định, đường nét của vi khuẩn sẽ hiện lên rất rõ ràng. Các phẩm nhuộm này hoạt động theo kiểu acid (*acidic*), kiềm (*basic*) và trung tính (*neutral*). Phẩm nhuộm dạng acid hay trung tính thường được dùng trong nghiên cứu về vi khuẩn. Các ion tự do trong phẩm nhuộm dạng acid là các anion (ion âm) sẽ kết hợp với các cation (thành phần chính của tế bào) để tạo một dạng muối. Phẩm nhuộm dạng kiềm có nhiều cation (ion dương) sẽ kết hợp với một acid trong vật liệu được nhuộm để tạo một loại muối. Tế bào vi khuẩn có rất nhiều ribonucleic acid vì vậy phẩm nhuộm trung tính sẽ bắt màu rất tốt. Phẩm nhuộm dạng trung tính thường kết hợp cả hai loại phẩm nhuộm trên. Do đó, phẩm nhuộm dạng trung tính sẽ có tác dụng rất tốt khi nhuộm các tế bào phức tạp bởi vì chúng cho phép làm hiện rõ các cấu trúc bên trong của vi khuẩn. Các tế bào và cấu trúc bị nhuộm màu bởi phẩm nhuộm kiềm được gọi là *basophilic*, còn nếu bị nhuộm màu với phẩm nhuộm acid thì gọi là *acidophilic*.

Vi khuẩn có thành tế bào vững chắc để duy trì hình dạng của mình. Vì vậy, chúng ta có thể phân loại vi khuẩn căn cứ theo hình dạng của chúng. Vi khuẩn có ba dạng cơ bản (Hình 21): hình cầu (*spherical, round*), hình que (hình gậy, *rod*) và hình xoắn (*spiraled*). Vi khuẩn hình cầu gọi là *coccus* (số nhiều là *cocci*). Vi khuẩn hình que gọi là *bacillus*

(số nhiều là *bacilli*) hay chỉ đơn giản gọi là *rod*. Vi khuẩn có dạng xoắn có tối thiểu hai đến ba đường cong trên tế bào được gọi là *spirillum* (số nhiều là *spirilla*). Các vi khuẩn có tế bào dài và ngoằn ngoèo với các vòng xoắn (lông hoặc chặt) được gọi là *spirochetes*.

Cách thức mà các tế bào tạo thành nhóm thì đặc trưng cho từng giống hoặc loài vi khuẩn. Các tế bào hình cầu có thể đứng thành từng cặp (*diplococci*), đứng thành chuỗi (*streptococci*), đứng thành từng cụm (*staphylococci*), hoặc đứng thành một cụm bốn tế bào (*tetrads*), và đôi khi chúng cũng đứng thành từng tế bào riêng lẻ.

Các vi khuẩn hình que (*bacilli*) thường ở dạng một tế bào riêng lẻ, nhưng cũng có khi xuất hiện ở dạng một cặp nối tiếp nhau (*diplobacilli*) hay đứng thành một chuỗi dài (*streptobacilli*). Một số loài có khuynh hướng đứng thành một cụm các tế bào hình que song song (*palisade*) hoặc tạo thành hình chữ V, X, Y khi chúng nhân đôi và phân chia. Một số loài tạo thành nhiều hình dáng và kích thước khác nhau (đa hình thể, pleomorphism).

Các xoắn khuẩn thường xuất hiện ở dạng một tế bào đứng riêng lẻ và thường không kết thành nhóm.

Tạo vết bôi vi khuẩn (*bacterial smear*) là làm khô tế bào vi khuẩn trên phiến kính (Hình 20). Các bước thực hiện cơ bản bao gồm: (1) vi khuẩn được trải lên phiến kính sao cho các tế bào nằm thành một lớp mỏng, (2) tế bào vi khuẩn không bị rửa trôi trong quá trình nhuộm và (3) vi khuẩn không bị biến dạng. Một trong số những lỗi thường gặp khi làm vết bôi vi sinh vật lấy từ môi trường rắn là sử dụng quá nhiều sinh khối. Kết quả là không thể quan sát được do nhiều lớp vi khuẩn chồng lên nhau. Nếu mẫu thí nghiệm là môi trường lỏng, chỉ cần cho một giọt vi khuẩn lên phiến kính và sau đó, trải vi khuẩn thành một bề mặt rộng. Làm khô phiến kính bằng khí nóng hoặc để tự khô. Khi phiến kính đã khô, bước kế tiếp là gắn chặt vi khuẩn vào phiến kính bằng cách hơi nóng nhẹ (*heat-fixing*). Tiến hành việc này bằng cách đưa nhẹ phiến kính qua lại vài lần trên ngọn lửa. Vi khuẩn sẽ bị gắn chặt vào phiến kính và bị giết chết mà không làm biến dạng tế bào.

Sử dụng phương pháp nhuộm đơn sẽ tạo sự tương phản giữa vi khuẩn và cảnh nền. Phương pháp này được dùng để thu thập thông tin về hình dạng, kích thước và sự sắp xếp của tế bào. Bước kế tiếp là đặt phiến kính lên giá, phủ lên vết bôi phẩm nhuộm, chờ một vài giây. Các phẩm nhuộm cơ bản thường dùng là crystal violet (thời gian nhuộm 20 - 30 giây), carbolfuchsin (thời gian nhuộm 5 - 10 giây) hoặc methylene blue (thời gian nhuộm 1 phút).

2. VẬT LIỆU

- Huyền phù nuôi cấy 24 - 48 giờ của *Lactobacillus* sp. hoặc *Bacillus cereus*, *Acetobacter* sp., *Escherichia coli*, *Streptococcus* sp., *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces boulardii*,...
- Kính hiển vi quang học nền sáng.
- Khăn giấy.
- Que cấy vòng (*innoculating loop*), que cấy thẳng (*innoculating needle*).
- Nước vô trùng.
- Đèn cồn.
- Loeffler's alkaline methylene blue.
- Crystal violet (dung dịch 1%).
- Ziehl's carbolfuchsin.
- Dầu soi kính.

3. CÁCH TIẾN HÀNH

3.1. Tạo vết bôi

- 1) Dùng bút lông (không xóa) ghi tên vi khuẩn ở một đầu phiến kính.
- 2) Lắc kỹ dung dịch chứa vi khuẩn. Với thao tác vô trùng chuyển một hoặc hai vòng cấy vi khuẩn vào giữa phiến kính (Hình 20). Trải đều trên diện tích khoảng 1-2 cm². Nếu tạo vết bôi từ môi trường rắn thì cho một giọt nước vào giữa phiến kính và dùng que cấy thẳng cho một lượng nhỏ sinh khối vào giọt nước. Trộn đều sinh khối với giọt nước. Trải đều trên diện tích khoảng 1-2 cm².
- 3) Hơ phiến kính trên ngọn lửa để cố định và giết chết vi khuẩn.

3.2. Nhuộm đơn

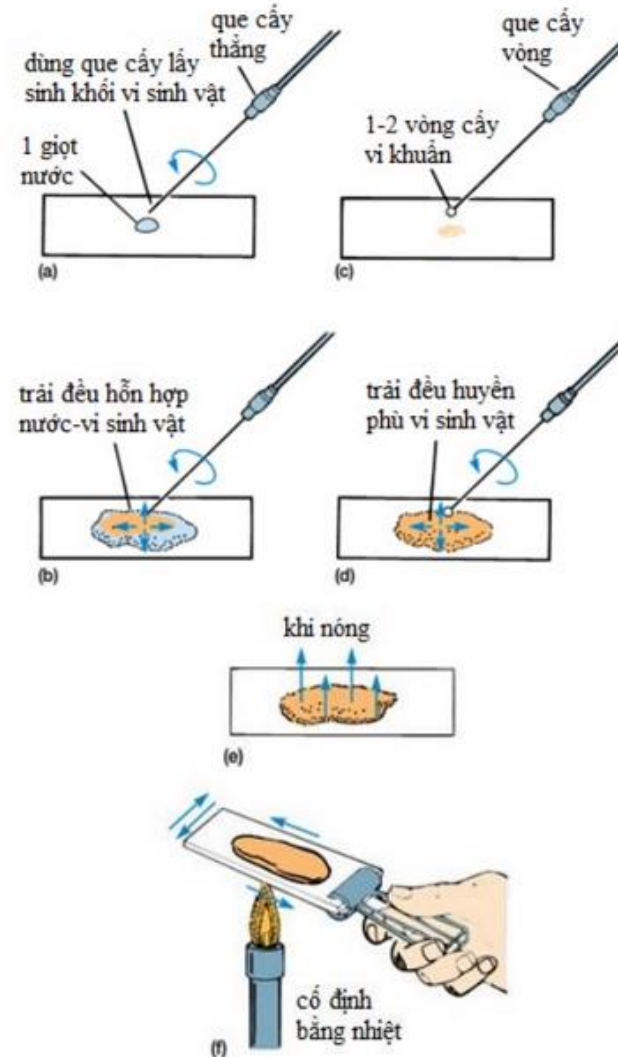
- 1) Đặt phiến kính lên bàn (hay lên giá đỡ).
- 2) Nhuộm với phẩm nhuộm (alkaline methylene blue trong 1 - 1.5 phút, carbolfuchsin trong 5 - 10 giây, hoặc crystal violet trong 20 - 30 giây)
- 3) Rửa trôi thuốc nhuộm bằng nước trong vài giây.

- 4) Thấm khô bằng giấy thấm. Không được chà xát lên vết bôi.
- 5) Quan sát bằng kính hiển vi với vật kính dầu. Chụp ảnh tiêu bản.
- 6) Có thể sử dụng ba loại phẩm nhuộm khác nhau với cùng một loại vi sinh vật để có sự so sánh.

4. CÂU HỎI KIỂM TRA

- 1) Mục đích của việc cố định vi khuẩn bằng nhiệt?
- 2) Mục đích của việc nhuộm đơn?
- 3) Vì sao phẩm nhuộm trung tính (basic) cho kết quả nhuộm tốt hơn phẩm nhuộm acid?
- 4) Liệt kê ba loại phẩm nhuộm trung tính?
- 5) Vì sao thời gian là yếu tố quan trọng nhất trong quy trình nhuộm đơn?
- 6) Làm thế nào để chuẩn bị một vết bôi đúng cách?
- 7) Tại sao cần sử dụng một que cấy vòng (inoculating needle) để tạo một vết bôi từ mẫu trên môi trường rắn? Có thể sử dụng que cấy này khi lấy mẫu trên môi trường lỏng được không?

TỪ MÔI TRƯỜNG RẮN TỪ MÔI TRƯỜNG LỎNG



Hình 20. Cách tạo vết bôi vi khuẩn

HÌNH DẠNG

CÁCH SẮP XẾP

Hình cầu		diplococcus (cặp)	
coccus (số nhiều: cocci)		streptococcus (chuỗi)	
		staphylococcus (ngẫu nhiên hay dạng chùm nho)	
		tetrads (4 tế bào)	
hình que		streptobacillus (chuỗi)	
	bacillus (số nhiều: bacilli)		
hình xoắn		sarcina (nhóm 8 tế bào hình lập phương)	
	spirillum (số nhiều: spirilla)		
xoắn không hoàn toàn			
	vibrio (số nhiều: vibrios)		
hình dạng bất thường hay có hình dạng thay đổi		pleomorphic	

Hình 21. Hình dạng và cách sắp xếp tế bào vi khuẩn

Bài 2.3 NHUỘM ÂM BẢN

1. GIỚI THIỆU

Trong một số trường hợp việc sử dụng phương pháp cố định tế bào bằng nhiệt khi nhuộm sẽ làm thay đổi hình dạng tế bào vi sinh vật. Đối với một số vi khuẩn không bắt màu thuốc nhuộm tốt (ví dụ các xoắn khuẩn *spirochetes*) thì có thể sử dụng kỹ thuật nhuộm âm bản để quan sát hình dạng (Hình 22). Kỹ thuật nhuộm âm bản còn được sử dụng để quan sát vỏ nhầy (*capsule*).

Nhuộm âm bản (nhuộm gián tiếp hoặc nhuộm nền) được tiến hành bằng cách trộn vi khuẩn với thuốc nhuộm acid như nigrosin, mực tàu hoặc cosin sau đó trải đều hỗn hợp này lên phiến kính để tạo thành một lớp chất lỏng. Các loại thuốc nhuộm này không thấm vào tế bào vi khuẩn do lực đẩy giữa điện tích âm của thuốc nhuộm và điện tích âm của vách tế bào vi khuẩn. Thay vào đó, thuốc nhuộm sẽ hiện diện ở môi trường xung quanh vi khuẩn và tạo một nền sẫm màu và vi khuẩn sẽ hiện ra không màu với một vùng sáng xung quanh (Hình 23).

2. VẬT LIỆU

- + Huyền phù nuôi cấy 24 - 48 giờ của *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus*, *Acetobacter xylinum*,...trên môi trường Tryptic soy agar.
- + Dung dịch Dornier's nigrosin, mực tàu, cosin blue.
- + Que cấy thẳng.
- + Dầu soi kính.
- + Đèn cồn.

3. CÁCH TIẾN HÀNH

- 1) Dùng que cấy vòng lấy một ít sinh khối vi khuẩn lên một đầu của phiến kính sạch (Hình 22).
- 2) Thêm 1 - 2 giọt phẩm nhuộm lên phần sinh khối vi khuẩn và trộn đều.

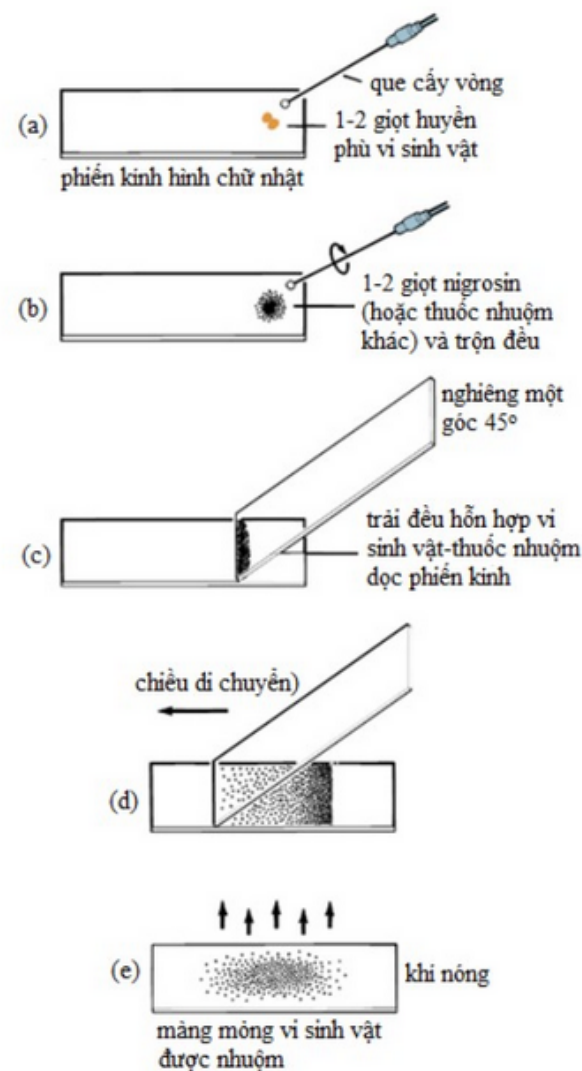
- 3) Trải hỗn hợp lên phiến kính bằng một phiến kính thứ hai. Phiến kính thứ hai phải giữ một góc 45° so với phiến kính ban đầu. Đây phiến kính thứ hai dọc theo phiến kính ban đầu để tạo một màng mỏng. Đây là cách tạo vết bôi mỏng (thin smear).
- 4) Để khô vết bôi trong khí nóng (air dry), không cố định trên ngọn lửa (heat-fix).
- 5) Sử dụng vật kính low-power tìm vùng có vết bôi mỏng để quan sát.
- 6) Sử dụng vật kính dầu để quan sát và vẽ hình vi sinh vật (hoặc chụp ảnh tiêu bản).

Lưu ý

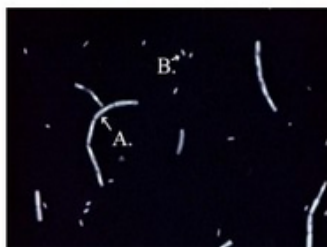
- Để tạo vết bôi mỏng tốt thì phiến kính phải sạch, không dính dầu mỡ hay dấu vân tay.
- Nếu làm vết bôi sai thì tốt nhất là làm lại, không nên cố quan sát.
- Không được dùng quá nhiều phẩm nhuộm, chỉ 1 - 2 giọt là đủ.

4. CÂU HỎI KIỂM TRA

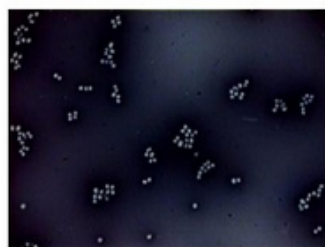
- 1) Mục đích của việc thực hiện tiêu bản nhuộm âm bản?
- 2) Liệt kê ba chủng vi khuẩn có thể sử dụng để làm tiêu bản nhuộm âm bản?
- 3) Tại sao vi khuẩn không bắt màu thuốc nhuộm sau quá trình nhuộm âm bản?
- 4) Ưu điểm của phương pháp nhuộm âm bản là gì?
- 5) Tại sao không cần cố định huyền phù vi khuẩn bằng nhiệt trước khi tiến hành nhuộm âm bản?
- 6) Tại sao nhuộm âm bản còn được gọi là nhuộm gián tiếp hay nhuộm nền?
- 7) Khi dùng phiến kính thứ hai để dàn mỏng hỗn hợp vi sinh vật và phẩm nhuộm, cần phải giữ phiến kính thứ hai nghiêng một góc 45° ?



Hình 22. Cách chuẩn bị một vết bôi mỏng và nhuộm âm bản



(A) Tế bào *Bacillus* sp.; (B) Nội bào tử của *Bacillus* sp.



Cầu khuẩn

Hình 23. Ảnh nhuộm âm bản của một số vi khuẩn

Bài 2.4 NHUỘM GRAM

1. GIỚI THIỆU

Vào năm 1884, Christian Gram, một nhà nghiên cứu bệnh học người Đan Mạch, đã khám phá ra một phương pháp nhuộm vi sinh vật bằng phẩm nhuộm pararosaniline. Thông qua việc sử dụng theo trình tự hai loại phẩm nhuộm, có hai màu khác nhau, ông ta đã nhận thấy vi khuẩn được chia thành hai nhóm. Nhóm thứ nhất giữ màu phẩm nhuộm đầu tiên: crystal violet (nhóm vi khuẩn Gram dương). Nhóm thứ hai bị mất màu phẩm nhuộm đầu tiên sau khi được rửa bằng một dung dịch tẩy màu rồi được tiếp tục nhuộm bằng phẩm nhuộm thứ hai là safranin hay carbol fuchsin (nhóm vi khuẩn Gram âm). Dung dịch iodine được dùng như là một chất cắn màu (*mordant*) (có nhiệm vụ gắn phẩm nhuộm lên/vào một chất bằng cách kết hợp với phẩm nhuộm để tạo phức không tan) ở sau lần nhuộm đầu tiên.

Cơ chế chính xác của kỹ thuật nhuộm Gram chưa được biết tường tận. Tuy nhiên, thành phần hóa học của hai loại vách tế bào vi khuẩn khác nhau (Gram dương và Gram âm) sẽ dẫn đến kết quả khác nhau dưới tác dụng của thuốc nhuộm Gram. Thành tế bào vi khuẩn Gram dương có nhiều peptidoglycan (phức của protein-đường) được gắn chặt với nhau từ đó giúp chống được sự tẩy màu. Vách tế bào vi khuẩn Gram âm chứa hàm lượng lipid cao và chúng dễ bị hòa tan trong chất tẩy màu (alcohol, acetone hay hỗn hợp hai chất này) từ đó làm cho thuốc nhuộm ban đầu là crystal violet dễ bị rửa trôi. Do đó, vi khuẩn Gram âm có thể bắt màu thuốc nhuộm bổ sung (*counterstain*) (Hình 24).

Nhuộm Gram là một trong số các công cụ hữu dụng nhất trong các phòng thí nghiệm vi sinh và được sử dụng rất thường xuyên. Phương pháp nhuộm Gram được cải biến bằng cách thay đổi nồng độ phẩm nhuộm, thời gian nhuộm và thành phần của chất tẩy màu. Phương pháp cải biến của Hucker, được sử dụng trong bài thí nghiệm này, hiện nay đang được sử dụng rộng rãi. Đầu tiên, tiêu bản được nhuộm với phẩm nhuộm cơ bản là crystal violet. Sau đó, tiêu bản được xử lý với dung dịch iodine, đóng vai trò như chất cắn màu (*mordant*). Sau đó, tiêu bản được tẩy màu bằng ethanol hoặc hỗn hợp ethanol-acetone. Việc lựa chọn chất tẩy màu tùy thuộc vào thời gian mong muốn hoàn thành các bước nhuộm. Sử dụng ethyl alcohol 95%, dùng trong bài thí nghiệm này, cho

phép sinh viên tập làm quen với chất tẩy màu bởi vì nó có tác dụng rất chậm. Acetone là chất tẩy màu có tác dụng nhanh nhất trong khi hỗn hợp (50:50) của ethyl alcohol 95% và acetone thì ở mức trung bình. Hỗn hợp acetone-alcohol thường được dùng trong các phòng thí nghiệm. Cuối cùng, tiêu bản được nhuộm bổ sung bằng một phẩm nhuộm cơ bản có màu khác với crystal violet (thường dùng safranin). Như vậy, safranin sẽ nhuộm tế bào vi khuẩn Gram âm không màu thành màu hồng nhưng không thể thay đổi màu tím đen của vi khuẩn Gram dương. Kết quả là vi khuẩn Gram dương sẽ có màu tím đen trong khi vi khuẩn Gram âm sẽ có màu hồng (Hình 25).

2. VẬT LIỆU

- + Chuẩn bị huyền phù nuôi cấy 18-24 giờ của *Lactobacillus* sp. và *E.coli* cùng với hỗn hợp của hai vi khuẩn này.
- + Dung dịch Crystal violet.
- + Dung dịch Gram's iodine.
- + 95% ethanol và/hoặc hỗn hợp isopropanol-acetone (3:1 v/v).
- + Dung dịch Safranin.
- + Phiến kính hình chữ nhật, dầu soi kính

3. CÁCH TIẾN HÀNH

- 1) Chuẩn bị vết bôi và cố định vi sinh vật (Hình 20).
- 2) Dùng dung dịch crystal violet phủ lên vết bôi (Hình 25). Để yên trong 1 phút.
- 3) Để nghiêng phiến kính 45°, rửa dưới vòi nước cho trôi hết phần thuốc nhuộm dư (giọt cuối cùng chảy khỏi phiến kính không còn màu).
- 4) Phủ lên vết bôi dung dịch iodine. Để yên 1 phút.
- 5) Để nghiêng phiến kính 45°, tẩy màu bằng dung dịch 95% alcohol cho đến khi giọt cuối cùng chảy ra khỏi phiến kính không còn màu (thông thường khoảng 10 - 20 giây). Đây là bước quan trọng nhất. Nếu bị tẩy màu quá mức, một số vi khuẩn Gram dương sẽ bị mất màu tím và sẽ trở thành Gram âm sau khi nhuộm màu lần thứ 2.
- 6) Ngay lập tức rửa phiến kính dưới vòi nước.

- 7) Phủ lên vết bôi dung dịch safranin O hoặc basic fuchsin. Để yên 1 phút.
- 8) Rửa dưới vòi nước.
- 9) Thấm nhẹ bằng giấy thấm. Hơ khô phiến kính trước khi quan sát dưới kính hiển vi.
- 10) Sử dụng dầu soi kính và vật kính dầu (100×) để quan sát. Chụp ảnh tiêu bản.
- 11) Với mẫu kiểm soát (*control sample*): chuẩn bị hai tiêu bản có vết bôi của *Lactobacillus* sp. và *E.coli* đã được cố định bằng nhiệt. Sau đó tiến hành nhuộm đơn bằng crystal violet và safranin O (hoặc basic fuchsin). Tẩy màu bằng 95% alcohol (10 - 20 giây). Quan sát với dầu soi kính (vật kính 100×). So sánh các mẫu kiểm soát với mẫu thí nghiệm sự bắt màu của vi khuẩn.

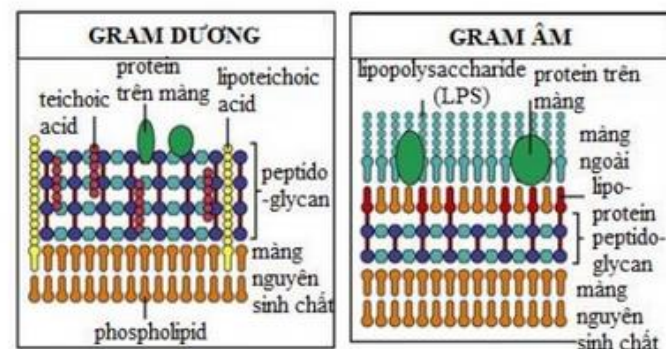
Lưu ý:

- Luôn dùng giống vi khuẩn "trẻ" bởi vì một số giống vi khuẩn Gram dương "già" sẽ mất khả năng giữ màu của phức chất crystal violet-iodine và sẽ trở thành Gram âm khi quan sát. Vì vậy, chỉ nên sử dụng các tế bào nuôi cấy trong vòng 24 giờ.
- Ngoài ra, cũng có một số chủng vi khuẩn là Gram dương yếu.
- Các tế bào vi khuẩn Gram dương có thể xuất hiện dưới dạng Gram âm, nhưng các tế bào vi khuẩn Gram âm thì không bao giờ xuất hiện dạng Gram dương.
- Không làm vết bôi vi khuẩn quá dày. Vết bôi dày đòi hỏi thời gian tẩy màu lâu hơn vết bôi mỏng.
- Tẩy màu cho đến khi giọt dung dịch cuối cùng chảy ra khỏi phiến kính.
- Vi khuẩn Gram dương có thể xuất hiện dưới dạng Gram âm do khử màu bằng ethanol 95% quá mức, vì vậy cần đảm bảo thời gian rửa bằng ethanol từ 10 - 20 giây.
- Một số sai sót khác là: (a) que cấy quá nóng, (b) hơ nóng quá mức khi cố định vi sinh vật trên phiến kính. Hơ quá nóng khi cố định vi khuẩn lên phiến kính có thể làm vỡ tế bào, từ đó màu của tế bào Gram (+) có thể bị rửa trôi làm cho tế bào Gram (+) trở thành Gram (-).

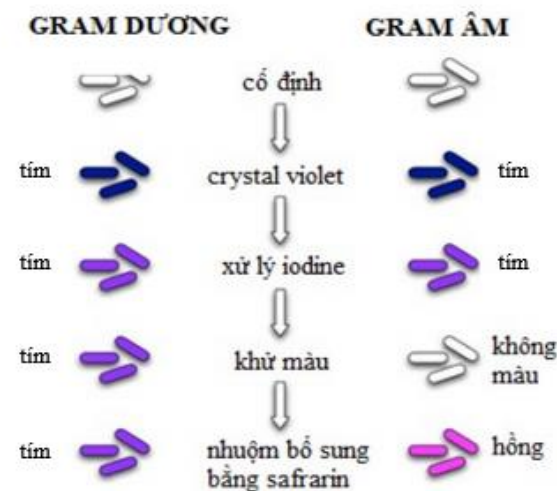
- Nếu vết bôi vi khuẩn quá dày, thuốc nhuộm thấm vào các tế bào không đồng đều.
- Có thể thay safranin bằng một thuốc nhuộm khác để phân biệt với màu tím.
- Dung dịch Iod có thể bị phân hủy nếu để lâu.
- Một kết quả nhuộm Gram không rõ ràng có thể được xác định lại bằng một thử nghiệm đơn giản với KOH. Nhỏ một giọt 10% KOH lên phiến kính hình chữ nhật. Dùng que cấy vòng lấy đầy một lượng sinh khối và trộn với giọt 10% KOH. Sau 30 giây, kéo đầu que cấy một cách từ từ và nhắc ra khỏi huyền phù vi sinh vật. Huyền phù vi khuẩn Gram âm sẽ tạo một chuỗi nhầy trong khi huyền phù vi khuẩn Gram dương vẫn ở trạng thái dịch lỏng.

4. CÂU HỎI KIỂM TRA

- 1) Trình bày sự khác biệt giữa nhuộm đơn và nhuộm Gram?
- 2) Gọi tên và cho biết mục đích sử dụng của các loại phẩm nhuộm sau được sử dụng trong quá trình nhuộm Gram:
 - a) Phẩm nhuộm ban đầu
 - b) Chất cần màu
 - c) Chất khử màu
 - d) Phẩm nhuộm bổ sung
- 3) Giai đoạn nào là quan trọng nhất và có thể làm ảnh hưởng đến kết quả nhuộm Gram? Tại sao?
- 4) Tại sao chủng vi khuẩn “trẻ” cần phải được sử dụng để nhuộm Gram?
- 5) Phần nào trong tế bào vi khuẩn tham gia vào quá trình nhuộm Gram? Tại sao?



Hình 24. Cấu tạo vách tế bào vi khuẩn Gram (+) và Gram (-)



Hình 25. Các giai đoạn của quá trình nhuộm Gram

Bài 2.5

NHUỘM KHÁNG ACID

(Phương pháp Ziehl-Neelsen và Kinyoun)

1. GIỚI THIỆU

Trong các phòng thí nghiệm vi sinh, kỹ thuật nhuộm kháng acid (Hình 26) được sử dụng để xác định vi khuẩn thuộc các giống *Mycobacterium*, đặc biệt là *M. leprae* (gây bệnh phong) và *M. tuberculosis* (gây bệnh lao). Kỹ thuật nhuộm kháng acid còn được sử dụng để xác định xạ khuẩn hiếu khí thuộc giống *Nocardia*, đặc biệt là các loài gây bệnh cơ hội như *N. brasiliensis* và *N. asteroides* (gây bệnh ở phổi). Ký sinh trùng gây bệnh trong nước như *Cryptosporidium* (một loại động vật nguyên sinh) gây bệnh tiêu chảy ở người có thể được xác định thông qua kỹ thuật nhuộm kháng acid.

Một số loài vi khuẩn thuộc giống *Mycobacterium* và *Nocardia* hay ký sinh trùng *Cryptosporidium* rất khó bắt màu thông qua quy trình nhuộm đơn. Các vi sinh vật này có thể bị nhuộm màu khi làm nóng chúng với carbolfuchsin. Nhiệt độ cao sẽ làm thuốc nhuộm đi vào bên trong tế bào. Khi các vi sinh vật này đã bắt màu carbolfuchsin thì chúng không dễ dàng mất màu khi bị khử màu bằng acid-alcohol, do đó chúng được gọi là kháng acid (*acid-fast*). Sự kháng acid này là do hàm lượng cao lipid (mycolic acid) ở vách tế bào. Kỹ thuật nhuộm kháng acid Ziehl-Neelsen (được Franz Ziehl, một nhà vi khuẩn học người Đức, và Friedrich Neelsen, một nhà bệnh lý học người Đức đề xuất vào những năm 1800) là một kỹ thuật nhuộm phân biệt để xác định khả năng giữ carbolfuchsin trong tế bào vi khuẩn. Vi khuẩn kháng acid sẽ giữ thuốc nhuộm này trong tế bào và có màu đỏ khi nhìn dưới kính hiển vi quang học nền sáng. Vi khuẩn không kháng acid (*non-acid-fast*) sẽ xuất hiện với màu xanh hay nâu do quá trình nhuộm bổ sung với methylen blue và bị tẩy màu bằng acid-alcohol. Vào những năm đầu thế kỷ 20, Joseph Kinyoun (một nhà vi khuẩn học người Đức) đã cải tiến kỹ thuật nhuộm kháng acid bằng cách sử dụng một chất làm giảm sức căng bề mặt (*wetting agent*, Tergitol No.7) thay thế cho việc sử dụng nhiệt độ cao để đưa thuốc nhuộm vào trong tế bào. Sau này, kỹ thuật này được gọi là kỹ thuật nhuộm Kinyoun.

2. VẬT LIỆU

- + *Escherichia coli* được nuôi trên môi trường TSB (tryptic soy broth) hoặc *Mycobacterium smegmatic* được nuôi trên môi trường NA (nutrient agar) hoặc *Mycobacterium phlei* được nuôi trên môi trường NA (5 ngày).
- + Ziehl's carbolfuchsin.
- + Alkaline methylen blue.
- + Acid alcohol.
- + Phiến kính, que cấy vòng, kính hiển vi, giấy thấm, dầu soi kính,...

3. CÁCH TIẾN HÀNH

3.1. Phương pháp Ziehl-Neelsen (phương pháp nóng)

1. Tạo vết bôi (Hình 20) chứa hỗn hợp *E. coli* hoặc *M. smegmatic*.
2. Cố định vết bôi bằng nhiệt.
3. Đặt phiến kính lên một giá đỡ cách một cốc nước sôi đang bốc hơi bên dưới một khoảng 3-5 cm. Đặt một mẫu giấy thấm trên bề mặt vết bôi. Thấm dầm mẫu giấy thấm bằng Ziehl's carbolfuchsin trong 3-5 phút. Không để mẫu giấy bị khô, không để Ziehl's carbolfuchsin tràn ra khỏi phiến kính hoặc bị sôi lên (Hình 26).
4. Lấy phiến kính ra khỏi giá đỡ và để nguội về nhiệt độ phòng trong 30 giây.
5. Khử màu bằng cách nhỏ từng giọt acid-alcohol lên phiến kính (đặt nghiêng) trong 10-30 giây.
6. Rửa lại bằng nước trong 5 giây.
7. Nhuộm bổ sung bằng alkaline methylen blue trong 2 phút.
8. Rửa lại bằng nước trong 30 giây.
9. Làm khô phiến kính.
10. Nhỏ một giọt dầu soi kính lên vết bôi và quan sát dưới kính hiển vi quang học nền sáng. Chụp ảnh tiêu bản. Tế bào vi sinh vật kháng acid sẽ có màu đỏ; môi trường xung quanh và các tế bào khác sẽ có màu xanh hoặc nâu.

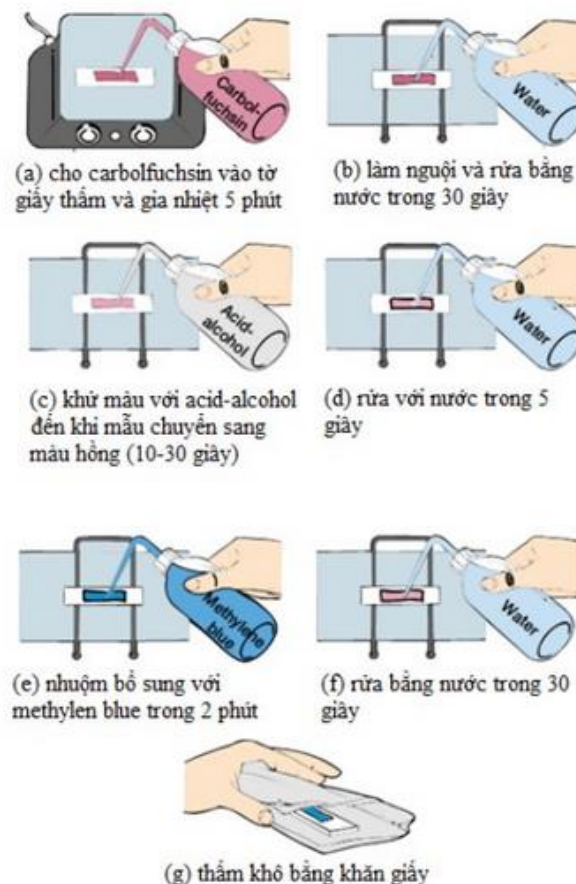
3.2. Phương pháp Kinyoun (phương pháp nhuộm nguội)

1. Tạo vết bôi chứa hỗn hợp *E.coli* hoặc *M.smegmatic*.
2. Cố định vết bôi bằng nhiệt.
3. Phủ vết bôi bằng carbolfuchsin có bổ sung Tergitol No.7
4. Khử màu bằng cách nhỏ từng giọt acid-alcohol lên phiến kính (đặt nghiêng) trong 10-30 giây.
5. Rửa lại bằng nước trong 5 giây.
6. Nhuộm bổ sung bằng alkaline methylen blue trong 2 phút.
7. Rửa lại bằng nước trong 30 giây.
8. Làm khô phiến kính.
9. Nhỏ một giọt dầu soi kính lên vết bôi và quan sát dưới kính hiển vi quang học nền sáng. Chụp ảnh tiêu bản. Tế bào vi sinh vật kháng acid sẽ có màu đỏ; môi trường xung quanh và các tế bào khác sẽ có màu xanh.

Lưu ý: Nếu vi sinh vật không bám được vào phiến kính, tiến hành trộn vi khuẩn với huyết thanh cừu hoặc albumin trứng khi tạo vết bôi. Việc này sẽ giúp vi khuẩn bám chặt vào phiến kính.

4. CÂU HỎI KIỂM TRA

1. Mục đích của việc sử dụng nhiệt trong quy trình nhuộm kháng acid?
2. Mục đích của việc nhuộm bổ sung trong quy trình nhuộm kháng acid?
3. Vi khuẩn kháng acid có Gram dương hay Gram âm? Giải thích?
4. Kỹ thuật nhuộm kháng acid có thể dùng để xác định những tác nhân gây bệnh nào?
5. Lý do nào làm cho vi khuẩn không kháng acid trong quy trình nhuộm kháng acid?
6. Thành phần hóa học nào trong tế bào chịu trách nhiệm về tính kháng acid của nhóm vi khuẩn mycobacteria?
7. Kỹ thuật nhuộm Gram có thể dùng thay thế cho kỹ thuật nhuộm kháng acid? Tại sao?



Hình 26. Cách tiến hành nhuộm kháng acid theo phương pháp Zeihl-Neelsen

Bài 2.6

NHUỘM BÀO TỬ

(Phương pháp Schaeffer-Fulton và Wirtz-Conklin)

1. GIỚI THIỆU

Một số vi khuẩn (ví dụ thuộc giống *Bacillus* hay *Clostridium*) có khả năng tạo cấu trúc giúp vi khuẩn sống sót và chống chịu với điều kiện bất lợi của môi trường (nhiệt độ, pH, tia bức xạ...) trong một thời gian dài và sau đó có thể nảy mầm thành một tế bào vi khuẩn mới. Cấu trúc này được gọi là nội bào tử (*endospore*) bởi vì nó được hình thành bên trong tế bào (Hình 27). Nội bào tử có hình cầu hay hình clip và có thể nhỏ hay lớn hơn tế bào vi khuẩn. Nội bào tử thường nằm trong tế bào sinh dưỡng theo ba vị trí (Hình 29):

- + Nằm ở tâm tế bào: gọi là bào tử kiểu *Bacillus*
- + Nằm lệch tâm: gọi là bào tử kiểu *Clostridium*
- + Nếu nằm về phía một cực tế bào: gọi là bào tử kiểu *Plectidium*

Quá trình tạo nội bào tử bao gồm sự tập trung các thành phần quan trọng của tế bào vào một vách kép dày đóng kín. Hoạt động của tế bào sinh dưỡng vi khuẩn chậm dần. Sau đó, độ ẩm tế bào vi khuẩn giảm và nội bào tử hình thành. Tiếp theo đó là phần tế bào vi khuẩn rỗng sẽ biến mất (Hình 27).

Rất khó nhuộm màu nội bào tử, tuy nhiên khi đã bắt màu thì nội bào tử lại khó bị tẩy màu. Đây là tính chất cơ bản hình thành nên phương pháp Schaeffer-Fulton và Wirtz-Conklin. Nội bào tử được nhuộm với malachite green. Nhiệt được sử dụng để giúp thuốc nhuộm xâm nhập vào nội bào tử. Các phần còn lại của tế bào sẽ được tẩy màu và nhuộm bổ sung với safranin.

2. VẬT LIỆU

- + *Bacillus* sp. hoặc *Clostridium* sp. được nuôi cấy 3 - 5 ngày trên môi trường NA (nutrient agar).
- + Dung dịch 5% Malachite green.
- + Dung dịch 0.5% Safranin.

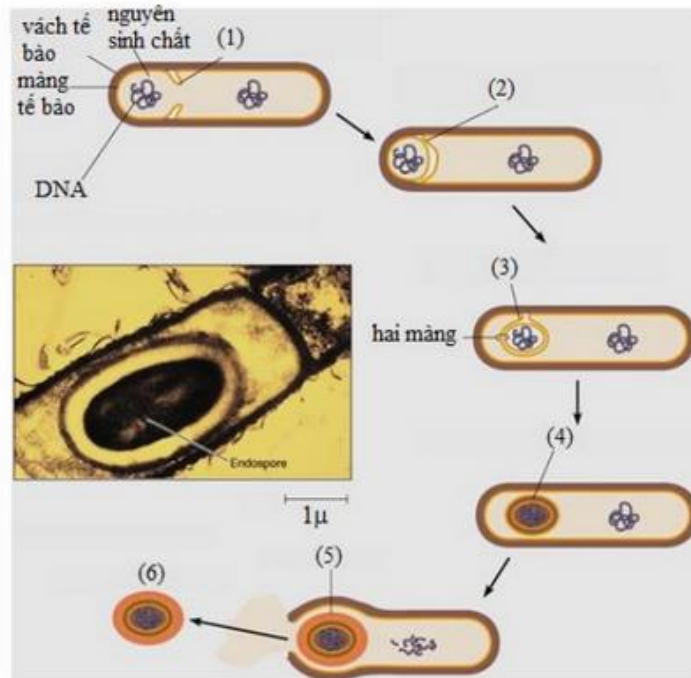
- + Phiến kính hình chữ nhật.
- + Dầu soi kính.
- + Que cấy vòng.
- + Beaker thủy tinh chứa nước nóng được đun sôi trên bếp.

3. CÁCH TIẾN HÀNH

1. Tạo vết bôi vi khuẩn trên phiến kính hình chữ nhật và cố định bằng nhiệt (Hình 28).
2. Đặt phiến kính chứa vết bôi lên beaker đang được đun sôi nhẹ.
3. Đậy vết bôi bằng một mẫu khăn giấy (có kích thước bằng phiến kính).
4. Làm ẩm mẫu khăn giấy bằng dung dịch 5% malachite green. Luôn giữ cho miếng khăn giấy ẩm bằng việc bổ sung dung dịch 5% malachite green (không để miếng khăn giấy bị khô những cũng không để miếng khăn giấy quá ướt sũng).
5. Sau 10 phút, dùng kẹp gấp bỏ miếng khăn giấy.
6. Để yên cho phiến kính nguội, sau đó rửa bằng nước trong 30 giây.
7. Nhuộm bổ sung bằng 0.5% safranin trong 1 phút.
8. Rửa phiến kính bằng nước trong 30 giây. Để khô và quan sát dưới kính hiển vi quang học nền sáng với một giọt dầu soi kính. Chụp ảnh tiêu bản.
9. Nội bào tử và bào tử tự do bắt màu xanh, tế bào sinh dưỡng của vi khuẩn bắt màu đỏ nhạt.

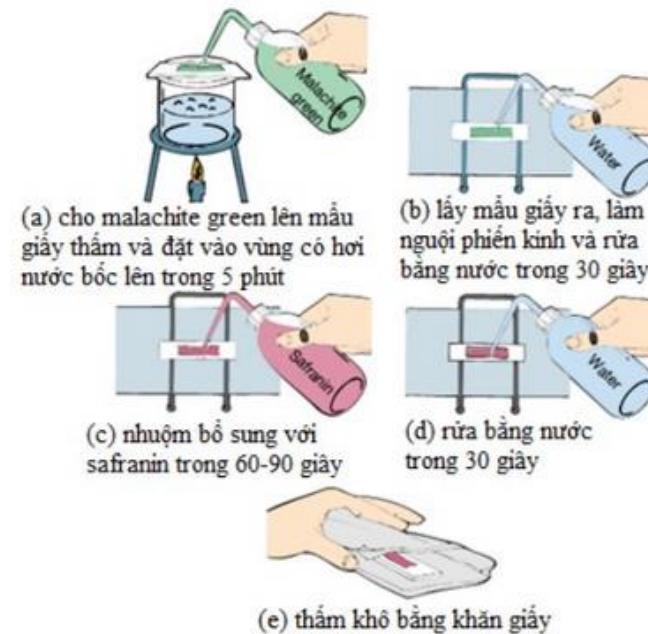
4. CÂU HỎI KIỂM TRA

1. Tại sao cần sử dụng nhiệt trong quá trình nhuộm bào tử vi khuẩn?
2. Bào tử nằm ở vị trí nào bên trong tế bào vi khuẩn?
3. Theo phương pháp Schaeffer-Fulton, thuốc nhuộm đầu tiên là gì? Thuốc nhuộm bổ sung là gì?
4. Liệt kê hai loài vi khuẩn gây bệnh có khả năng sinh bào tử.
5. Bào tử có chức năng gì?
6. Tại sao bào tử khó bị nhuộm màu?
7. Điểm chung của phương pháp nhuộm bào tử Schaeffer-Fulton với phương pháp nhuộm kháng acid Ziehl-Neelsen là gì?

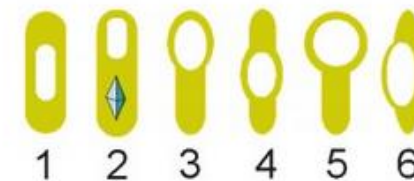


Hình 27. Sự hình thành nội bào tử của *Bacillus anthracis*

(1) vách ngăn của bào tử bắt đầu cô lập bản sao DNA mới và một phần nhỏ nguyên sinh chất; (2) màng nguyên sinh chất bắt đầu bọc xung quanh DNA, nguyên sinh chất và màng được tạo thành ở bước 1; (3) vách ngăn bào tử bao bọc xung quanh phần được cô lập, tạo tiền bào tử; (4) lớp peptidoglycan được tạo thành ở giữa hai lớp màng; (5) vỏ bào tử được tạo thành; (6) nội bào tử tách ra khỏi tế bào



Hình 28. Cách tiến hành nhuộm nội bào tử



Hình 29. Hình thái của nội bào tử

(1, 4) nội bào tử nằm ở tâm tế bào; (2, 3, 5) nội bào tử nằm về phía một cực của tế bào; (6) nội bào tử nằm lệch tâm tế bào.

Bài 2.7

NHUỘM VỎ NHẦY

1. GIỚI THIỆU

Một số vi khuẩn có một lớp mỏng bao xung quanh tế bào đó là vỏ nhầy (*capsule*) (Hình 31). Thành phần hóa học, độ dày của vỏ nhầy thay đổi tùy theo loài vi khuẩn. Thành phần hóa học chính của vỏ nhầy là polysaccharide, polypeptide và glycoprotein. Thông thường các loại vi khuẩn có lớp vỏ nhầy dày sẽ có độc lực mạnh hơn các loại vi khuẩn có lớp vỏ nhầy mỏng hoặc không có vỏ nhầy do lớp vỏ nhầy có thể giúp vi khuẩn chống lại quá trình thực bào của cơ thể vật chủ. Tuy nhiên, không phải lúc nào cũng có thể xác định được vỏ nhầy thông qua kỹ thuật nhuộm đơn giản như kỹ thuật nhuộm âm bản với mực tàu (*India ink*). Vùng không bắt màu thuốc nhuộm xung quanh tế bào vi khuẩn có thể là một vùng trống hình thành giữa tế bào và môi trường xung quanh trong quá trình hơi nóng tạo vết bôi. Hai phương pháp nhuộm vỏ nhầy thông dụng hiện nay là phương pháp của Anthony hoặc phương pháp của Graham và Evans.

Quy trình nhuộm vỏ nhầy của Anthony (Hình 30) sử dụng hai loại hóa chất. Hóa chất đầu tiên là phẩm nhuộm crystal violet. Crystal violet sẽ nhuộm tế bào và vỏ nhầy bắt màu tím. Không như tế bào, vỏ nhầy không chứa các ion và thuốc nhuộm không thể bám chặt vào nhầy. Dung dịch CuSO_4 sẽ được sử dụng làm chất tẩy màu và sẽ loại crystal violet ra khỏi vỏ nhầy. Cùng lúc CuSO_4 sẽ là phẩm nhuộm bổ sung bám chặt vào vỏ nhầy và làm vỏ nhầy bắt màu xanh nhạt hoặc hồng. Với cách nhuộm này, không cần phải tạo vết bôi có nghĩa là không cần sử dụng nhiệt để cố định tế bào vào phiến kính từ đó không tạo vùng không màu (*clear zone*) xung quanh tế bào vi khuẩn.

Nhiều loại vi khuẩn như *Bacillus anthracis* (gây bệnh than), *Streptococcus mutans* (gây sâu răng), *Streptococcus pneumoniae* (gây bệnh viêm phổi) có khả năng tạo vỏ nhầy. Trong y học, việc xác định các vi sinh vật có khả năng sinh vỏ nhầy giúp xác định độc lực của vi sinh vật và mức độ gây bệnh của chúng.

2. VẬT LIỆU

- + *Klebsiella pneumoniae* và *Alcaligenes denitrificans* được nuôi cấy 18 giờ trên môi trường sữa gầy.

- + Dung dịch Tyler's crystal violet hoặc dung dịch 1.0 % Gram's crystal violet.
- + Dung dịch 20% (w/v) $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$.
- + Dung dịch 70% ethyl alcohol.
- + Mực tàu.
- + Dung dịch Safranin.
- + Chất tẩy rửa gia dụng.
- + Dầu soi kính, giấy thấm, que cấy vòng...

3. CÁCH TIẾN HÀNH

3.1. Phương pháp của Anthony

1. Dùng bút chì sếp ghi tên vi sinh vật vào cạnh trái của phiến kính.
2. Dùng que cấy vòng chuyển sinh khối vi sinh vật lên phiến kính và tạo vết bôi. Sau đó để khô tự nhiên. Không được dùng nhiệt để cố định vết bôi vì sẽ làm tế bào vi sinh vật bị co lại từ đó làm sai lệch kết quả.
3. Phủ Tyler's crystal violet lên vết bôi và để yên trong 4-7 phút (Hình 30).
4. Rửa kỹ vết bôi bằng dung dịch 20% (w/v) $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$.
5. Làm khô phiến kính.
6. Cho một giọt dầu soi kính lên vết nhuộm và quan sát dưới kính hiển vi quang học nền sáng. Chụp ảnh tiêu bản. Vỏ nhầy là phần không màu bao xung quanh tế bào vi khuẩn bắt màu sẫm.

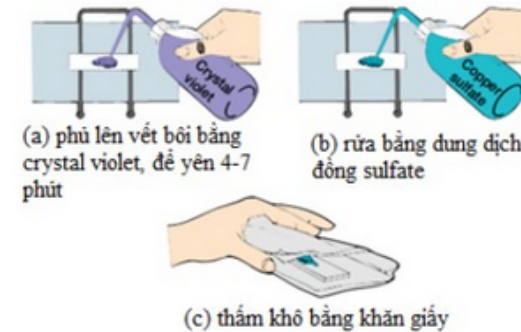
3.2. Phương pháp của Graham và Evans

1. Rửa sạch phiến kính bằng chất tẩy rửa gia dụng và alcohol.
2. Dùng que cấy vòng lấy sinh khối vi sinh vật và trộn đều với một giọt nhỏ mực tàu ở một đầu của phiến kính.
3. Dùng một phiến kính thứ hai để trải giọt mực thành một lớp mỏng trên phiến kính đầu tiên để tạo thành vết bôi.
4. Để vết bôi khô tự nhiên.
5. Rửa thật nhẹ nhàng vết bôi bằng nước, cố gắng không để vi sinh vật bị rửa trôi khỏi phiến kính.

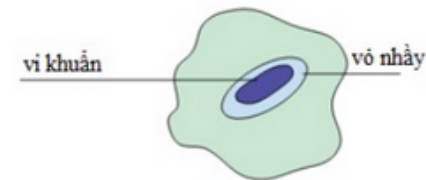
6. Phủ crystal violet (dùng để nhuộm Gram) lên vết bôi trong 1 phút.
7. Rửa lại bằng nước. Làm khô.
8. Dùng safranin phủ lên vết bôi trong 1.5 phút.
9. Rửa lại bằng nước và làm khô.
10. Nhỏ một giọt dầu soi kính lên tiêu bản và quan sát dưới kính hiển vi quang học nền sáng. Chụp ảnh tiêu bản.
11. Vỏ nhầy là một vùng không màu (*clear zone*) bao xung quanh tế bào vi sinh vật có màu từ hồng đến đỏ. Nền xung quanh có màu tối sẫm.

4. CÂU HỎI KIỂM TRA

1. Ba loại hóa chất nào được sử dụng để nhuộm vỏ nhầy?
2. Vỏ nhầy có mối liên hệ như thế nào với khả năng gây bệnh của vi sinh vật?
3. Vai trò của dung dịch đồng sulfate trong quy trình nhuộm vỏ nhầy.
4. Tại sao việc sử dụng nhiệt để cố định vi sinh vật lên phiến kính cần phải tránh khi nhuộm vỏ nhầy?
5. Nhuộm vỏ nhầy có tầm quan trọng như thế nào trong các thí nghiệm về vi sinh trong y dược học?
6. Kể tên một số loài vi khuẩn có khả năng tạo vỏ nhầy.
7. Vai trò của vỏ nhầy đối với tế bào vi khuẩn là gì?



Hình 30. Cách tiến hành nhuộm vỏ nhầy theo phương pháp của Anthony



Hình 31. Kết quả nhuộm vỏ nhầy theo phương pháp của Anthony (vỏ nhầy là vùng không màu được bao xung quanh bởi nền bắt màu sẫm)

Bài 2.8

NHUỘM TIỀN MAO

(Phương pháp West và Difco's SpotTest)

1. GIỚI THIỆU

Tiền mao (*flagella*) của vi khuẩn là một cơ quan vận động hình sợi (Hình 33, 34). Đó là những sợi mảnh (đường kính từ 10 đến 30 nm) và có thể được quan sát trực tiếp bằng kính hiển vi điện tử. Để quan sát tiền mao bằng kính hiển vi quang học nền sáng, cần làm tăng độ dày của tiền mao bằng cách bọc chúng với chất cắn màu như tannic acid ($C_{76}H_{52}O_{46}$) hay potassium alum ($KAl(SO_4)_2$) và nhuộm chúng với basic fuchsin (phương pháp Gray), pararosaniline (phương pháp Leifson), bạc nitrate (phương pháp West) (Hình 32), hay crystal violet (phương pháp của Difco). Mặc dù quy trình nhuộm tiền mao rất khó thực hiện, nhưng chúng rất hữu dụng nhằm cung cấp thông tin về sự có mặt và vị trí của tiền mao, từ đó giúp định danh vi khuẩn.

Phương pháp nhuộm tiền mao Difco's SpotTest sử dụng một phẩm nhuộm đầu tiên là crystal violet pha trong cồn cùng với chất cắn màu là tannic acid và aluminum potassium sulfate. Trong quá trình nhuộm cồn sẽ bị bay hơi, crystal violet sẽ kết tủa xung quanh tiền mao, từ đó làm tăng kích thước tiền mao.

2. VẬT LIỆU

- + *Alcaligenes faecalis* (có tiền mao loại peritrichous) và *Pseudomonas fluorescen* (có tiền mao nằm ở cực tế bào) được nuôi cấy 18 giờ trên môi trường thạch nghiêng SA (soy agar).
- + Phẩm nhuộm West: dung dịch A và dung dịch B.
- + Phẩm nhuộm Difco's SpotTest.
- + Phiến kính hình chữ nhật, giấy thấm,...

3. CÁCH TIẾN HÀNH

3.1. Phương pháp West

1. Cho ba giọt nước vô trùng lên phiến kính hình chữ nhật (Hình 32).
2. Dùng que cấy vòng chuyển dung dịch đục chứa vi khuẩn dưới đáy ống nghiệm thạch nghiêng và nhẹ nhàng hòa vào giọt nước trên phiến kính tạo thành một vùng diện tích rộng khoảng 3.0 cm.
3. Để phiến kính khô tự nhiên.
4. Phủ lên vết bôi dung dịch A (chất cắn màu) trong khoảng 4 phút.
5. Rửa bằng nước.
6. Cắt một mẫu giấy thấm có kích thước bằng bề ngang phiến kính và phủ lên vết bôi, sau đó nhỏ dung dịch B lên mẫu giấy thấm.
7. Chuẩn bị một cốc nước được đun sôi đặt trong tủ hút khí độc. Đặt phiến kính lên cốc nước trong 5 phút. Bỏ sung phẩm nhuộm để mẫu giấy thấm không bị khô.
8. Lấy mẫu giấy thấm ra khỏi phiến kính. Dùng nước cất để rửa sạch dung dịch B. Phủ ngập phiến kính bằng nước cất trong 1 phút để phân bạc nitrate còn lại nổi lên trên mặt nước.
9. Rửa lại thật kỹ một lần nữa bằng nước và vẩy mạnh phiến kính để loại bỏ nước.
10. Để phiến kính khô tự nhiên.
11. Nhỏ một giọt dầu soi kính lên phiến kính để quan sát. Vị trí rửa phiến kính là nơi quan sát tốt nhất vì ở đó mật độ vi khuẩn thưa. Chụp ảnh tiêu bản.

3.2. Phương pháp Difco

1. Cho một giọt nước vô trùng vào một phần ba phiến kính hình chữ nhật (về phía tay cầm).
2. Dùng que cấy vòng nhẹ nhàng chạm vào một khuẩn lạc cần nghiêng cứu, sau đó nhẹ nhàng chạm vào giọt nước (không chạm vào phiến kính). Không trộn.
3. Nghiêng nhẹ phiến kính để giọt nước trượt về phía đầu còn lại.
4. Để phiến kính khô tự nhiên. Không dùng nhiệt để làm khô.
5. Phủ dung dịch Difco's SpotTest lên vết vi khuẩn.

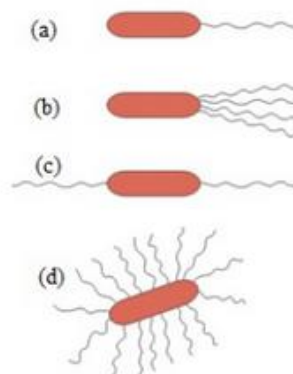
6. Để yên trong 4 phút (thời gian nhuộm thường kéo dài từ 2 đến 8 phút tùy theo tuổi của vi khuẩn, thời gian bảo quản của phẩm nhuộm, nhiệt độ, và lượng phẩm nhuộm sử dụng).
7. Đặt phiến kính nằm ngang và rửa thật nhẹ nhàng bằng nước cất.
8. Nhẹ nhàng nghiêng phiến kính để nước bị trôi đi.
9. Để phiến kính khô tự nhiên ở nhiệt độ phòng.
10. Quan sát dưới kính hiển vi quang học với một giọt dầu soi kính nhỏ lên phiến kính. Vị trí quan sát tốt nhất là ở rìa vết vi khuẩn. Chụp ảnh tiêu bản.

4. CÂU HỎI KIỂM TRA

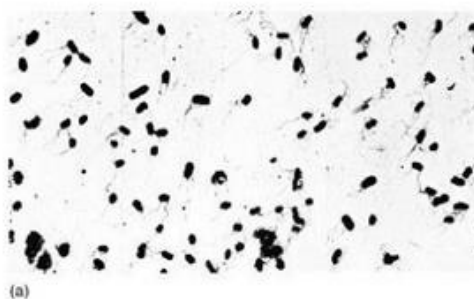
1. Tại sao nhuộm tiên mao là một kỹ thuật khó thực hiện?
2. Tại sao khi nhuộm tiên mao cần sử dụng chủng vi khuẩn “trẻ”?
3. Tại sao phiến kính hình chữ nhật cần được làm sạch vết dầu/mỡ trước khi nhuộm tiên mao?
4. Kể tên bốn loại tiên mao?
5. Chất cắn màu là chất nào?
6. So sánh về sự hữu ích của tiêu bản nhuộm tiên mao và tiêu bản giọt treo?
7. Kích thước của tiên mao thay đổi như thế nào trong quá trình nhuộm tiên mao?



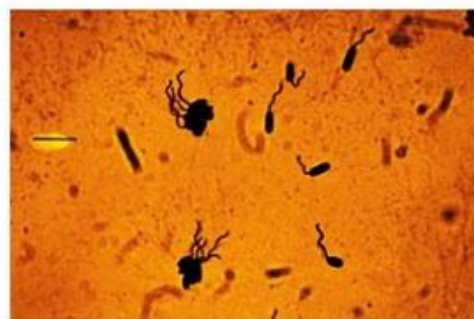
Hình 32. Phương pháp nhuộm tiên mao (theo phương pháp West)



Hình 33. Vị trí của tiên mao trên vi khuẩn



(a)



(b)

Hình 34. Tiêu bản nhuộm tiên mao theo phương pháp West được quan sát bằng kính hiển vi quang học nền sáng

Chương 3 CÁC KỸ THUẬT NUÔI CẤY VI SINH VẬT

Chương này giới thiệu một số kỹ thuật cơ bản trong phòng thí nghiệm vi sinh nhằm chuẩn bị và tiệt trùng môi trường để từ đó phân lập vi sinh vật từ các mẫu khác nhau và cũng để cấy chuyển vi sinh vật. Ngoài ra, một số kỹ thuật cơ bản nhằm định lượng vi sinh vật cũng được giới thiệu trong chương này.

Bài 3.1

CHUẨN BỊ MÔI TRƯỜNG NUÔI CẤY VI SINH VẬT VÀ TIỆT TRÙNG

1. GIỚI THIỆU

1.1. Môi trường nuôi cấy vi sinh vật

Sự sinh trưởng và phát triển của vi sinh vật phụ thuộc vào các chất dinh dưỡng và điều kiện môi trường. Căn cứ theo trạng thái vật lý, có ba loại môi trường: môi trường lỏng (*broth media*), môi trường bán rắn (*semisolid media*) và môi trường rắn (*solid media*). Chất làm rắn thường được sử dụng là agar. Một số môi trường lỏng như NB (*nutrient broth*) hay TSB (*tryptic soy broth*), hay BHI (BHIM hay BHIB hay *brain-heart infusion broth*) thường được sử dụng để tăng sinh vi sinh vật trong các nghiên cứu về lên men hay các thí nghiệm về hóa sinh học. Môi trường bán rắn thường được sử dụng trong các nghiên cứu về lên men, xác định khả năng di động của vi khuẩn hay tạo điều kiện cho vi khuẩn kỵ khí phát triển. Môi trường rắn như NA (*nutrient agar*) hay BA (*blood agar*) thường được dùng để (a) tạo điều kiện cho vi sinh vật phát triển trên bề mặt môi trường nhằm quan sát hình thái khuẩn lạc, (b) phân lập các giống vi sinh vật thuần khiết, (c) giữ giống vi sinh vật và (d) thực hiện một số phản ứng hóa sinh học.

Môi trường rắn, khi còn ở trạng thái lỏng, được rót vào ống nghiệm hay đĩa petri (Hình 35). Ống nghiệm thạch nghiêng (*slant agar*) được tạo thành nếu môi trường được để rắn lại ở vị trí nghiêng trong ống nghiệm. Ống nghiệm thạch sâu (*agar deep tube*) được tạo thành khi môi trường được để rắn lại ở vị trí thẳng đứng. Môi trường đĩa thạch (*agar plate*) được tạo thành nếu môi trường được để rắn lại trong đĩa petri. Môi trường thạch lỏng (*agar pour hay agar deep*) là môi trường agar ở trạng thái lỏng (có nhiệt độ > 42°C) dùng để chuẩn bị môi trường đĩa thạch.

Vi sinh vật được nuôi cấy trên hai loại môi trường khác nhau. Môi trường hóa học (*chemically defined media*), còn gọi là môi trường tổng hợp (*synthetic media*), là môi trường có các thành phần xác định là các hóa chất tinh khiết. Những loại môi trường này thường sử dụng để nuôi cấy các vi sinh vật tự dưỡng như vi tảo hay các vi sinh vật dị dưỡng để tính. Trong các nghiên cứu về vi sinh vật, môi trường phức tạp (*complex media hay nonsynthetic media*) thường được sử dụng. Những loại môi trường này có thành phần phức tạp giàu vitamin và chất khoáng. Ba

thành phần chính thường được sử dụng là cao thịt bò (*beef extract*), cao nấm men (*yeast extract*) và pepton.

Môi trường thương mại dạng bột khô đem lại sự tiện dụng cho người sử dụng. Các môi trường này thường kèm theo hướng dẫn sử dụng in trên nhãn. Nếu môi trường không có agar, bột môi trường có thể hòa tan vào nước ở nhiệt độ phòng. Nếu môi trường có agar, bột môi trường cần hòa vào nước sau đó đun nhẹ để hòa tan hoàn toàn.

Trong một số nghiên cứu, môi trường thường được cho vào ống nghiệm hay bình tam giác và sau đó được tiệt trùng. Các loại ống nghiệm thường dùng là loại 18×150 mm, 16×125 mm hay 13×100 mm. Thường sử dụng bông gòn không thấm nước, nút xốp mềm, nút nhựa cứng hay nắp kim loại để đậy. Các loại nút hay nắp này giúp môi trường bên trong duy trì điều kiện vô trùng trong khi vẫn cho phép không khí đi qua do đó chúng cũng giúp giảm thiểu sự bốc hơi. Trong một số trường hợp, loại nắp vặn rất hữu dụng vì chúng có thể giúp bảo quản môi trường trong một thời gian dài. Môi trường có thể được phân phối bằng pipette hoặc bơm tiêm tự động (*automatic syringe*) với một thể tích chính xác (Hình 36).

1.2. Tiệt trùng môi trường và dụng cụ

Tiệt trùng là quá trình tiêu diệt tất cả các hình thức của sự sống. Có ba cách cơ bản để tiệt trùng môi trường và dụng cụ. Cách đơn giản và hiệu quả nhất là hấp trong autoclave (Hình 39, 40). Trong autoclave, môi trường và dụng cụ sẽ được tiệt trùng ở 121°C, áp suất 15 psi trong tối thiểu 15 phút (Hình 41). Ở điều kiện này, vi sinh vật và nội bào tử của chúng chỉ có thể tồn tại trong thời gian tối đa là 12-13 phút. Hầu hết các loại autoclave ngày nay đều được thiết kế để trục xuất toàn bộ không khí ra khỏi autoclave và bên trong autoclave hoàn toàn là hơi nước (*steam*). Nhiệt độ và thời gian tiệt trùng sẽ được kiểm soát tự động. Các loại môi trường và dụng cụ không bị hỏng ở 121°C đều được tiệt trùng bằng cách này.

Thông thường, các dụng cụ thủy tinh (pipette, đĩa petri, bình tam giác...) sẽ được tiệt trùng bằng autoclave. Tuy nhiên, nước ngưng tụ vẫn còn lưu lại trong các dụng cụ này sau quá trình tiệt trùng do đó cần phải tiếp tục sấy để loại bỏ lượng nước này. Ngoài ra, các dụng cụ thủy tinh có thể được tiệt trùng khô (*dry-heat sterilization*) bằng cách đặt chúng trong tủ sấy ở nhiệt độ 160-170°C. Do hiệu quả tiệt trùng của nhiệt khô (trong tủ sấy) kém hơn nhiệt ẩm (trong autoclave) nên thời gian sấy cần kéo dài tối thiểu 2 giờ hoặc lâu hơn. Nếu nhiệt độ tủ sấy lớn hơn 180°C thì giấy và nút bông sẽ bị cháy thành than.

Trong một số trường hợp, một số thành phần của môi trường sẽ bị phá hủy ở nhiệt độ cao (chẳng hạn 121°C). Trong trường hợp này, môi

trường có thể được tiệt trùng bằng cách sử dụng bộ lọc vi sinh (*bacteriological filter*) (Hình 38). Bộ lọc vi sinh sẽ loại bỏ vi khuẩn và những vi sinh vật có kích thước lớn ra khỏi môi trường mà không cần phải tăng nhiệt độ. Thông thường, màng lọc loại cellulose hay polycarbonate hay được sử dụng để tiệt trùng môi trường. Tuy nhiên cần phải lưu ý, nếu kích thước lỗ lọc (*spore size*) lớn hơn 0.22 μm thì không đủ để loại bỏ vi sinh vật trong môi trường và môi trường không được tiệt trùng phù hợp (Hình 37). Thông thường phễu lọc được hút chân không (*filter flask*) dùng với bơm hút chân không hay bơm tiêm (*syringe*) với áp suất dương sẽ tạo lực đẩy chất lỏng đi qua màng lọc.

Tia cực tím (*UV, ultraviolet*) có bước sóng khoảng 260 nm có tác dụng tiêu diệt vi sinh vật. Tuy nhiên, tia UV không có khả năng xuyên tốt qua thủy tinh, tấm film bản, nước hay các thành phần vật liệu khác. Do nhược điểm này, tia UV chỉ được sử dụng trong một số trường hợp cụ thể. Chẳng hạn, đèn UV được đặt trên trần nhà hay trong các tủ an toàn sinh học (còn được gọi là tủ cấy vi sinh, *biological safety cabinet*) để tiệt trùng không khí và các bề mặt.

Một số loại dụng cụ sử dụng vật liệu không chịu nhiệt như đĩa petri nhựa, bơm tiêm, chỉ khâu y tế... có thể được tiệt trùng bằng khí ethylen oxide ($\text{C}_2\text{H}_4\text{O}$). Khí ethylen oxide tiêu diệt cả vi sinh vật và nội bào tử của chúng bằng cách liên kết cộng hóa trị với protein của tế bào. Đây là phương pháp rất nhanh và có hiệu quả tốt với các dụng cụ đã được bao gói vì ethylen có thể thấm qua bao bì kể cả bao bì plastic.

2. VẬT LIỆU

- + *Escherichia coli* được nuôi cấy 24-48 giờ trong môi trường TSA (tryptic soy agar).
- + Thiết bị tiệt trùng autoclave.
- + Ống nghiệm, bình tam giác, pipette các loại...
- + Các loại môi trường Glucose-mineral salts broth, TSB (*tryptic soy broth*).

3. CÁCH TIẾN HÀNH

3.1. Chuẩn bị ống nghiệm thạch nghiêng và ống nghiệm môi trường thạch sâu

Để làm ống nghiệm thạch nghiêng, môi trường được tiệt trùng trong autoclave. Sau đó khi tiệt trùng, môi trường nóng chảy được lấy ra và đặt trên một phẳng ngang với phần đầu được kê cao hơn so với đáy

ống nghiệm sao cho môi trường bên trong chiếm khoảng $\frac{2}{3}$ chiều cao ống nghiệm. Để yên ở nhiệt độ phòng để môi trường đông đặc lại hoàn toàn. Ống nghiệm thạch nghiêng được bảo quản ở vị trí thẳng đứng (Hình 35).

Ống nghiệm thạch sâu được chuẩn bị tương tự ống nghiệm thạch nghiêng nhưng môi trường được để nguội và đông cứng ở trạng thái thẳng đứng (Hình 35). Môi trường ống nghiệm thạch sâu sau khi được tiệt trùng có thể được bảo quản để chuẩn bị môi trường đĩa thạch khi cần thiết. Môi trường thạch sâu có thể được bảo quản trong vòng vài ngày. Để bảo quản lâu hơn, môi trường thạch sâu phải được bảo quản trong điều kiện mát (5 đến 10°C) để tránh agar bị khô.

3.2. Chuẩn bị đĩa thạch

Khi cần đĩa thạch để sử dụng, môi trường thạch sâu sẽ được đun cách thủy hoặc được cho vào autoclave (121°C trong 30-60 giây) để làm chảy lỏng, sau đó được giữ trong bể ổn nhiệt (*water bath*) ở 48-50°C tối thiểu 5-10 phút trước khi sử dụng (Hình 42). Môi trường agar cần được làm nguội đến khoảng 50°C trước khi sử dụng để làm giảm thiểu hơi nước ngưng tụ trên nắp đĩa petri khi môi trường được rót vào đĩa. Agar sẽ đông cứng lại khi nhiệt độ nhỏ hơn 42°C. Khi môi trường thạch sâu đạt khoảng 50°C, ống nghiệm thạch sâu sẽ được lấy ra khỏi bể ổn định nhiệt, được lau khô bên ngoài ống. Nút hay nắp sẽ được tháo ra và đầu ống sẽ được hơ nhẹ trên ngọn lửa. Sau đó, môi trường sẽ được chuyển sang một đĩa petri đã vô trùng và làm khô trước đó (ống nghiệm và đĩa petri không chạm nhau để tránh nhiễm chéo vi sinh vật). Nắp đĩa petri được đặt lại, để yên để môi trường agar đông cứng. Đĩa thạch được lưu trữ ở trạng thái lật sấp với nắp đĩa nằm dưới.

3.3. Chuẩn bị môi trường tổng hợp

- 1) Chuẩn bị 500 ml môi trường glucose-mineral salts broth để nuôi cấy *E.coli*. Sử dụng bình tam giác (*erlenmeyer flask*) loại 1 lít, bổ sung khoảng 375 ml nước cất. Cân từng thành phần (theo thứ tự từ trên xuống dưới) của môi trường và cho vào bình tam giác và khuấy đều để hòa tan hoàn toàn từng thành phần mới cho vào.
- 2) Chính về pH 7.2 đến 7.4 bằng cách bổ sung vài giọt NaOH hay HCl. Định mức cho đủ 500 ml bằng nước cất.
- 3) Dùng pipette cho 3 đến 5 ml môi trường glucose-mineral salts broth vào các ống nghiệm. Đậy ống nghiệm bằng nút bông gòn không thấm hoặc các loại nút/nắp khác.

3.4. Chuẩn bị môi trường phức tạp

- 1) Chuẩn bị 500 ml môi trường TSB (*tryptic soy broth*).
- 2) Cho 375 ml nước cất vào bình tam giác loại 1 lít, sau đó bổ sung từng thành phần của môi trường và hòa tan hoàn toàn.
- 3) Bổ sung 125 ml nước cất cho đủ 500 ml.
- 4) Chính về pH 7.3 bằng vài giọt NaOH hay HCl.
- 5) Dùng pipette để chuyển 3 đến 5 ml môi trường vào các ống nghiệm. Đậy ống nghiệm bằng nút bông gòn không thấm hoặc các loại nút/nắp khác.
- 6) Với phần môi trường còn lại (450 ml), bổ sung 7.2 g agar (sao cho hàm lượng agar khoảng 1.6%). Đun nóng và khuấy/lắc từ từ đến khi agar tan hoàn toàn. Bọc kín miệng bình tam giác bằng giấy nhôm (*aluminium foil*) và tiệt trùng môi trường trong autoclave. Sau đó, làm nguội môi trường trong bể ổn nhiệt (48-50°C).
- 7) Đặt các đĩa petri đã tiệt trùng và sấy khô trong tủ cấy vi sinh.
- 8) Mở nắp chụp bằng giấy nhôm và hơi nhẹ miệng bình tam giác trên ngọn lửa.
- 9) Mở nắp đĩa petri và rót khoảng 15 ml môi trường vào đĩa (chiều dày của môi trường trong đĩa khoảng 3-5 cm), đậy nắp đĩa petri. Sau đó lập tức chuyển sang rót môi trường vào các đĩa còn lại. Chờ cho đến khi môi trường trong đĩa petri đông cứng lại (10-15 phút). Đĩa thạch được lưu trữ ở trạng thái lật sấp với nắp đĩa nằm dưới.
- 10) Có thể sử dụng môi trường thạch sâu trong ống nghiệm đã được làm chảy lỏng (48-50°C) để rót vào đĩa petri.
- 11) Nên sử dụng môi trường đĩa thạch trong vòng 24 giờ để đảm bảo điều kiện vô trùng vẫn còn được duy trì.

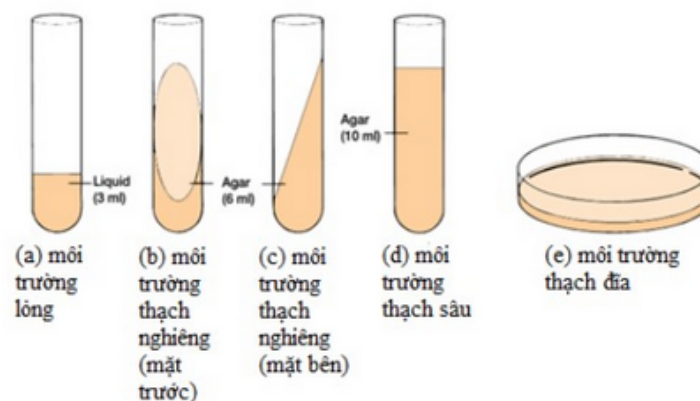
3.5. Tiệt trùng môi trường và dụng cụ

- 1) Chỉ được sử dụng autoclave sau khi được người phụ trách phòng thí nghiệm hướng dẫn cụ thể. Đọc kỹ hướng dẫn sử dụng trước khi dùng autoclave.
- 2) Cho môi trường và dụng cụ vào trong autoclave (Hình 39, 40).
- 3) Đóng chặt cửa autoclave.

- 4) Bật công tắc điện. Cài đặt nhiệt độ tiệt trùng (121°C) và thời gian tiệt trùng (15 phút hoặc lâu hơn).
- 5) Bắt đầu tiệt trùng bằng cách nhấn nút *start* hoặc bật nút vặn sang vị trí *start*.
- 6) Khi kết thúc giai đoạn tiệt trùng, áp suất trong autoclave sẽ giảm dần về giá trị 0. Cần thận và chậm rãi mở cửa autoclave. Chờ vài phút để hơi nước thoát ra khỏi autoclave. Sử dụng găng tay chịu nhiệt để lấy đồ vật bên trong autoclave.

4. CÂU HỎI KIỂM TRA

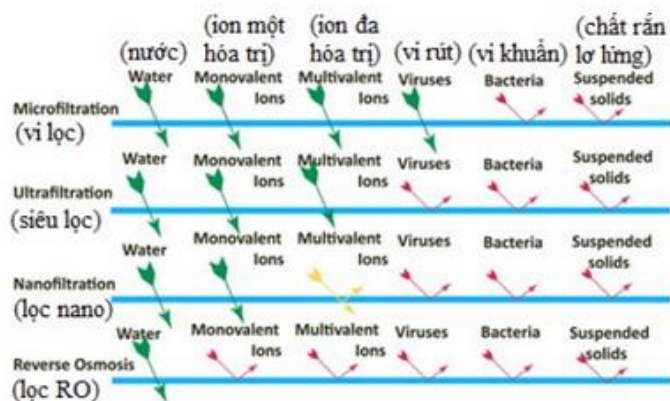
- 1) Căn cứ theo trạng thái vật lý, trình bày ba loại môi trường nuôi cấy vi sinh vật?
- 2) Môi trường tổng hợp và môi trường phức tạp có điểm gì khác nhau?
- 3) Tại sao phải tiệt trùng môi trường trước khi sử dụng?
- 4) Trình bày các phương pháp tiệt trùng môi trường và dụng cụ?
- 5) Lại sao phải lưu trữ môi trường đĩa thạch ở trạng thái lật sấp?
- 6) Tại sao môi trường cần phải làm nguội đến 48-50°C trước khi đổ vào đĩa petri?
- 7) Đầu là nguồn carbon và nguồn nitrogen trong môi trường glucose-mineral salts broth và TSB?



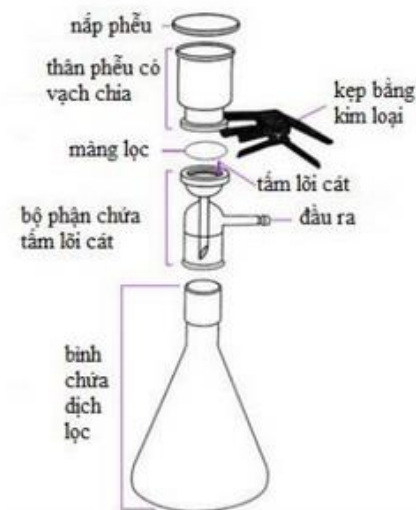
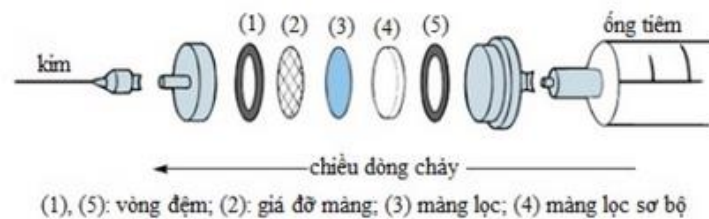
Hình 35. Các hình thức môi trường nuôi cấy khác nhau với thể tích phù hợp cho mỗi loại



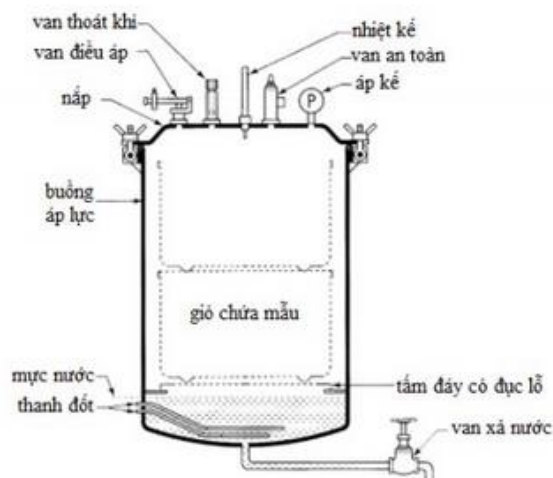
Hình 36. Bơm tiêm tự động dùng để phân phối môi trường



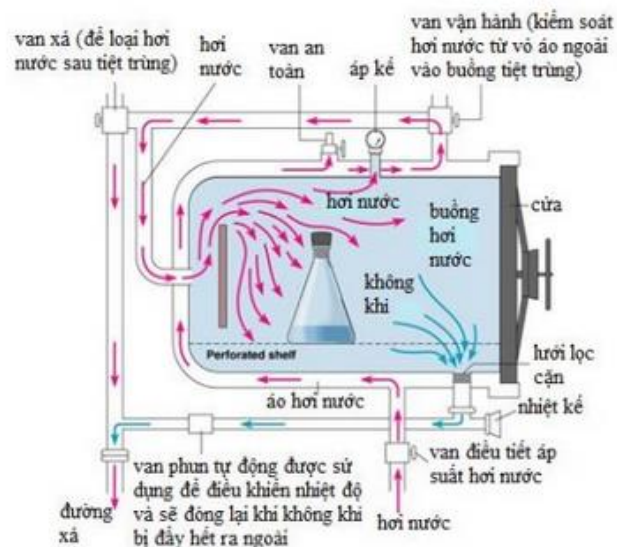
Hình 37. Một số loại màng lọc



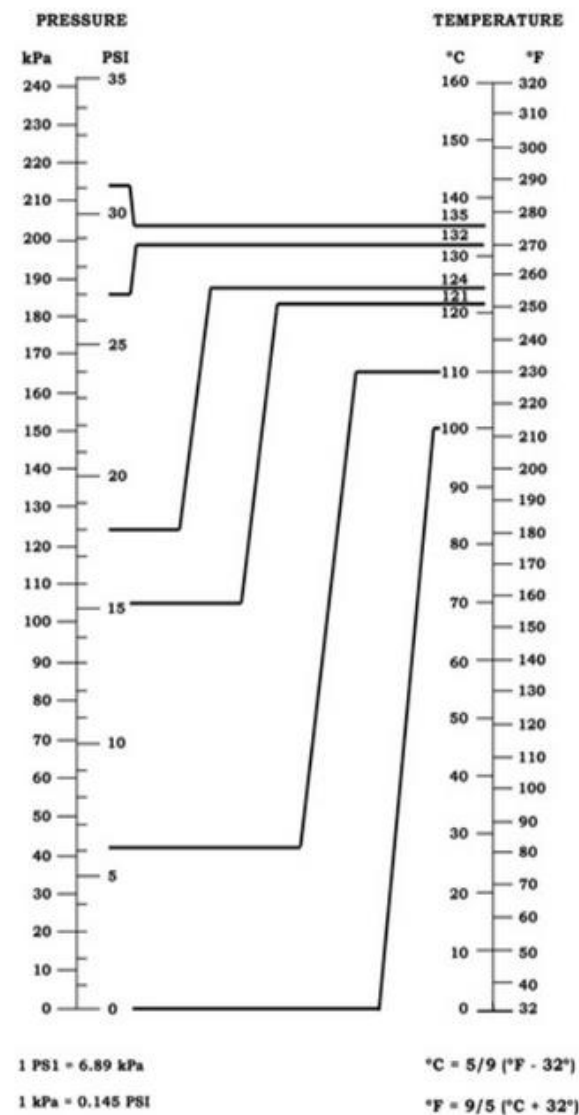
Hình 38. Bộ bơm tiêm và phễu lọc cùng với màng lọc dùng để tiết trùng một thể tích nhỏ môi trường



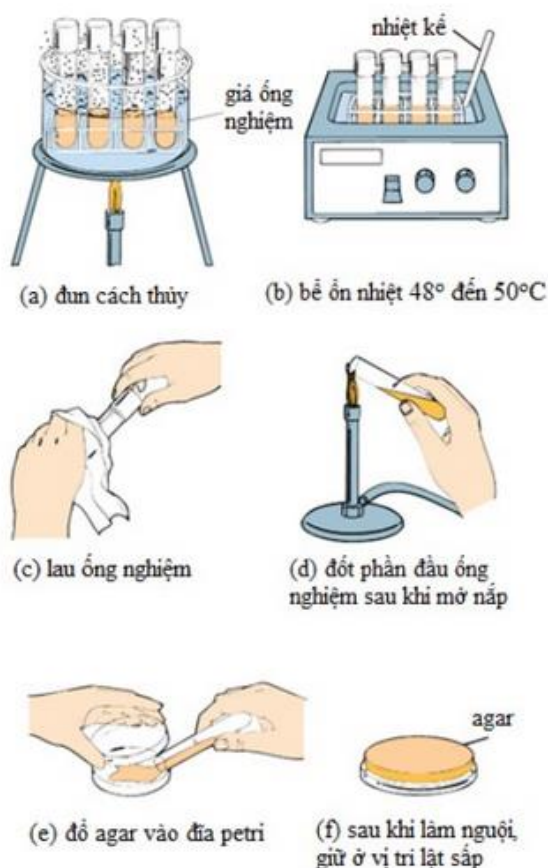
Hình 39. Autoclave loại một lớp vỏ bao
(thường dùng trong các phòng thí nghiệm)



Hình 40. Autoclave loại hai lớp vỏ bao
(thường dùng ở quy mô lớn)



Hình 41. Tương quan giữa nhiệt độ và áp suất trong autoclave



Hình 42. Chuẩn bị môi trường đĩa thạch

Bài 3.2

CHUYỂN GIỐNG VI SINH VẬT, PHÂN LẬP VÀ BẢO QUẢN GIỐNG THUẦN KHIẾT

1. GIỚI THIỆU

1.1. Giới thiệu về các dụng cụ và kỹ thuật nuôi cấy vi sinh vật

Pipette là dụng cụ thường dùng để định lượng và chuyển chất lỏng, pha loãng dung dịch và hòa tan các chất (Hình 43, 44, 45). Có hai loại pipette thường được dùng là (a) pipette thổi ra (*blow-out pipette*) hay còn được gọi là pipette huyết thanh (*serological pipette*) và (b) pipette phân phối (*to-deliver pipette* hay *Mohr measuring pipette*). Với loại pipette thổi ra (có hai vòng tròn khắc dấu ở phần đuôi pipette), một lượng nhỏ dung dịch cuối cùng ở đầu pipette phải được thổi ra để đảm bảo đúng lượng thể tích cần chuyển. Với loại pipette phân phối, sau khi lượng thể tích cần thiết đã được chuyển, sẽ còn một lượng nhỏ dung dịch vẫn còn nằm ở đầu pipette và không được thổi ra.

Để hút dung dịch vào pipette, một bầu bóp (*bulb*) hoặc một dụng cụ hút sẽ được sử dụng (Hình 46). Tuyệt đối không dùng miệng để hút dung dịch vào pipette. Khi hút dung dịch vào pipette, thể tích chính xác được xác định bởi vị trí của mặt cong chất lỏng so với các vạch chia trên pipette. Pipette phải được làm sạch, tiệt trùng (nếu cần) và làm khô trước khi sử dụng. Để đảm bảo duy trì điều kiện vô trùng, pipette trước khi tiệt trùng được giữ trong hộp chứa hoặc bọc trong giấy nhôm.

Que cấy thẳng (*inoculating needle*) và que cấy vòng (*inoculating loop*) (Hình 48) dùng để chuyển vi sinh vật từ ống nghiệm thạch nghiêng, môi trường lỏng hoặc môi trường đĩa thạch sang một môi trường nuôi cấy mới. Que cấy bao gồm phần tay cầm, trục, chóp giữ một sợi làm bằng platinum hay nickel-chromium. Với que cấy thẳng, sợi ở dạng thẳng. Với que cấy vòng, một đầu sợi tạo thành vòng tròn nhỏ. Trước khi sử dụng, que cấy được tiệt trùng bằng cách được đốt nóng trên ngọn lửa đèn cồn, đèn Bunsen hay thiết bị Bacti-Cinerator (Hình 47). Que cấy được tiệt trùng đúng cách khi dây cấy bị cháy đỏ. Que cấy cần được làm nguội và sử dụng ngay trước khi bị tái nhiễm vi sinh vật. Sau khi sử dụng, que cấy cần phải được tiệt trùng để loại bỏ vi sinh vật (Hình 49).

Vi sinh vật được chuyển từ môi trường này sang môi trường khác bằng kỹ thuật cấy chuyển (*subculturing*) với những quy trình chuyên biệt

và các kỹ thuật vô trùng (*aseptic technique*) (Hình 49, 50). Kỹ thuật vô trùng rất quan trọng vì nó được sử dụng trong hầu hết các thực nghiệm vi sinh. Vi sinh vật tồn tại ở khắp nơi trong khu vực làm thực nghiệm, do đó nếu không tuân thủ đúng kỹ thuật vô trùng, vi sinh vật từ ngoài môi trường sẽ xâm nhiễm vào dụng cụ hoặc môi trường nghiên cứu và gây ảnh hưởng đến kết quả. Kỹ thuật vô trùng còn bảo vệ người làm thực nghiệm khỏi những ảnh hưởng từ các vi sinh vật trong phòng thí nghiệm.

1.2. Giới thiệu về kỹ thuật phân lập giống vi sinh vật thuần khiết và phương pháp bảo quản giống

Sau khi được cấy rìa trên bề mặt môi trường đĩa thạch (Hình 57), khuẩn lạc vi sinh vật sẽ mọc riêng rẽ. Quc cấy sẽ được sử dụng để lấy vi sinh vật từ tâm một khuẩn lạc được lựa chọn và chuyển đến một môi trường nuôi cấy mới (ví dụ môi trường thạch nghiêng TSB) (Hình 51); tùy vào loại vi sinh vật mà một môi trường phù hợp sẽ được sử dụng. Nên lấy vi sinh vật ở tâm khuẩn lạc vì phần rìa khuẩn lạc dễ lẫn loại vi sinh vật khác. Bằng cách này, một giống vi sinh vật thuần khiết sẽ được thu nhận. Giống vi sinh vật thuần khiết (*pure culture* hay *stock culture*) là các vi sinh vật sinh trưởng từ một loài vi sinh vật duy nhất.

Một trong những vấn đề rất được quan tâm trong thực nghiệm vi sinh vật là bảo quản các giống vi sinh vật thuần khiết trong một thời gian dài. Các kỹ thuật bảo quản tốt sẽ giảm thiểu số lần phải cấy chuyển vi sinh vật. Thường vi sinh vật sẽ được chuyển sang trạng thái ngủ đông (*state of dormancy*) ở điều kiện nhiệt độ thấp hoặc ở trạng thái khử nước (*dehydration*). Để bảo quản trong một thời gian ngắn từ 1 đến 3 tháng, vi khuẩn hiếu khí trong các ống nghiệm thạch nghiêng được giữ ở 4 đến 10°C. Các ống nghiệm thạch nghiêng có nút vắn được ưu tiên sử dụng để môi trường bên trong không bị khô. Để bảo quản trong một thời gian lâu hơn, một lượng dầu khoáng (*mineral oil*) vô trùng sẽ được cho vào ống nghiệm thạch nghiêng để làm giảm sự mất ẩm của môi trường. Dầu khoáng trắng sẽ được tiệt trùng 1 giờ ở 110°C trong tủ sấy. Sau đó, dầu khoáng sẽ được chuyển vào trong ống nghiệm thạch nghiêng chứa giống vi sinh vật thuần khiết đã phát triển trên bề mặt môi trường. Lượng dầu khoáng phải cao hơn môi trường bên trong (ống nghiệm ở trạng thái đứng) một khoảng 0.5-1.0 cm. Ống nghiệm thạch nghiêng có dầu khoáng có thể được bảo quản ở nhiệt độ thường. Một số giống vi khuẩn có thể được bảo quản tốt ở ống nghiệm thạch nghiêng có dầu khoáng (*Bacillus*, phần lớn *Enterobacteriaceae*, một số loại thuộc *Micrococcus*, *Proteus*, *Pseudomonas* và *Streptococcus*). Tuy nhiên, một số giống vi khuẩn không phù hợp với cách bảo quản sử dụng dầu khoáng (*Azotobacter* và *Leuconostoc*). Trong một số trường hợp, giống vi sinh vật thuần khiết có

thể được bảo quản trong một thời gian khá dài mà không cần sử dụng dầu khoáng. *E.coli* và một số giống thuộc họ *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococci* và *Enterococci* có thể được bảo quản vài năm ở nhiệt độ phòng theo quy trình sau: Các vi khuẩn này được cấy đậm sâu vào môi trường thạch sâu Nutrient Agar (hàm lượng các chất dinh dưỡng được giảm 50%) hay môi trường chứa 0.7% agar trong nước cất. Sau đó ủ ở điều kiện nhiệt độ thích hợp qua đêm. Dùng loại nắp vắn để đậy kín ống nghiệm và quấn chặt chỗ tiếp giáp nắp-ống nghiệm bằng băng keo hay giấy paraffin sau đó lưu trữ ở nhiệt độ phòng.

Cách tốt nhất để bảo quản giống trong một thời gian dài là sử dụng kỹ thuật đông khô (*lyophilization*) hay còn gọi kỹ thuật sấy thăng hoa (*freeze-drying*). Phương pháp bảo quản này giúp giảm thiểu việc cấy chuyển định kỳ và các đột biến không mong muốn của giống vi sinh vật thuần khiết. Trong kỹ thuật này, vi sinh vật được huyền phù trong một dung dịch vô trùng chứa các chất bảo quản như sữa, huyết thanh hoặc 3% lactose. Một lượng huyền phù vi sinh vật được chuyển vào một lọ nhỏ chuyên dụng (*vial*) sau đó được lạnh đông nhanh trong hỗn hợp đá khô/alcohol, sau đó được cho vào thiết bị sấy thăng hoa. Cuối cùng, vial được đóng kín và có thể giữ được trong nhiều năm. Một số vi khuẩn kỵ khí nghiêm ngặt (*strict anaerobes*) hay vi khuẩn kỵ khí tùy ý (*facultative anaerobes*) có thể bị tổn thương khi tiếp xúc với oxy. Các vi khuẩn này cần được bảo quản trong môi trường thạch sâu. Quc cấy thẳng được sử dụng để lấy sinh khối vi khuẩn và được chọc thẳng sâu vào môi trường. Các vi khuẩn này sẽ phát triển bên trong môi trường, nơi không có oxy. Sau đó, các ống nghiệm thạch sâu chứa vi khuẩn sẽ được bảo quản ở nhiệt độ thấp. Vi khuẩn kỵ khí có thể được bảo quản trong môi trường lỏng thioglycollate broth hay môi trường thịt nấu chín (*cooked meat medium*).

2. VẬT LIỆU

- + *Lactobacillus* sp., *E.coli*, *Acetobacter* sp. được nuôi cấy trên môi trường TSB (*tryptic soy broth*) và TSA (*tryptic soy agar*) trong 24 giờ.
- + Ống nghiệm chứa môi trường TSB.
- + Ống nghiệm thạch nghiêng chứa môi trường TSA.
- + Ống nghiệm thạch sâu chứa môi trường TSA.
- + Quc cấy vòng, que cấy thẳng.
- + Pipette các loại.

3. CÁCH TIẾN HÀNH

- 1) Ghi nhãn trên ống nghiệm và đĩa petri (ngày, tên người thực hiện, tên vi sinh vật...) (Hình 49, 50).
- 2) Trộn đều vi sinh vật bằng cách gõ nhẹ ống nghiệm chứa huyền phù vi sinh vật hoặc sử dụng thiết bị trộn (*vortex mixer*).
- 3) Cầm ống nghiệm chứa chủng giống vi sinh vật và ống nghiệm chứa môi trường mới trong lòng bàn tay (trái). Các ống nghiệm tạo thành hình chữ V. Ống nghiệm được đặt ở vị trí nghiêng.
- 4) Dùng tay (phải) còn lại đốt que cấy trên ngọn lửa từ đèn cồn, đèn Bunsen hay thiết bị Bacti-Cinerator đến khi dây cấy nóng đỏ (Hình 47).
- 5) Dùng chính tay này (phải) vừa cầm que cấy vừa tháo nút bông (hoặc nắp) của các ống nghiệm (kẹp giữa các ngón tay). Hơ nhẹ miệng ống nghiệm trên ngọn lửa (không đốt quá nóng) (Hình 49).
- 6) Làm nguội que cấy bằng cách nhúng vào huyền phù vi sinh vật đến khi không còn nghe tiếng “xèo xèo”. Chuyển một giọt huyền phù vi sinh vật vào ống nghiệm chứa môi trường mới. Có thể dùng cách này để chuyển giọt huyền phù vi sinh vật lên phiến kính (làm các tiêu bản quan sát) hoặc để cấy ria lên bề mặt môi trường trong ống nghiệm và đĩa petri mới. Khi lấy vi sinh vật từ môi trường thạch nghiêng thì làm nguội que cấy bằng cách đặt vào đầu trên của môi trường thạch đến khi không còn nghe tiếng “xèo xèo” (Hình 50).
- 7) Hơ nhẹ miệng ống nghiệm trên ngọn lửa (không đốt quá nóng).
- 8) Đậy nút bông (hoặc nắp) vào ống nghiệm.
- 9) Tiệt trùng que cấy đến khi dây cấy nóng đỏ.

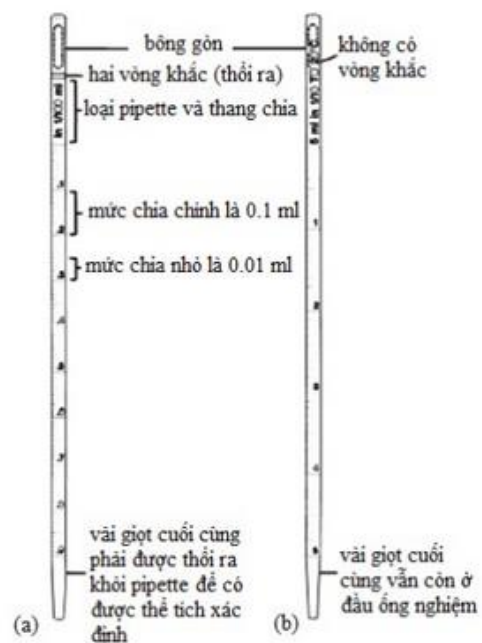
Sử dụng kỹ thuật vô trùng để thực hiện các thao tác sau:

- a) Dùng que cấy vòng, chuyển giống vi sinh vật (*Lactobacillus* sp., *E.coli*, *Acetobacter* sp.) từ ống nghiệm thạch môi trường lỏng TSB sang môi trường lỏng TSB mới.
- b) Dùng que cấy thẳng chuyển giống vi sinh vật (*Lactobacillus* sp., *E.coli*, *Acetobacter* sp.) sang ống nghiệm thạch sâu TSA. Theo đó, dây cấy có vi sinh vật sẽ được đâm thẳng đứng vào chính giữa môi trường ($\frac{2}{3}$ chiều sâu của môi trường) (Hình 51a-c).

- c) Dùng que cấy vòng, chuyển giống vi sinh vật (*Lactobacillus* sp., *E.coli*, *Acetobacter* sp.) từ ống nghiệm thạch môi trường thạch nghiêng TSA mới bằng cách cấy ria (vuốt nhẹ dây cấy để tạo đường zic-zac) trên bề mặt môi trường mới (Hình 51d). Lưu ý là phần chất lỏng trong ống nghiệm thạch nghiêng mới không được chảy ngược lên phần bề mặt vừa được cấy ria vì sẽ làm cho vi sinh vật phát triển loang ra trên bề mặt.
- d) Đặt ống nghiệm lên giá đỡ và ủ trong nhiệt độ phù hợp trong 24-48 giờ. Sau đó, kiểm tra sự phát triển của vi sinh vật trong ống nghiệm. Sự phát triển của vi sinh vật sẽ làm đục môi trường lỏng hoặc tạo một đường đục theo vết cấy đâm sâu hay các khuẩn lạc dọc theo đường cấy ria (Hình 51, 52).

4. CÂU HỎI KIỂM TRA

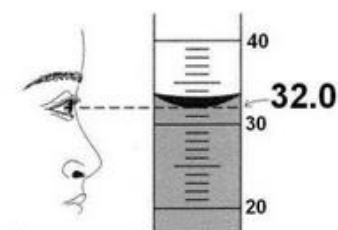
- 1) Trình bày cách sử dụng hai loại pipette thủy tinh thông dụng?
- 2) Trình bày mục đích của việc hơ nóng nhẹ miệng ống nghiệm trong kỹ thuật vô trùng?
- 3) Mục đích của việc cấy chuyển vi sinh vật?
- 4) Để cấy chuyển vi sinh vật, khi nào que cấy vòng được sử dụng?
- 5) Cho biết khả năng nhiễm vi sinh vật từ bên ngoài vào môi trường thử nghiệm?
- 6) Trình bày các dấu hiệu của sự sinh trưởng vi sinh vật trong môi trường lỏng?
- 7) Tại sao khi chuyển vi sinh vật ống nghiệm này đến ống nghiệm khác lại sử dụng que cấy vòng chứ không phải là que cấy thẳng?
- 8) Vai trò của dầu khoáng trong bảo quản giống vi sinh vật thuần khiết?
- 9) Trình bày cách đông khô một giống vi sinh vật thuần khiết?
- 10) Trình bày cách bảo quản các giống vi khuẩn kỵ khí?



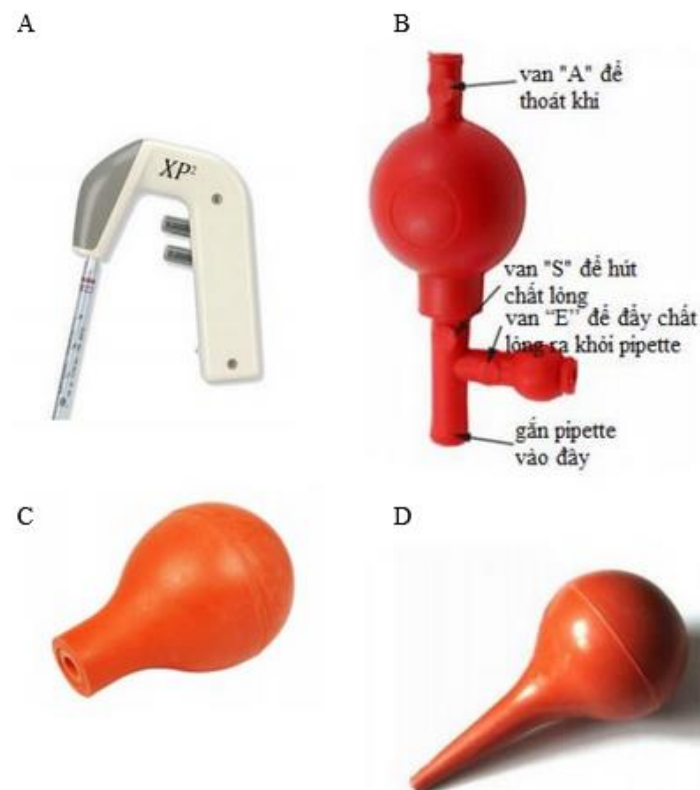
Hình 43. Pipette thủy tinh



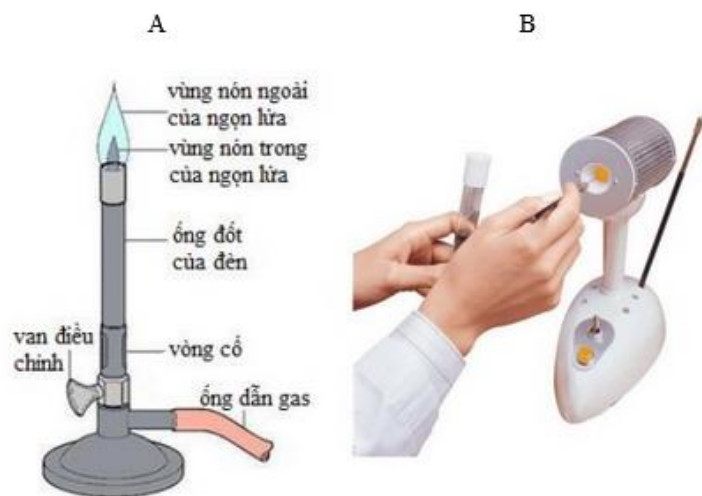
Hình 44. Micropipette đơn kênh (trái) và đa kênh (phải)



Hình 45. Cách đọc thể tích trên pipette



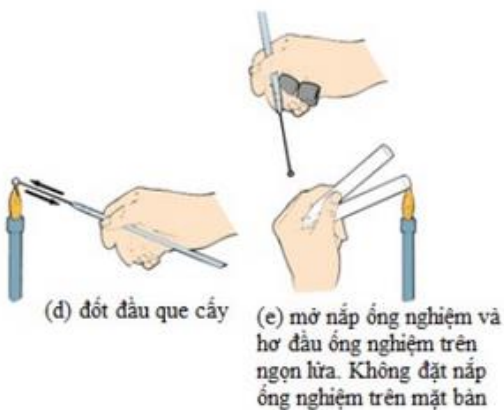
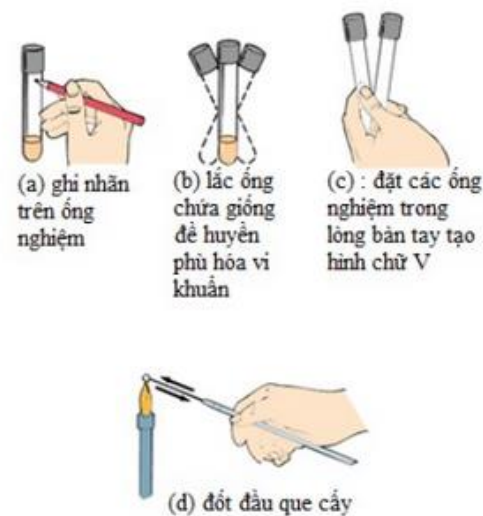
Hình 46. Dụng cụ hút pipette (A) và các loại bầu bóp (B, C và D)



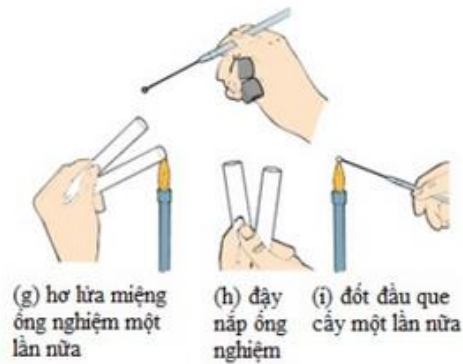
Hình 47. Đèn Bunsen (A) và thiết bị Bacti-Cinerator (B)



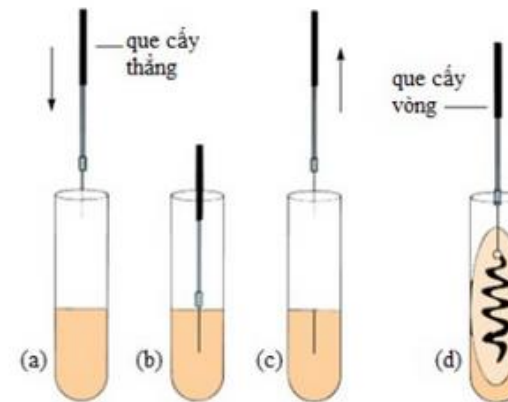
Hình 48. Que cây thẳng (a) và que cây vòng (b)



Hình 49. Kỹ thuật lấy giống và chuyển giống vô trùng



Hình 50. Kỹ thuật lấy giống và chuyển giống vô trùng (tiếp theo)



Hình 51. Các kỹ thuật cấy chuyển

(a), (b) và (c) Kỹ thuật cấy đâm sâu. Que cấy thẳng không chạm vào thành ống nghiệm và chỉ đâm sâu $\frac{2}{3}$ chiều sâu của môi trường; (d) Kỹ thuật cấy rĩa trên bề mặt môi trường thạch nghiêng.



Hình 52. Một số kiểu hình sinh trưởng của vi khuẩn trong môi trường lỏng

Bài 3.3

KỸ THUẬT TRẢI ĐĨA

1. GIỚI THIỆU

Trong tự nhiên, vi khuẩn phát triển thành một quần thể gồm nhiều giống khác nhau. Vì vậy để nghiên cứu và mô tả chính xác một giống vi khuẩn xác định cần phải sử dụng giống vi khuẩn thuần khiết. Kỹ thuật trải đĩa (Hình 53) là một kỹ thuật đơn giản và trực tiếp đạt được kết quả mong muốn. Khi thực hiện, một thể tích nhỏ huyền phù vi sinh vật đã được pha loãng (chứa tối đa 100 đến 200 tế bào) được chuyển vào trung tâm bề mặt đĩa thạch và được trải khắp bề mặt môi trường bằng que cấy gạt vô trùng. Que cấy gạt được vô trùng bằng cách nhúng trong 95% alcohol và sau đó được đốt cháy. Sau một thời gian, vi khuẩn sẽ phát triển thành những khuẩn lạc (*colony*) riêng rẽ (Hình 54). Một khuẩn lạc là một lượng sinh khối tế bào vi khuẩn trên môi trường rắn, có thể được quan sát bằng mắt thường như một thực thể riêng biệt. Theo phương pháp này, một khuẩn lạc được xem là được tạo thành từ một tế bào vi khuẩn và do đó coi như là bản sao của một giống vi khuẩn thuần khiết.

Sau một thời gian sinh trưởng, hình thái cơ bản của khuẩn lạc và hình dạng rìa khuẩn lạc sẽ được quan sát theo hướng nhìn từ trên xuống (Hình 55). Độ cao của khuẩn lạc sẽ được quan sát theo hướng nằm ngang với tầm mắt. Sau khi hình thái của khuẩn lạc đã được làm rõ, khuẩn lạc sẽ được cấy rìa sang một môi trường mới để thu nhận giống vi sinh vật thuần khiết.

2. VẬT LIỆU

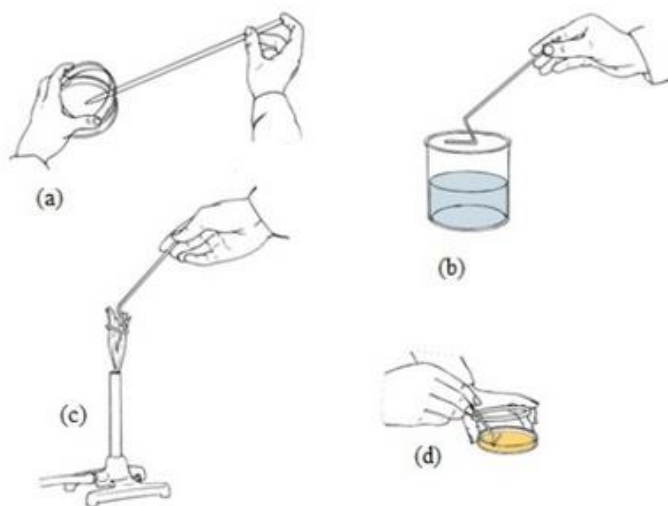
- + *Lactobacillus* sp., *E.coli*, *Acetobacter* sp. được nuôi cấy trên môi trường TSB (*tryptic soy broth*) trong 24-48 giờ.
- + Đĩa thạch chứa môi trường TSA (*tryptic soy agar*).
- + 95% ethanol.
- + Đèn cồn hoặc đèn Bunsen hoặc thiết bị Bacti-Cinerator.
- + Que cấy gạt (*L-shaped glass rod*).
- + Pipette các loại.

3. CÁCH TIẾN HÀNH

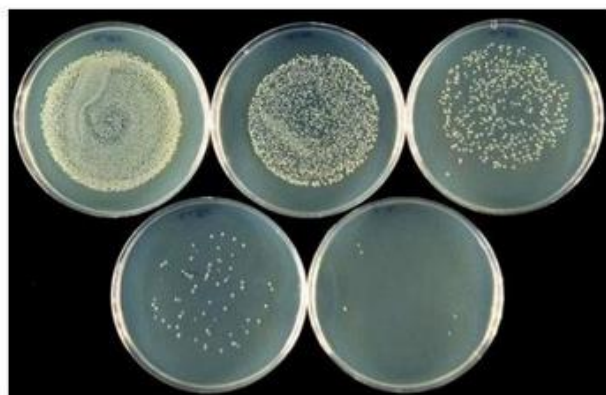
- 1) Ghi nhãn ở đáy đĩa petri (ngày, tên người làm thực nghiệm, tên vi sinh vật...) (Hình 53).
- 2) Dùng pipette chuyển 0.1 ml huyền phù vi sinh vật vào giữa đĩa petri chứa môi trường TSA.
- 3) Nhúng que cấy gạt vào cốc thủy tinh (beaker) chứa 95% ethanol, gõ nhẹ que cấy gạt vào thành cốc để loại bỏ bớt lượng ethanol thừa.
- 4) Đốt que cấy bằng ngọn lửa (5-10 giây) và để nguội que cấy bên trong/dưới nắp đĩa petri chứa môi trường nuôi cấy. Lưu ý không đưa que cấy vừa đốt trở lại cốc chứa ethanol.
- 5) Trải đều huyền phù vi sinh vật khắp bề mặt môi trường. Không chạm que cấy vào thành đĩa petri. Không đặt nắp đĩa petri xuống mặt bàn.
- 6) Nhúng que cấy gạt vào cốc thủy tinh (beaker) chứa 95% ethanol, gõ nhẹ que cấy gạt vào thành cốc để loại bỏ bớt lượng ethanol thừa và đốt que cấy.
- 7) Lặp lại quy trình này với các đĩa petri khác.
- 8) Lật sấp đĩa petri và ủ ở 30°C trong 24-48 giờ. Việc lật sấp giúp ngăn hơi nước ngưng tụ trên nắp đĩa rơi xuống bề mặt môi trường dẫn đến sự phát triển loang lổ của vi khuẩn.
- 9) Quan sát hình thái của khuẩn lạc và ghi nhận lại.

4. CÂU HỎI KIỂM TRA

- 1) Khuẩn lạc của vi khuẩn là gì?
- 2) Mục đích của cốc chứa 95% ethanol trong kỹ thuật cấy gạt?
- 3) Tại sao cần pha loãng huyền phù vi sinh vật đến mức chỉ chứa từ 100 đến 200 tế bào/0.1 ml khi tiến hành kỹ thuật cấy gạt?
- 4) Mô tả các kiểu hình thái điển hình của khuẩn lạc vi khuẩn?
- 5) Mục đích của kỹ thuật cấy gạt?
- 6) Thông thường, việc ghi nhãn được thực hiện ở đáy đĩa petri. Tại sao?



Hình 53. Kỹ thuật trải đĩa



Hình 54. Vi sinh vật được trải trên đĩa thạch



Hình 55. Đặc điểm của khuẩn lạc vi khuẩn trên môi trường agar được nhìn bằng mắt thường

Bài 3.4

KỸ THUẬT ĐỔ ĐĨA

1. GIỚI THIỆU

Kỹ thuật đổ đĩa (*pour-plate technique*) (Hình 56) được sử dụng rộng rãi khi nghiên cứu vi khuẩn và nấm mốc. Mẫu ban đầu sẽ được pha loãng nhiều lần để làm giảm mật độ vi sinh vật đến mức các khuẩn lạc mọc riêng rẽ trên bề mặt đĩa thạch. Một thể tích nhỏ của mẫu được pha loãng, được cho lên bề mặt đĩa thạch petri và được trộn đều với môi trường nuôi cấy ở nhiệt độ 48°C đến 50°C. Hầu hết vi khuẩn và nấm mốc không bị tiêu diệt ở môi trường có nhiệt độ ấm này trong một thời gian ngắn. Sau khi môi trường rắn lại, mỗi tế bào sẽ được cố định tại một vị trí và hình thành một khuẩn lạc riêng rẽ nếu độ pha loãng của mẫu là vừa đủ. Như vậy, tổng số khuẩn lạc quan sát được sẽ tương ứng tổng số tế bào sống của vi sinh vật trong mẫu pha loãng.

2. VẬT LIỆU

- + *Lactobacillus* sp., *E.coli*, *Acetobacter* sp. được nuôi cấy trên môi trường TSB (*tryptic soy broth*) trong 24-48 giờ.
- + Môi trường TSA (*tryptic soy agar*).
- + Ống nghiệm chứa 9 ml nước muối sinh lý (0.9 % NaCl) đã vô trùng (121°C trong 15 phút).
- + Đèn cồn hoặc đèn Bunsen hoặc thiết bị Bacti-Cinerator.
- + Pipette các loại.
- + Đĩa petri.

3. CÁCH TIẾN HÀNH

- 1) Môi trường TSA được đun cách thủy để nóng chảy hoàn toàn và để nguội đến 48-50°C trong bể ổn nhiệt.
- 2) Ghi nhãn ở đáy đĩa petri (ngày, tên người làm thực nghiệm, tên vi sinh vật...).
- 3) Bằng kỹ thuật vô trùng, cho 1 ml huyền phù vi sinh vật vào ống nghiệm chứa 9 ml nước muối sinh lý đã vô trùng. Trộn kỹ

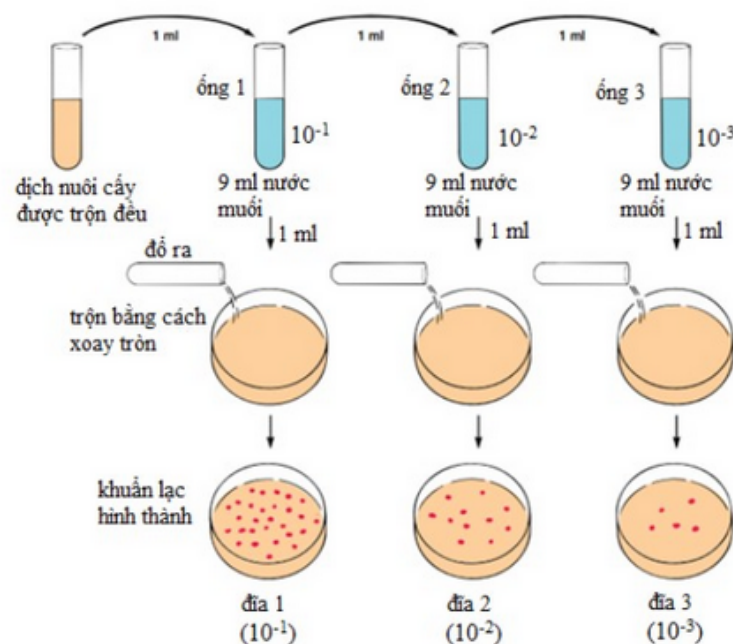
bằng máy lắc ống nghiệm. Ta có mẫu vi sinh vật có độ pha loãng 10^{-1} (Hình 56).

- 4) Bằng kỹ thuật vô trùng, cho 1 ml huyền phù vi sinh vật từ ống nghiệm có độ pha loãng 10^{-1} nói trên cho vào ống nghiệm chứa 9 ml nước muối sinh lý đã vô trùng. Trộn kỹ bằng máy lắc ống nghiệm. Ta có mẫu vi sinh vật có độ pha loãng 10^{-2} .
- 5) Tiếp tục tiến hành tương tự như bước 3) và 4) nói trên để có các ống nghiệm chứa huyền phù vi sinh vật có độ pha loãng 10^{-3} , 10^{-4} , ...
- 6) Với các ống nghiệm chứa huyền phù vi sinh vật có độ pha loãng khác nhau, lấy 1 ml huyền phù cho vào các đĩa petri (có ghi nhãn tương ứng với từng độ pha loãng).
- 7) Đổ môi trường TSA có nhiệt độ 48-50°C đã chuẩn bị sẵn vào đĩa petri. Nhẹ nhàng trộn đều môi trường TSA và mẫu huyền phù vi sinh vật bằng cách tạo chuyển động xoay vòng trong khi vẫn đặt đĩa trên mặt bàn. Tránh để môi trường dính trên phần nắp trên của đĩa hay mép đĩa petri.
- 8) Để yên (15-30 phút) để môi trường rắn lại hoàn toàn. Sau đó, chuyển đĩa petri vào tủ ủ ở nhiệt độ thích hợp trong 24-48 giờ ở vị trí lật sấp.
- 9) Đếm số khuẩn lạc hình thành trên bề mặt môi trường đĩa thạch.

Lưu ý: Hơ nhẹ miệng ống nghiệm trên ngọn lửa trước và sau khi lấy mẫu. Các thao tác kể trên phải được thực hiện bằng kỹ thuật vô trùng trong tủ cấy vi sinh.

4. CÂU HỎI KIỂM TRA

- 1) So sánh kết quả thu nhận được khi sử dụng phương pháp đổ đĩa với phương pháp trải đĩa và cấy ria?
- 2) Cho biết ưu điểm và nhược điểm của phương pháp đổ đĩa so với các phương pháp khác trong việc phân lập khuẩn lạc vi khuẩn?
- 3) Tại sao phải sử dụng môi trường ở nhiệt độ 48-50°C khi thực hiện kỹ thuật đổ đĩa?
- 4) Giải thích tại sao kỹ thuật đổ đĩa có thể được sử dụng để phân lập nấm mốc?
- 5) Giải thích lý do tại sao phải lật sấp đĩa petri trong suốt thời gian ủ?



Hình 56. Kỹ thuật đổ đĩa

(Mẫu ban đầu được pha loãng nhiều lần để giảm mật độ vi sinh vật đến mức phù hợp. Một ml của từng độ pha loãng được cho vào đáy đĩa petri. Sau đó môi trường agar được thêm vào. Các tế bào vi sinh vật sẽ phát triển sau một thời gian ủ và có thể được sử dụng như một chủng thuần khiết. Các khuẩn lạc mọc trên bề mặt môi trường hình tròn và to trong khi các khuẩn lạc mọc bên dưới bề mặt môi trường hình hạt đậu và nhỏ hơn).

Bài 3.5 KỸ THUẬT CẮY RIA

1. VẬT LIỆU

- + *Lactobacillus* sp., *E.coli*, *Acetobacter* sp. được nuôi cấy trên môi trường TSB (*tryptic soy broth*) trong 24-48 giờ.
- + Môi trường TSA (*tryptic soy agar*).
- + Đèn cồn hoặc đèn Bunsen hoặc thiết bị Bacti-Cinerator.
- + Pipette các loại.
- + Đĩa petri.
- + Quc cấy vòng

2. GIỚI THIỆU

Kỹ thuật cấy ria (*streak-plate technique*) (Hình 57) được sử dụng để phân lập vi sinh vật từ đó giúp tạo các khuẩn lạc giống thuần khiết. Trong kỹ thuật này, huyền phù vi sinh vật sẽ được chuyển đến một trí tại ria môi trường đĩa thạch bằng que cấy vòng rồi sau đó được ria khắp bề mặt môi trường bằng các đường cấy. Tại một số vị trí trên đường cấy, các tế bào riêng lẻ sẽ rời khỏi vòng cấy, khi que cấy trượt trên bề mặt agar, và phát triển thành các khuẩn lạc riêng rẽ. Do đó, mỗi khuẩn lạc được xem như được phát triển từ một tế bào riêng lẻ ban đầu. Điểm mấu chốt của kỹ thuật này là thông qua việc ria que cấy trên bề mặt môi trường, mật độ tế bào sẽ giảm dần. Như vậy, ở những đường cấy gần cuối các khuẩn lạc riêng lẻ sẽ được hình thành.

3. CÁCH TIẾN HÀNH

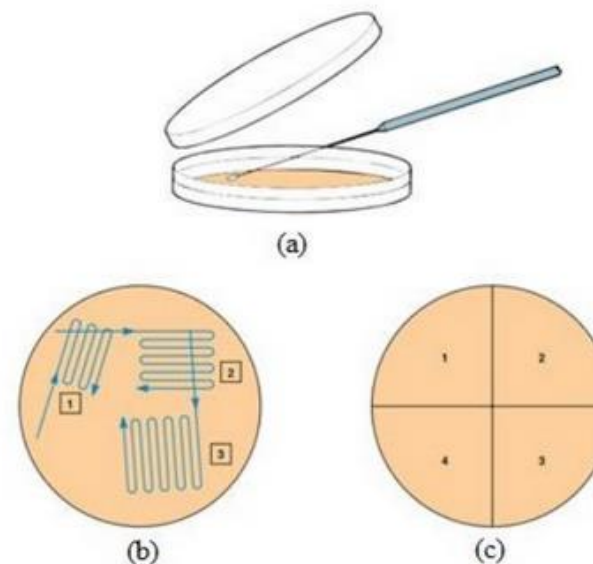
1. Ghi nhãn trên đáy đĩa petri (ngày, tên người làm thực nghiệm, tên mẫu...).
2. Dùng que cấy vòng lấy đầy một vòng huyền phù vi sinh vật của mẫu nghiên cứu (Hình 57).
3. Ria vòng cấy chứa huyền phù vi sinh vật trên bề mặt môi trường đĩa thạch bằng cách: Hé nắp đĩa petri sao cho vừa đủ đưa que cấy vòng vào bên trong đĩa. Nhẹ nhàng trải huyền phù vi sinh vật lên một vùng diện tích nhỏ ở một phần ria đĩa thạch

(vùng 1). Lưu ý: chỉ đặt nhẹ đầu que cấy trên bề mặt môi trường và di chuyển nhẹ, tránh không đào vào bề mặt môi trường.

4. Lấy que cấy vòng ra và đốt trên ngọn lửa để tiêu diệt vi sinh vật. Sau đó, đặt que cấy chạm vào dưới nắp đĩa petri để làm nguội. Tiếp tục chạm que cấy vào phần rìa môi trường để làm nguội.
5. Xoay đĩa sang một vị trí khác và nhẹ nhàng tạo một đường cấy rìa mới (vùng 2) xuất phát từ vị trí vùng 1.
6. Làm lại bước 4 và 5 để tạo các đường cấy mới ở vùng 3 và 4. Đốt que cấy sau khi hoàn thành việc cấy rìa.
7. Ủ đĩa petri trong môi trường nhiệt độ phù hợp ở trạng thái lập sấp trong 24 giờ.
8. Xem xét và ghi nhận kết quả.

4. CÂU HỎI KIỂM TRA

- 1) Trong kỹ thuật cấy rìa, bằng cách nào mà mật độ vi sinh vật bị giảm dần để hình thành các khuẩn lạc riêng rẽ?
- 2) Vùng nào trên đĩa sẽ có mật độ vi sinh vật nhiều nhất và ít nhất? Giải thích?
- 3) Có phải mỗi khuẩn lạc hình thành trên đĩa thạch sau quá trình cấy rìa được hình thành từ một tế bào ban đầu? Giải thích?



Hình 57. Kỹ thuật cấy rìa

(Các mũi tên chỉ chiều di chuyển của que cấy vòng. Ở hình b, que cấy được đốt và làm nguội các lần cấy 1-2, 2-3, và 3-4. Mục đích của kỹ thuật này là làm giảm mật độ vi sinh vật dọc theo đường cấy từ đó tạo các khuẩn lạc mọc riêng rẽ ở các đường cấy sau cùng).

Bài 3.6

MÔI TRƯỜNG CHỌN LỌC VÀ MÔI TRƯỜNG CHUYÊN BIỆT

1. GIỚI THIỆU

Môi trường chọn lọc (*selective media*) và môi trường chuyên biệt (*differential media*) được sử dụng để phân lập (*isolation*) hay xác định các tính chất đặc biệt của vi sinh vật. Môi trường chọn lọc cho phép một số loại vi sinh vật xác định phát triển và ức chế sự phát triển của các loại vi sinh vật khác. Sự chọn lọc được hình thành theo một số cách. Ví dụ, một loại đường xác định có thể được chọn làm yếu tố chọn lọc và là nguồn carbon duy nhất trong môi trường. Bên cạnh đó, các yếu tố chọn lọc hoặc ức chế được tạo thành bằng việc bổ sung phẩm nhuộm, kháng sinh, muối hay một số chất ức chế đặc biệt (những chất gây ảnh hưởng đến quá trình trao đổi chất hay hệ enzyme của vi sinh vật). Ví dụ, môi trường chứa potassium tellurite (K_2TeO_3), sodium azide (NaN_3) hay thallium acetate ($TiCl_3H_3O_2$) (ở nồng độ 0.1-0.5 g/l) sẽ ức chế sự phát triển của vi khuẩn Gram âm. Môi trường được bổ sung muối mật (bile salt), basic fuchsin, penicillin (5-50 đơn vị/ml) hay crystal violet (2 mg/l) sẽ ức chế vi khuẩn Gram dương. Do đó, tellurite agar được dùng để chọn lọc vi khuẩn Gram dương và nutrient agar bổ sung penicillin được dùng để chọn lọc vi khuẩn Gram âm.

Môi trường chuyên biệt dùng để phân biệt các vi sinh vật có tính chất gần giống nhau hay một nhóm vi sinh vật nào đó. Môi trường chuyên biệt chứa các loại phẩm nhuộm hay các chất hóa học, một loại vi sinh vật xác định khi phát triển trên môi trường chuyên biệt sẽ tạo ra những tính chất đặc biệt hay một hình thức sinh trưởng đặc biệt có thể nhận diện được và phân biệt được với các vi sinh vật khác. Môi trường thạch máu (*blood agar*) vừa là một môi trường chuyên biệt vừa là môi trường làm giàu (*enriched medium*). Môi trường thạch máu giúp phân biệt nhóm vi khuẩn có khả năng và không có khả năng phân giải máu. Vi khuẩn có khả năng phân giải máu (*hemolytic bacteria*) (gồm một số streptococci và staphylococci phân lập từ cuống họng người) sẽ tạo vùng không màu (*clear zone*) xung quanh khuẩn lạc do các tế bào máu bị phá hủy.

Có rất nhiều loại môi trường chọn lọc và môi trường chuyên biệt được sử dụng trong các phòng thí nghiệm vi sinh thực phẩm, môi trường, y học. Trong đó, ba loại môi trường sau được dùng phổ biến nhất:

a) MSA (Mannitol salt agar)

MSA là môi trường chọn lọc được sử dụng để phân lập staphylococci gây bệnh (Hình 58). Môi trường chứa mannitol, chất chỉ thị đỏ phenol và 7.5% sodium chloride. Nồng độ muối cao ức chế sự phát triển của hầu hết vi khuẩn không thuộc nhóm staphylococci. Trên môi trường MSA vi khuẩn gây bệnh *Staphylococcus aureus* tạo khuẩn lạc nhỏ được bao quanh bởi một vùng màu vàng. Sự đổi màu môi trường là do *S.aureus* lên men mannitol sinh acid từ đó làm đổi màu chất chỉ thị từ đỏ sang vàng. Các loại vi khuẩn khác hầu như bị ức chế trên môi trường này.

b) EMB agar (Eosin methylene blue agar)

EMB agar là môi trường chuyên biệt được sử dụng để phát hiện và phân lập các vi khuẩn gây bệnh đường ruột Gram âm (Hình 59). Sự kết hợp giữa eosin và methylen blue được dùng như sự chỉ thị màu cho phép phân biệt giữa các vi sinh vật lên men lactose và các vi sinh vật khác không có khả năng này. Trong thành phần môi trường cũng bao gồm saccharose bởi vì các vi khuẩn thuộc Enterobacteriaceae hay nhóm coliform lên men saccharose nhanh hơn so với lactose. Bên cạnh đó, methylen blue đóng vai trò chất ức chế sự phát triển của các vi khuẩn Gram dương.

Khuẩn lạc *E.coli* thường có tâm màu đen và có ánh xanh kim loại (Hình 59). Trong khi đó, khuẩn lạc *Enterobacter aerogenes* thường nhầy nhớt và lớn hơn khuẩn lạc của *E.coli*. Các vi khuẩn khác như *Salmonella* (một trong những nguyên nhân gây ngộ độc thực phẩm) thì không lên men lactose hay saccharose và tạo các khuẩn lạc không màu.

c) MacConkey's agar

MacConkey's agar là môi trường chuyên biệt dùng để phát hiện và phân lập các vi khuẩn gây bệnh lý (*dysentery*), thương hàn (*typhoid*) và phó thương hàn (*paratyphoid*) (Hình 60). Môi trường này thường dùng để phân biệt các chủng của *Salmonella typhosa* với nhóm coliform. Tuy nhiên các chủng vi khuẩn thuộc *Salmonella* và *Shigella* phát triển tốt trên môi trường này và phân biệt rõ với các vi khuẩn gây bệnh đường ruột khác và nhóm coliform. Khi phát triển trên môi trường MacConkey's agar khuẩn lạc của các vi khuẩn thuộc nhóm coliform có màu hồng và được bao xung quanh bởi một vùng kết tủa của muối mật (*precipitated bile*). Những phản ứng này là do acid được tạo thành bởi sự lên men lactose. Sản phẩm acid tạo thành tác động lên muối mật (*bile salt*) và đỏ trung tính (*neutral red*) được hấp thụ bởi sự kết tủa của muối mật. Các trực khuẩn gây bệnh lý, thương hàn và phó thương hàn không

lên men lactose và tạo phản ứng kiềm khi sinh trưởng trên môi trường do đó khuẩn lạc của các vi khuẩn này không màu và trong suốt. Sự phát triển của các vi khuẩn Gram dương bị ức chế bởi crystal violet và muối mật có trong môi trường.

2. VẬT LIỆU

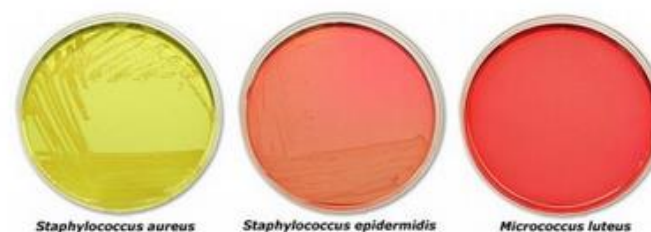
- + *Staphylococcus aureus*, *Proteus vulgaris*, *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Salmonella typhimurium* được nuôi cấy trên môi trường NB (*Nutrient broth*) trong 24-48 giờ.
- + Đĩa thạch môi trường NA (*Nutrient agar*), Mannitol Salts agar (MSA), Eosin methylene blue agar (EMB agar) và MacConkey's agar.
- + Que cấy vòng, đèn cồn hay đèn Bunsen.

3. CÁCH TIẾN HÀNH

- 1) Ghi nhãn trên đáy đĩa petri (ngày, tên người làm thực nghiệm, tên vi sinh vật...).
- 2) Dùng que cấy vòng, cấy ria huyền phù vi sinh vật (*Staphylococcus aureus*, *Proteus vulgaris*, *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Salmonella typhimurium*) lên các đĩa thạch môi trường MSA, EMB, MacConkey's agar, NA.
- 3) Lập sắp đĩa petri và ủ ở 37°C trong 48 giờ.
- 4) Quan sát hình thái khuẩn lạc.

4. CÂU HỎI KIỂM TRA

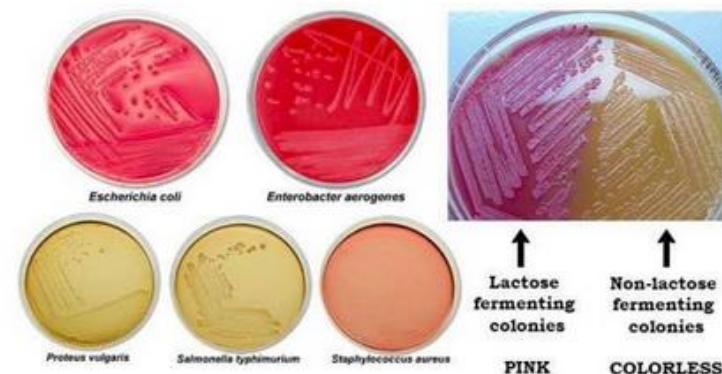
- 1) Phân biệt và cho biết mục đích của việc sử dụng môi trường chọn lọc và môi trường chuyên biệt?
- 2) Yếu tố chọn lọc nào được sử dụng để chọn lọc vi khuẩn Gram dương hoặc ức chế vi khuẩn Gram âm?
- 3) Tại sao môi trường MSA và EMB được xem vừa là môi trường chọn lọc vừa là môi trường chuyên biệt?
- 4) Dấu hiệu nhận biết *S.aureus* trên môi trường MSA? Giải thích?
- 5) Dấu hiệu nhận biết *E.coli* trên môi trường EMB? Giải thích?
- 6) Dấu hiệu nhận biết coliform và *Salmonella typhimurium* trên môi trường MacConkey's agar? Giải thích?



Hình 58. Sự phát triển của các loại vi khuẩn trên môi trường Mannitol Salt agar



Hình 59. Sự phát triển của các loại vi khuẩn trên môi trường Eosin methylene blue agar



Hình 60. Sự phát triển của các loại vi khuẩn trên môi trường MacConkey's agar

Bài 3.7

NUÔI CÂY VI KHUẨN KỊ KHÍ

1. GIỚI THIỆU

Một trong số các yếu tố môi trường mà vi khuẩn nói riêng và các vi sinh vật khác nói chung rất nhạy cảm với nó là môi trường với sự có mặt của O₂. Chẳng hạn, một số vi sinh vật chỉ phát triển nếu O₂ có mặt và được gọi là vi sinh vật hiếu khí bắt buộc (*obligate aerobes*). Vi sinh vật kị khí tùy ý (*facultative aerobes*) có thể phát triển môi trường có hay không có mặt O₂, nhưng phát triển tốt ở môi trường có mặt O₂. Vi sinh vật kị khí nghiêm ngặt (*strict obligate anaerobes*) chỉ phát triển khi không có mặt O₂ và chúng sẽ bị tổn thương nếu có sự có mặt của O₂. Vi sinh vật kị khí không bắt buộc (*aerotolerant anaerobes*) không sử dụng O₂ nhưng cũng không bị tổn thương nếu có mặt của O₂. Vi sinh vật vi hiếu khí (*microaerophiles*) đòi hỏi một lượng nhỏ O₂ để sinh trưởng nhưng bị ức chế ở nồng độ O₂ trong khí quyển. Các yêu cầu khác nhau về O₂ có thể được quan sát dễ dàng trong môi trường ống nghiệm thạch sâu. Chúng vi sinh vật thí nghiệm sẽ được trộn kỹ với môi trường sau đó để cho môi trường đông đặc lại. Vi sinh vật thí nghiệm sẽ phát triển ở các phần khác nhau của môi trường nơi có lượng O₂ khác nhau (Hình 61).

Vi khuẩn kị khí dễ bị tổn thương khi môi trường có O₂. Nói chung, cần tạo điều kiện cho môi trường không những không có O₂ mà còn phải có đủ độ ẩm cần thiết cho sự phát triển của vi khuẩn. Có một số phương pháp để nuôi cấy vi khuẩn kị khí. Một trong những cách phổ biến nhất là sử dụng các môi trường nuôi cấy thương phẩm chuyên dụng. Một loại môi trường khác cũng thường được sử dụng là môi trường Thioglycollate. Môi trường Thioglycollate có chứa methylene blue hay resazurin đóng vai trò là chất chỉ thị oxi-hóa khử. Khi môi trường này chuyển từ màu xanh nhạt sang màu đỏ nhạt đồng nghĩa với việc môi trường từ trạng thái hiếu khí sang trạng thái kị khí.

Những vi khuẩn không kị khí nghiêm ngặt có thể phát triển trên môi trường thạch nghiêng ở điều kiện kị khí nhân tạo. Đó là phương pháp sử dụng ống Wright's (Hình 62). Điều kiện kị khí sẽ được hình thành bằng cách sử dụng pyrogallol và NaOH. Khi có mặt của NaOH, pyrogallol bị oxy hóa và loại bỏ hoàn toàn O₂. Sau khi cấy vi khuẩn kị khí trên bề mặt môi trường thạch nghiêng, một miếng bông gòn nhỏ được cuộn lại và nhét vào trong ống nghiệm sao cho cách môi trường một khoảng nhỏ. Tiếp theo, đổ tinh thể pyrogallol lên phần nút bông trong

ống nghiệm và sau đó thêm vào 1 ml 10% NaOH. Ống nghiệm được đặt lại bằng một nút cao su và được lật úp lại. Ống nghiệm được đưa vào tủ ủ ở nhiệt độ thích hợp ở trạng thái lật úp.

Có thể nuôi cấy vi khuẩn kị khí trên đĩa petri mà không cần phải sử dụng tủ ủ vi sinh phức tạp và đắt tiền. Vi khuẩn kị khí có thể được nuôi cấy trên đĩa thạch kị khí Brewer's với một loại môi trường kị khí (Hình 63). Nắp đĩa petri Brewer's nằm vừa vặn với phần thân đĩa, trên nắp có một gờ vòng tròn đặt tiếp xúc với phần môi trường thạch để đảm bảo bề mặt môi trường không tiếp xúc với O₂. Môi trường kị khí Brewer's chứa hàm lượng cao thioglycollic acid. Các nhóm sulfhydryl (-S-H) của thioglycollate khử O₂ để tạo môi trường kị khí trong đĩa Brewer's.

Một cách khác để tiến hành nuôi cấy vi khuẩn kị khí là sử dụng bình kị khí GasPak (Hình 64). Các hạt xúc tác palladium trên nắp bình chứa sẽ xúc tác quá trình tạo thành nước từ hydrogen và O₂. Bằng cách này, O₂ sẽ được loại khỏi bình chứa đã được đóng kín. Một cách thuận tiện khác là dùng túi GasPak (Hình 65) thay cho bình kị khí GasPak nói trên. Theo đó, một dung dịch hoạt hóa đặc biệt sẽ được cho vào một rãnh chứa chất phản ứng. Các đĩa petri chứa vi sinh vật sẽ được cho vào trong túi và đóng kín. Môi trường bên trong túi là môi trường kị khí. Túi sẽ được cho vào tủ ủ vi sinh ở một nhiệt độ thích hợp.

Một trong những cách đơn giản nhất để nuôi cấy vi sinh vật kị khí là sử dụng enzyme Oxyrase[®]. Cho 0.1 ml dung dịch OB (Oxyrase[®] for Broth) vào 5.0 ml môi trường lỏng. Sau đó, vi khuẩn kị khí sẽ được cấy vào môi trường. Một cách khác là sử dụng sản phẩm OxyDish[™] và Oxyrase[®] for Agar. Oxyrase[®] for Agar được trộn với một loại môi trường và sao đó cho vào OxyDish[™]. OxyDisk chứa một vòng bên trong bịt kín bề mặt môi trường thạch. Trong vòng vài phút, enzyme và cơ chất trong Oxyrase for Agar khử oxygen trong môi trường thạch và khoảng trống bên trong đĩa. Đĩa petri có thể đóng mở vài lần mà vẫn có thể duy trì điều kiện kị khí bên trong. Việc sử dụng enzyme Oxyrase, OxyDish và Oxyrase for Agar sẽ loại bỏ sự phức tạp và giá thành cao của các phương pháp khác đã trình bày ở phần trên.

Một phương pháp mới để nuôi cấy vi khuẩn kị khí có sử dụng Oxyrase là sử dụng đĩa OxyPlate[™]. Trong đĩa OxyPlate[™] đã có sẵn môi trường chuyên dụng dùng để nuôi cấy vi khuẩn kị khí có chứa Oxyrase. Enzyme này khử oxygen trong môi trường và khoảng trống giữa môi trường và nắp đĩa petri. Do chất khử oxygen nằm trong môi trường nên phương pháp này không cần các dụng cụ hay thiết bị khác như bình kị khí, túi hay tủ ủ kị khí. Vi sinh vật chỉ cần được cấy lên môi trường có trong đĩa OxyPlate[™]. Các đĩa OxyPlate[™] có thể được ủ

trong tủ ủ vi sinh thông thường chung với các đĩa petri chứa các vi khuẩn hiếu khí khác.

2. VẬT LIỆU

- + *Pseudomonas aeruginosa* và *Escherichia coli* được nuôi cấy 24-48 giờ trên môi trường lỏng Eugon.
- + *Clostridium sporogenes* được nuôi cấy trên môi trường chứa thioglycollate.
- + Ống nghiệm thạch sâu Eugon.
- + Ống nghiệm chứa môi trường lỏng có thioglycollate.
- + Môi trường TSA (*Tryptic Soy Agar*), môi trường TSB (*Tryptic Soy Broth*), môi trường BAA (*Brewer Aerobic Agar*).
- + Đĩa Brewer's.
- + Bình kỵ khí GasPak.
- + Túi kỵ khí GasPak.
- + Oxyrase for Broth, Oxyrase for Agar, OxyDish, OxyPlates.
- + Tinh thể pyrogallol.
- + 10% NaOH.
- + Chai chứa 99 ml nước muối sinh lý hay 1% peptone đã được vô trùng.
- + Nút bông, que cấy các loại, đèn Bunsen, nước vô trùng, ống nghiệm và đĩa petri...

3. CÁCH TIẾN HÀNH

3.1. Ảnh hưởng của O₂ đến sự sinh trưởng của vi khuẩn

- 1) Đun nóng chảy môi trường ống nghiệm thạch sâu Eugon trong vài phút để loại bỏ O₂ ra khỏi môi trường.
- 2) Làm nguội môi trường đến 48-50°C trong bể ổn nhiệt.
- 3) Dùng kỹ thuật vô trùng chuyển 1-2 vòng cấy vi khuẩn (*P.aeruginosa*, *C.sporogenes*, và *E.coli*) vào môi trường ống nghiệm thạch sâu Eugon.
- 4) Trộn đều vi khuẩn với môi trường bằng cách lăn qua lại ống nghiệm giữa hai bàn tay.

- 5) Để yên cho môi trường đông đặc lại và ủ 24-48 giờ ở 35°C.
- 6) Quan sát và ghi nhận sự sinh trưởng của vi sinh vật trong các ống nghiệm (Hình 61).

3.2. Nuôi cấy vi khuẩn kỵ khí trong môi trường lỏng

- 1) Ghi nhãn trên các ống nghiệm chứa môi trường có thioglycollate đã tiệt trùng.
- 2) Dùng kỹ thuật vô trùng, cấy vi sinh vật (*P.aeruginosa*, *C.sporogenes*, và *E.coli*) vào môi trường. Không lắc ống nghiệm để tránh làm môi trường bị oxy hóa. Methylene blue hoặc resazurin có mặt trong môi trường đóng vai trò chất chỉ thị oxy hóa-khử. Nếu nhiều hơn 1/3 môi trường có màu xanh nhạt hay đỏ nhạt, môi trường cần được đun nóng trở lại để loại bỏ O₂ trước khi sử dụng.
- 3) Ủ các ống nghiệm chứa vi khuẩn trong 24-48 giờ ở 35°C.
- 4) Quan sát và ghi nhận sự sinh trưởng của vi sinh vật trong các ống nghiệm.

3.3. Nuôi cấy vi khuẩn kỵ khí trên đĩa thạch

- 1) Ghi nhãn trên các đĩa petri. Nhóm đĩa petri sử dụng bao gồm: (a) đĩa petri chứa môi trường TSA, (b) đĩa petri chứa môi trường BAA và (c) đĩa Brewer's kèm theo nắp có chứa môi trường BAA).
- 2) Dùng bút kẻ vạch chia đôi ở đáy từng đĩa. Với nhóm một của ba loại đĩa kể trên, ghi nhãn *P.aeruginosa* và *C.sporogenes* ở mỗi nửa đĩa. Trên nhóm thứ hai cũng bao gồm ba loại đĩa tương tự, tiến hành ghi nhãn *P.aeruginosa* và *E.coli*. Nhóm đĩa thứ hai sẽ cho thấy sự phát triển tùy ý của vi khuẩn.
- 3) Dùng que cấy vòng, cấy ria loại vi khuẩn tương ứng ở mỗi nửa đĩa.
- 4) Ủ đĩa chứa môi trường TSA ở trạng thái lập úp trong 35°C ở tủ ủ vi sinh vật hiếu khí thông dụng.
- 5) Dùng nắp đĩa Brewer's (đã tiệt trùng) đặt lên đĩa Brewer's có chứa môi trường BAA sao cho gờ vòng tròn trên nắp dính chặt nhưng không bị lún sâu vào bề mặt môi trường. Lập úp đĩa và ủ ở tủ ủ vi sinh thông dụng ở 35°C (Hình 63).
- 6) Đĩa petri chứa môi trường BAA được cho vào túi GasPak hoặc bình kỵ khí GasPak (Hình 64, 65). Làm theo các hướng dẫn sử

dụng ghi trên túi GasPak hoặc bình kỵ khí GasPak. Sau đó, ủ 24-48 giờ ở 35°C.

7) Quan sát và ghi nhận sự sinh trưởng của vi sinh vật.

3.4. Nuôi cấy vi khuẩn kỵ khí trên ống Wright's

- 1) Ghi nhãn trên các ống nghiệm thạch nghiêng chứa môi trường TSA. Hai ống sẽ cấy *P.aeruginosa*, hai ống khác sẽ cấy *C.sporogenes* (Hình 62).
- 2) Dùng kỹ thuật vô trùng cấy các vi khuẩn tương ứng vào từng ống nghiệm.
- 3) Lấy một ống nghiệm chứa *P.aeruginosa* và một ống chứa *C.sporogenes* ủ ở tủ ủ vi sinh hiếu khí thông dụng tại 35°C trong 24-48 giờ.
- 4) Với hai ống nghiệm mỗi loại còn lại, dùng cán que cấy đẩy một ít bông gòn vào ống nghiệm sao cho gần chạm vào phần môi trường. Sau đó, cho tinh thể pyrogallol vào bên trên phần bông gòn (lưu ý sử dụng găng tay vì pyrogallol rất độc). Bỏ sung 1ml dung dịch 10% NaOH. Nhanh chóng bịt kín đầu ống nghiệm bằng nút cao su (hoặc nút vụn) và lật úp ống nghiệm lại. Cho ống nghiệm lên giá đỡ và ủ ở 35°C trong 24-48 giờ.
- 5) Quan sát và ghi nhận sự sinh trưởng của vi sinh vật trong các ống nghiệm.

3.5. Phân lập vi khuẩn kỵ khí từ đất

- 1) Cho một ít đất vào ống nghiệm chứa môi trường lỏng chứa thioglycollate.
- 2) Ủ ở 30 °C hoặc 37°C trong 24 giờ.
- 3) Quan sát sự phát triển, sự tạo đục cũng như sự sinh khí trong ống nghiệm.
- 4) Sau đó cấy huyền phù vi khuẩn trong ống nghiệm lên môi trường BAA trên đĩa petri và ủ trong bình kỵ khí GasPak (Hình 64). Quan sát hình thái của các khuẩn lạc mọc trên đĩa.

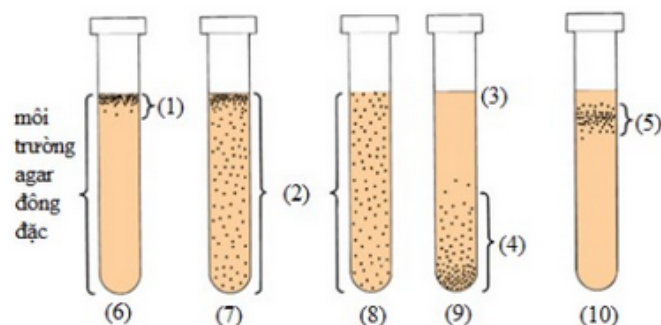
3.6. Nuôi cấy vi khuẩn kỵ khí trên các môi trường có Oxyrase

- 1) Dùng kỹ thuật vô trùng cấy vi khuẩn (*P.aeruginosa*, *C.sporogenes*, *E.coli*) lên môi trường TSB có bổ sung Oxyrase for Broth.

- 2) Tương tự, cấy các loại vi khuẩn trên lên môi trường TSA có bổ sung Oxyrase for Agar trên đĩa OxyDish.
- 3) Ủ các mẫu ở 37°C trong 24-48 giờ.
- 4) Quan sát và ghi nhận sự sinh trưởng của vi sinh vật.

4. CÂU HỎI KIỂM TRA

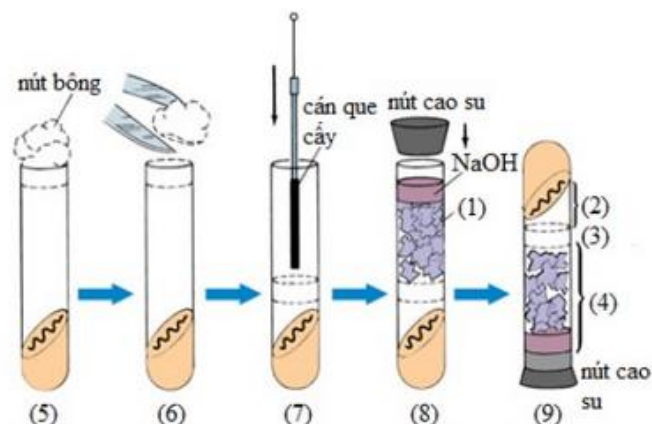
- 1) Giải thích các hình thành môi trường kỵ khí trong bình kỵ khí GasPak?
- 2) Giải thích những gì diễn ra trong ống Wright's?
- 3) Cho biết sự khác nhau giữa các vi sinh vật: hiếu khí bắt buộc, kỵ khí tùy ý, kỵ khí nghiêm ngặt, vi hiếu khí và kỵ khí không bắt buộc?
- 4) Thành phần nào trong môi trường BAA giúp loại bỏ O₂ trong môi trường? Giải thích cách hoạt động của các môi trường có sử dụng Oxyrase?
- 5) Trong tất cả các cách nuôi cấy kỵ khí kể trên, cách nào là tốt nhất? Tại sao?



- (1) sinh trưởng ở bề mặt; (2) sinh trưởng dọc theo độ sâu của môi trường agar nhưng sinh trưởng mạnh nhất ở bề mặt; (3) không sinh trưởng ở bề mặt; (4) chỉ phát triển ở đáy môi trường agar; (5) sinh trưởng ngay bên dưới bề mặt môi trường; (6) hiếu khí bắt buộc; (7) hiếu khí tùy ý; (8) kỵ khí tùy ý; (9) kỵ khí nghiêm ngặt; (10) vi hiếu khí

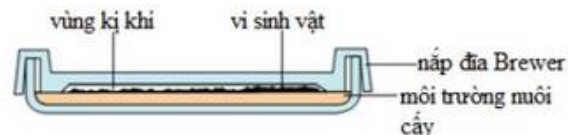
Hình 61. Vi sinh vật được nuôi cấy trên môi trường thạch sâu

(Mỗi chấm nhỏ biểu thị cho một khuẩn lạc riêng rẽ nằm trong môi trường hay trên bề mặt môi trường). Bề mặt môi trường, nơi trực tiếp tiếp xúc với oxygen trong không khí, là nơi có điều kiện hiếu khí. Hàm lượng oxygen trong môi trường giảm tương ứng với độ sâu của môi trường. Phần môi trường ở đáy ống nghiệm là nơi có điều kiện kỵ khí).

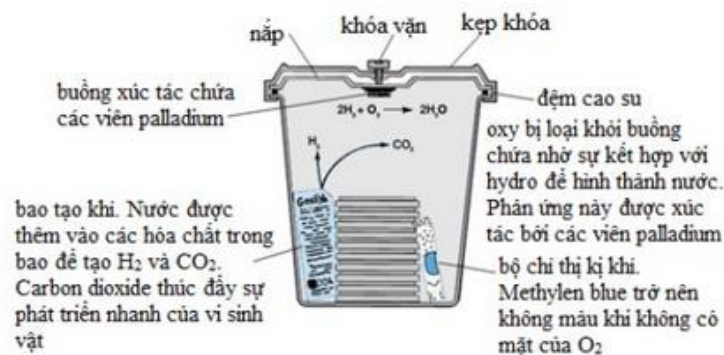


(1) tinh thể pyrogallol; (2) vùng kỵ khí; (3) nút bông; (4) pyrogallol + NaOH; (5) cấy vi khuẩn lên bề mặt môi trường thạch; (6) tủa gòn nút bông; (7) đẩy nút bông xuống; (8) cho tinh thể pyrogallol vào, thêm 1 ml 10% NaOH và đẩy ống nghiệm; (9) lật sập ống Wright's

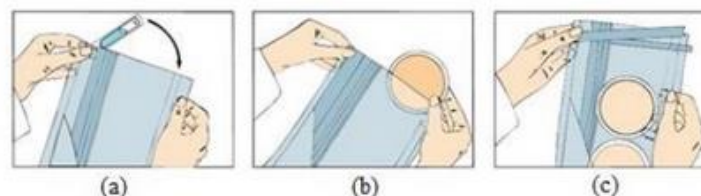
Hình 62. Cách chuẩn bị môi trường ống nghiệm kỵ khí Wright's
(Pyrogallol là chất khử có thể được hoạt hóa bởi NaOH để loại oxygen ra khỏi ống nghiệm để tạo điều kiện kỵ khí).



Hình 63. Môi trường đĩa petri Brewer's



Hình 64. Bình kỵ khí GasPak



Hình 65. Cách sử dụng túi GasPak

((a) cho tác nhân hoạt hóa dạng lỏng GasPak vào rãnh trong túi; (b) đặt môi trường vào bên trong túi; (c) khóa kín túi và cho túi vào tủ ủ ở nhiệt độ thích hợp)

Bài 3.8

ĐỊNH LƯỢNG VI KHUẨN

1. GIỚI THIỆU

Rất nhiều nghiên cứu cần thiết phải xác định mật độ của một quần thể vi khuẩn. Có hai phương pháp rất phổ biến để xác định mật độ vi khuẩn là (a) phương pháp đếm trên đĩa thạch (*standard plate count method*) (Hình 66) và (b) phương pháp phân tích quang phổ (*spectrophotometric method*) (Hình 69, 70) hay còn gọi là phương pháp đo độ đục (*turbidimetric analysis*). Mặc dù kết quả thu nhận được từ hai phương pháp trên là khá tương đồng, nhưng chúng có những điểm khác biệt. Phương pháp đếm trên đĩa thạch là một phương pháp gián tiếp xác định mật độ tế bào sống. Phương pháp đo độ đục cũng là một phương pháp gián tiếp xác định tổng số tế bào sống và chết.

Phương pháp đếm trên đĩa thạch dựa trên sự pha loãng mẫu nghiên cứu với dung dịch nước muối sinh lý hay dung dịch 1% peptone đến một mức độ có thể đếm được khuẩn lạc trên đĩa petri (Hình 66, 68). Đĩa petri cuối cùng trong loạt đĩa phải có số khuẩn lạc từ 25 đến 250 (Hình 66). Nếu số khuẩn lạc trên một đĩa petri nhỏ hơn 25 thì không thể chấp được kết quả do sai lệch về thống kê. Nếu số khuẩn lạc lớn hơn 250 thì mật độ khuẩn lạc trên một đĩa quá dày đặc và các khuẩn lạc quá gần nhau để có thể xem là các đơn vị hình thành khuẩn lạc riêng biệt (*colony-forming units, CFUs*). Giả sử rằng, mỗi tế bào vi khuẩn sống sẽ tách rời khỏi các tế bào khác và phát triển thành một khuẩn lạc riêng rẽ (*CFU*). Do đó, số lượng khuẩn lạc đếm được sẽ cho biết số lượng tế bào vi khuẩn sống (trong điều kiện thí nghiệm). Một dãy các độ pha loãng (ví dụ 10^{-4} đến 10^{-10}) thường được tiến hành do rất khó để biết được mật độ vi khuẩn trong mẫu nghiên cứu. Để đạt được mức độ tin cậy, các thí nghiệm cần được lặp lại hai đến ba lần với mỗi độ pha loãng.

Một phương pháp khác dùng để xác định mật độ vi khuẩn trong dung dịch nuôi cấy là đo độ đục. Độ đục tăng lên trong dung dịch nuôi cấy là một dấu hiệu cho sự sinh trưởng của vi khuẩn và sự tăng lên của số lượng tế bào (sinh khối, *biomass*). Bằng cách sử dụng quang phổ kế, lượng ánh sáng truyền qua giảm tương ứng với mật độ tế bào tăng (Hình 69, 70). Phương pháp đo độ đục nhanh hơn phương pháp đếm trên đĩa thạch nhưng cũng gặp phải những giới hạn về độ nhạy khi mật độ tế bào trong huyền phù bằng hoặc lớn hơn 10^{-7} .

Về cách ghi tỷ lệ pha loãng (*dilution ratios*), có hai hình thức trình bày: (a) dấu hai chấm (:) và dấu gạch chéo (/). Tuy nhiên, hai cách thể hiện này hàm chứa nội dung toàn khác nhau. Dấu gạch chéo thể hiện tỷ lệ của một phần so với tổng thể, ví dụ $1/2$ nghĩa là một phần trong tổng số hai phần. Dấu hai chấm thể hiện tỷ lệ của phần này so với phần kia, ví dụ $1:2$ nghĩa là một phần so với hai phần trong tổng ba phần. Như vậy, $1/2 = 1:1$ và $1:2 = 1/3$.

2. VẬT LIỆU

- + *Escherichia coli* được nuôi cấy 24 giờ trên môi trường TSB.
- + Dung dịch nước muối sinh lý hoặc dung dịch đệm phosphate đã vô trùng.

3. CÁCH TIẾN HÀNH

3.1. Phương pháp đếm trên đĩa thạch

- 1) Ghi nhãn dưới đáy đĩa petri với nội dung là các độ pha loãng: 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} . Ghi nhãn bốn chai chứa nước muối sinh lý hay 1% peptone đã vô trùng (Hình 66).
- 2) Dùng kỹ thuật vô trùng chuyển 1.0 ml dung dịch mẫu hoặc 1.0 g mẫu nghiên cứu cho vào một chai nói trên. Đậy nắp chai lại. Như vậy mẫu đã được pha loãng $1/100$ lần hoặc mẫu có độ pha loãng là 10^{-2} .
- 3) Bình chứa mẫu có độ pha loãng 10^{-2} (gọi tắt là chai 10^{-2}) được lắc kỹ bằng cách dùng cùi chỏ và cẳng tay cầm chai đặt sát trên mặt, đáy chai cũng để sát mặt bàn. Dùng tay xoay mạnh chai thành những vòng tròn trên mặt bàn trong vài phút.
- 4) Sau đó, lập tức dùng kỹ thuật vô trùng chuyển 1.0 ml từ chai 10^{-2} sang một chai mới, ta có chai 10^{-4} (mẫu ban đầu đã được pha loãng 10^{-4} lần).
- 5) Tiếp tục thực hiện tương tự từ bước 2 đến bước 4 nói trên cho các chai còn lại để có các chai có độ pha loãng 10^{-6} và 10^{-8} .
- 6) Lắc kỹ chai 10^{-4} và dùng kỹ thuật vô trùng chuyển 1.0 ml sang một đĩa petri (đĩa ghi nhãn 10^{-4}) và 0.1 ml sang một đĩa petri khác (đĩa ghi nhãn 10^{-5}).
- 7) Thực hiện tương tự bước 6 với các chai 10^{-6} , 10^{-8} với các đĩa petri có ghi nhãn 10^{-6} và 10^{-7} , 10^{-8} và 10^{-9} .

- 8) Với môi trường thạch đã tiệt trùng có nhiệt độ 48-50°C, dùng kỹ thuật vô trùng, mở nắp đĩa petri và đổ môi trường vào trong đĩa. Đậy nắp đĩa petri lại. Vặn đặt đĩa petri trên mặt bàn, dùng tay di chuyển nhẹ nhàng đĩa petri thành những vòng tròn thuận chiều kim đồng hồ (10 vòng) và tiếp theo là những vòng tròn ngược chiều kim đồng hồ (10 vòng). Lưu ý, không để môi trường dâng lên chạm vào nắp đĩa petri.
- 9) Thực hiện theo bước 8 với các đĩa petri còn lại.
- 10) Để yên trong 15 phút để môi trường đông đặc lại hoàn toàn. Lật úp đĩa petri và ủ ở 35°C trong 24 giờ.
- 11) Những đĩa có số khuẩn lạc lớn hơn 250 được xem là quá nhiều để có thể đếm được (*too numerous to count, TNTC*). Những đĩa có số khuẩn lạc nhỏ hơn 25 được xem là quá ít để đếm (*too few to count, TFTC*). Chọn những đĩa petri có số khuẩn lạc từ 25 đến 250. Nhằm tạo thuận lợi, có thể dùng thiết bị đếm khuẩn lạc Quebec để đếm.
- 12) Mật độ vi khuẩn (CFU) trên 1 ml hay 1 g mẫu được tính toán bằng cách chia số khuẩn lạc đếm được với độ pha loãng. Kết quả được ghi nhận dưới dạng một chữ số hàng đơn vị và một chữ số thập phân cùng với một số lũy thừa (10^n). Ví dụ, ở độ pha loãng 10^{-6} , đếm được 130 khuẩn lạc. Như vậy, kết quả được tính là: $130 \div 10^{-6} = 1.3 \times 10^8$ (CFU/ml hoặc CFU/g)

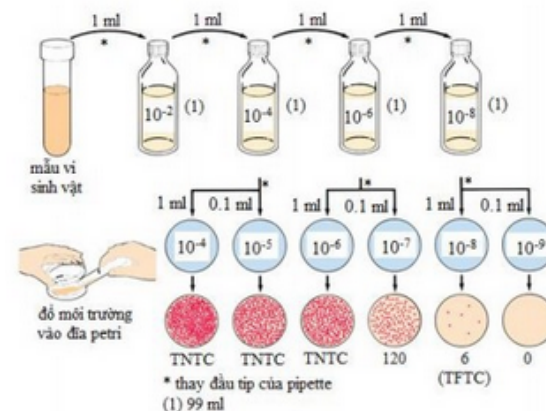
3.2. Phương pháp đo độ đục

- 1) Cho môi trường dùng để nuôi cấy vi sinh vật (đã tiệt trùng) vào cuvette (Hình 69). Đặt cuvette vào máy quang phổ kế sao cho mặt trong suốt của cuvette thẳng hướng với khe sáng. Đóng nắp buồng chứa cuvette. Nhấn nút "blank" để xem như đây là mẫu chuẩn để so sánh với các mẫu nghiên cứu. Lúc này giá trị độ hấp thụ (Abs, Absorbance) là 0 và độ truyền suốt (%T, Transmittance) là 100%. Các giá trị thu nhận được ở bước sóng sử dụng từ 500-600 nm (tùy theo nghiên cứu cụ thể).
- 2) Lần lượt cho mẫu huyền phù vi sinh vật (được nuôi cấy trên môi trường ở bước 1) vào cuvette. Đưa mẫu vào máy quang phổ kế. Đóng nắp buồng chứa cuvette, đo và ghi nhận giá trị Abs.
- 3) Vẽ đồ thị đường thẳng tương quan tuyến tính giữa giá trị Abs của mẫu và giá trị CFU/ml (hay CFU/g) của mẫu (Hình 70). Từ đó, tính ra phương trình $y = ax + b$ thể hiện mối tương quan giữa độ đục đo được và mật độ vi khuẩn trong mẫu nghiên cứu.

Phương trình tuyến tính có giá trị R^2 càng gần bằng 1.0 thì độ tin cậy của đường tương quan càng cao.

4. CÂU HỎI KIỂM TRA

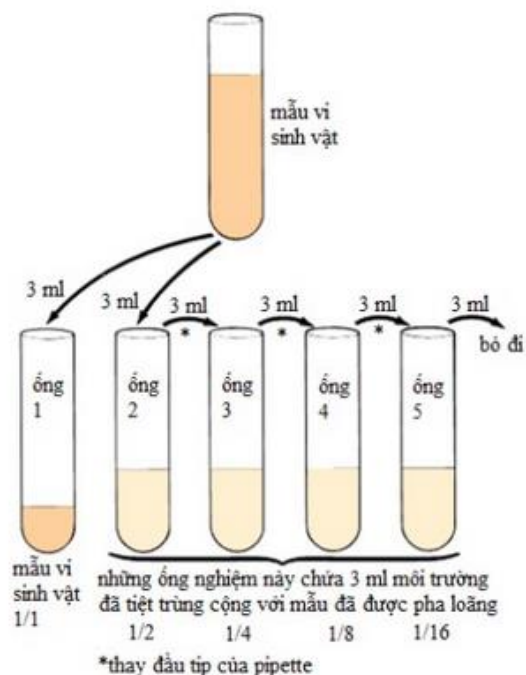
- 1) Trình bày sự khác biệt giữa độ truyền suốt (%T) và độ hấp thụ (Abs)?
- 2) Tại sao cách xác định mật độ tế bào sống vi sinh vật bằng phương pháp đếm trên đĩa thạch là một phương pháp gián tiếp, trong khi đó, phương pháp đo độ đục không được xem là một phương pháp "đếm mật độ vi sinh vật" đúng nghĩa?
- 3) Tại sao độ hấp thụ (Abs) được sử dụng để dựng đường chuẩn thay vì sử dụng độ truyền suốt (%T)?
- 4) Mục đích của việc dựng đường chuẩn?
- 5) Tại sao cần phải sử dụng phương pháp đếm khuẩn lạc trên đĩa thạch cùng lúc với việc đo độ đục khi dựng đường chuẩn?
- 6) Nêu một vài lý do giải thích việc phải lắc kỹ các bình chứa mẫu pha loãng (10^{-2} , 10^{-4} ...)?
- 7) CFU là gì?
- 8) Trình bày cách chuẩn bị một dãy độ pha loãng để có độ pha loãng cuối cùng là 10^{-10} ?
- 9) Liệt kê một số ưu điểm và nhược điểm của việc xác định mật độ tế bào bằng phương pháp đo độ đục?



Hình 66. Quy trình định lượng vi khuẩn bằng phương pháp đổ đĩa



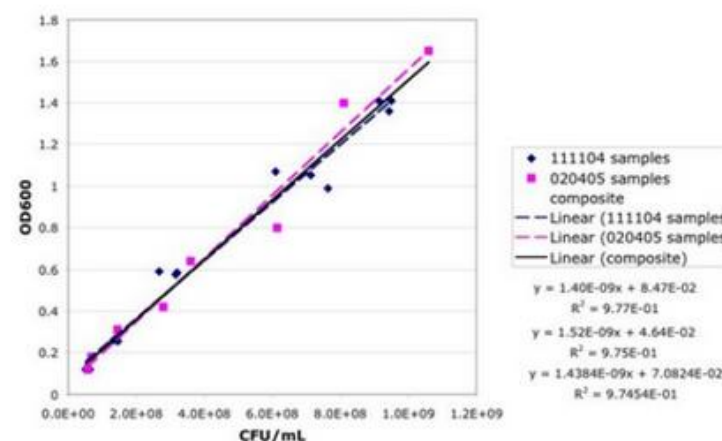
Hình 67. Thiết bị đếm khuẩn lạc Quebec



Hình 68. Cách pha loãng mẫu bậc hai



Hình 69. Nguyên tắc hoạt động của máy quang phổ kế (spectrophotometer) (phải) và cuvette chứa mẫu (trái)



Hình 70. Ví dụ về đường tương quan tuyến tính giữa giá trị độ hấp thụ ở bước sóng 600 nm (OD600) và mật độ vi khuẩn (CFU/ml)

PHỤ LỤC

CÁC LOẠI DUNG DỊCH, THUỐC THỬ, THUỐC NHUỘM, MÔI TRƯỜNG

Dung dịch Alkaline methylen blue

Dung dịch A

Methylene blue (90%)	0.3 g
95% ethyl alcohol	30 ml

Dung dịch B

Potassium hydroxide (KOH)	0.01 g
Nước cất	100 ml

Trộn dung dịch A và dung dịch B. Lọc qua giấy Whatman No.1 trước khi sử dụng.

Crystal violet (nhuộm vô nhầy, dung dịch 1%)

Crystal violet (85%)	1 g
Nước cất	100 ml

Crystal violet (nhuộm Gram)

(cải biên từ phương pháp của Hucker)

A.	Crystal violet (85%)	2 g
	95% ethyl alcohol (C_2H_5OH)	20 ml
	Trộn và hòa tan hoàn toàn	
B.	Ammonium oxalate ($(NH_4)_2C_2O_4$)	0.8 g
	Nước cất	80 ml

Trộn dung dịch A vào dung dịch B. Để yên trong 1 ngày, sau đó đem lọc. Nếu thuốc nhuộm Crystal violet (nhuộm Gram) quá đặc thì có thể pha loãng dung dịch A 10 lần.

Eosin blue

Thuốc nhuộm Eosin blue	1 g
Nước cất	99 ml

Gram's iodine

Iodine crystal	1 g
Potassium iodine	2 g
Nước cất	300 ml

Giữ trong chai sẫm màu. Loại bỏ dung dịch này khi bị nhạt màu.

Mực tàu (India ink)

(Higgins No.4465 đen hay Pelikan Drawing ink No.17 đen hoặc SpotTest India ink của Difco)

Trộn đều mẫu cần nhuộm với 1 giọt mực tàu lên phiến kính. Nếu mực quá đặc, có thể pha loãng với nước theo tỷ lệ 1/2.

Loeffler's alkaline methylene blue

Dung dịch bão hòa

Methylen blue	1.5 g
95% ethyl alcohol (C_2H_5OH)	100 ml

Dung dịch nhuộm

Dung dịch bão hòa	30 ml
KOH	1 ml
Nước cất	90 ml

Lọc trước khi sử dụng

Malachite green (nhuộm bào tử)

Malachite green oxalate	5 g
Nước cất	100 ml

Methylen blue (nhuộm đơn)	
Methylene blue	0.3 g
Nước cất	100.0 ml

Dung dịch Nigrosin (Dorner's, dùng nhuộm âm bản)	
Nigrosin (tan trong nước)	10.0 g
Nước cất	100.0 ml
Formalin (40% formaldehyde)	0.5 ml
Đun nhẹ Nigrosin và nước trong 30 phút. Sau đó, bổ sung 0.5 ml 40% formaldehyde (chất bảo quản). Lọc hai lần qua giấy lọc Whatman No.1. Dung dịch Nigrosin được giữ trong chai sẫm màu và bảo quản trong tủ lạnh.	

Ziehl's carbofuchsin	
<i>Dung dịch carbofuchsin</i>	
Basic fuchsin (90%)	0.3 g
95% ethyl alcohol	10 ml
Sau đó nhỏ 1 giọt Terginol No.4 vào 30 ml dung dịch carbofuchsin hoặc 2 giọt Triton-X vào 100 ml dung dịch carbofuchsin. Terginol No.4 và Triton-X là chất tẩy rửa, chất tạo nhũ, chất tạo ẩm.	

Dung dịch Safranin (nhuộm Gram)	
<i>Dung dịch đậm đặc</i>	
Safranin	2.5 g
95% ethyl alcohol	100.0 ml
Dung dịch dùng để nhuộm Gram được chuẩn bị bằng cách pha dung dịch đậm đặc theo tỷ lệ 1/10 (10 ml dung dịch Safranin đậm đặc pha với 90 ml nước cất)	

Tyler's crystal violet	
Cystal violet (85%)	0.1 g
Glacial acetic acid	0.25 ml
Nước cất	100 ml

Phẩm nhuộm West (nhuộm tiên mao)	
<i>Dung dịch A (chất cần màu)</i>	
Dung dịch aluminium potassium sulfate	50 ml
bảo hòa	
Dung dịch 10% tannic acid	100 ml
Dung dịch 5% ferric chloride	10 ml
Chứa trong chai được bọc bằng giấy nhôm và bảo quản ở 5°C.	
<i>Dung dịch B (phẩm nhuộm)</i>	
Silver nitrate	7.5 g
Nước cất	150 ml
Việc pha hóa chất được tiến hành trong tủ hút khí độc. Dung dịch silver nitrate được trộn trong beaker bằng khuấy từ.	
NH ₄ (OH) đậm đặc	140 ml
NH ₄ (OH) được nhỏ từ từ thành từng giọt vào dung dịch silver nitrate (đang khuấy từ). Kết tủa màu nâu sẽ hình thành khi nhỏ NH ₄ (OH) vào dung dịch silver nitrate. Sau khi thêm đủ lượng NH ₄ (OH), kết tủa màu nâu sẽ bị hòa tan. Cuối cùng, nhỏ từng giọt 5% silver nitrate cho đến khi tạo dung dịch vẫn đục. Dung dịch B được giữ ở chai có bọc giấy nhôm và bảo quản ở 5°C.	

Môi trường Eosin methylen blue agar (môi trường EMB agar)	
Peptone	10.0 g
Lactose	5.0 g
Sucrose	5.0 g
Dipotassium phosphate	2.0 g
Agar	13.5 g
Eosin Y	0.4 g
Methylene blue	0.06 g
Nước cất	đủ 1.0 L
pH 7.2	

Môi trường Eugon agar

Tryptose	15.0 g
Soytone	5.0 g
Dextrose	5.0 g
L-cystein	0.2 g
Sodium chloride	4.0 g
Sodium sulfite	0.2 g
Agar	15.0 g
Nước cất	đủ 1.0 L
pH 7.0	

Môi trường Glucose-mineral salts broth

Dipotassium phosphate, K_2HPO_4	7.0 g
Potassium phosphate, KH_2PO_4	2.0 g
Hydrated magnesium sulfate, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.2 g
Ammonium sulfate, $(NH_4)_2SO_4$	1.0 g
Glucose	5.0 g
Nước cất	đủ 1.0 L

Môi trường MaConkey's Agar

Bacto peptone	17.0 g
Proteose peptone	3.0 g
Lactose	10.0 g
Bile salts mixture	1.5 g
Sodium chloride	5.0 g
Agar	13.5 g
Neutral red	0.03 g
Crystal violet	0.001 g
Nước cất	đủ 1.0 L
pH 7.1	

Môi trường Nutrient broth (môi trường NB)

Peptone	5.0 g
Beef extract	3.0 g
Nước cất	đủ 1.0 L
pH 7.0	

Môi trường Nutrient agar (môi trường NA)

Peptone	5.0 g
Beef extract	3.0 g
Agar	15 g
Nước cất	đủ 1.0 L
pH 7.0	

Môi trường Mannitol Salt Agar (môi trường MSA)

Beef extract	1.0 g
Peptone	10.0 g
Sodium chloride	75.0 g
D-mannitol	10.0 g
Agar	15.0 g
Phenol red	0.025 g
Nước cất	đủ 1.0 L
pH 7.4	

Môi trường Nutrient broth (môi trường NB)

Peptone	5.0 g
Beef extract	3.0 g
Nước cất	đủ 1.0 L
pH 7.0	

Môi trường TSA (tryptic soy agar)

Agar	15 g
Casein peptone (pancreatic)	15 g
Sodium chloride	5 g
Soya peptone (papainic)	5 g
Nước cất	đủ 1.0 L
7.3±0.2 (25°C)	

Môi trường TSB (tryptic soy broth)

Casein peptone (pancreatic)	17 g
Dipotassium hydrogen phosphate	2.5 g
Glucose	2.5 g
Sodium chloride	5 g
Soya peptone (papain digest.)	3 g
Nước cất	đủ 1.0 L
7.3 ± 0.2 (25°C)	

Môi trường Brewer's Anaerobic Agar (môi trường BAA)

Bacto tryptone	5.0 g
Proteose peptone	10.0 g
Bacto yeast extract	5.0 g
Bacto dextrose	10.0 g
Sodium chloride	5.0 g
Agar	20.0 g
Sodium thioglycollate	2.0 g
Sodium formaldehyde sulfoxylate	1.0 g
Resazurin	0.002 g
Nước cất	đủ 1 L
pH 7.2	

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Harley Prescott. 2002. *Laboratory Exercises in Microbiology*, 5th edition. The McGraw-Hill Companies.
2. Ciira Kiiyukia. 2003. *Laboratory Manual of Food Microbiology for Ethiopian Health and Nutrition Research Institute* (Food Microbiology Laboratory). Unido Project YA/ETH/03/436/11-52.
3. Josephine A. Morello, Paul A. Granato, Helen Eckel Mizer. 2003. *Laboratory Manual and Workbook in Microbiology-Application to Patient Care*, 7th edition. The McGraw-Hill Companies.
4. Center for Food Safety and Applied Nutrition. 2001. *Bacteriological Analytical Manual Online*. U.S Food & Drug Administration.
5. Nagendra Shah. 2004. *Food Microbiology Laboratory Manual*. School of Molecular Sciences Victoria University.
6. Ronald M. Atlas. 2006. *Handbook of Microbiological Media for the Examination of Food*. CRC Press, Taylor & Francis Group.
7. Trần Linh Thuộc. 2003. *Phương pháp phân tích vi sinh vật trong nước, thực phẩm và mỹ phẩm*. NXB Giáo Dục.
8. Lê Văn Việt Mẫn, Lại Mai Hương. 2006. *Thí nghiệm Vi sinh vật học thực phẩm*. NXB Đại học Quốc gia TP HCM.

**CÁC KỸ THUẬT CƠ BẢN
TRONG THỰC NGHIỆM
VI SINH VẬT HỌC**

TS. TRỊNH KHÁNH SƠN

NHÀ XUẤT BẢN

ĐẠI HỌC QUỐC GIA THÀNH PHỐ HỒ CHÍ MINH

Khu phố 6, Phường Linh Trung, Quận Thủ Đức, TP Hồ Chí Minh
Đường C, số 10-12 Đinh Tiên Hoàng, Phường Bến Nghé, Quận 1,
TP Hồ Chí Minh

ĐT: 028 6272 6361 – 028 6272 6390

E-mail: vnuh.p@vnuhcm.edu.vn

**PHÒNG PHÁT HÀNH & TRUNG TÂM SÁCH
ĐẠI HỌC**

Đường C, số 10-12 Đinh Tiên Hoàng, Phường Bến Nghé, Quận 1,
TP Hồ Chí Minh

ĐT: 028 6272 6361 – 028 6272 6390

Website: www.nxbdqhcm.edu.vn

Nhà xuất bản ĐHQG-HCM và tác giả đồng tác
liên kết giữ bản quyền

Copyright © by VNU-HCM Press and author/
co-partnership All rights reserved

TRUNG TÂM SÁCH ĐẠI HỌC

Đường C, số 10-12 Đinh Tiên Hoàng, Phường Bến Nghé, Quận 1,
TP Hồ Chí Minh

ĐT: 028 6272 6350 – 028 6272 6353

Website: www.sach.daihoc.edu.vn

Chịu trách nhiệm xuất bản

NGUYỄN HOÀNG DŨNG

Chịu trách nhiệm nội dung

NGUYỄN HOÀNG DŨNG

Tổ chức bản thảo và chịu trách nhiệm về tác quyền

TRƯỜNG ĐẠI HỌC SƯ PHẠM KỸ THUẬT TP. HCM

Website: www.hcmute.edu.vn

Biên tập

LÊ THỊ MINH HUỆ

Sửa bản in

THANH HÀ

Trình bày bìa

TRƯỜNG ĐẠI HỌC SƯ PHẠM KỸ THUẬT TP. HCM

Số lượng 300 cuốn,

Khổ 16 x 24 cm,

ĐKKHXB số: 1002-2017/CXBIPH/07-

51/ĐHQGTPHCM,

Quyết định XB số 324/QĐ-ĐHQGTPHCM

của NXB ĐHQG-HCM

cấp ngày 26-12-2017

In tại: Công ty TNHH

In & Bao bì Hưng Phú

Đ/c: 162A/1 - KP1A - P. An Phú -

TX Thuận An - Bình Dương

Nộp lưu chiểu: Quý II/2018



ISBN: 978 – 604 – 73 – 5138 – 1

**CÁC KỸ THUẬT CƠ BẢN
TRONG THỰC NGHIỆM VI SINH VẬT HỌC**

TS. TRỊNH KHÁNH SƠN

Bản tiếng Việt ©, TRƯỜNG ĐẠI HỌC SƯ PHẠM KỸ THUẬT TP HCM, NXB ĐHQG-HCM
và CÁC TÁC GIẢ.

Bản quyền tác phẩm đã được bảo hộ bởi Luật Xuất bản và Luật Sở hữu trí tuệ Việt Nam. Nghiêm
cấm mọi hình thức xuất bản, sao chép, phát tán nội dung khi chưa có sự đồng ý của tác giả và
Nhà xuất bản.

ĐỂ CÓ SÁCH HAY, CẦN CHÚNG TAY BẢO VỆ TÁC QUYỀN!



ISBN: 978-604-73-5138-1

