

**TRƯỜNG ĐẠI HỌC CÔNG NGHỆ SÀI GÒN
KHOA CÔNG NGHỆ THỰC PHẨM**

BÀI GIẢNG THỰC HÀNH HỆ ĐẠI HỌC

VI SINH ĐẠI CƯỜNG

Năm học 2010-2011

NỘI QUI PHÒNG THÍ NGHIỆM

Một số vi sinh vật được sử dụng trong các bài thí nghiệm có thể gây bệnh cho người và động vật, vì thế các nội qui được ban hành để ngăn ngừa nguy cơ nhiễm bệnh cho sinh viên và cán bộ phòng thí nghiệm. Bất kỳ cá nhân nào không tuân thủ tốt các nội qui hay gây nguy hại cho người khác đều không được phép vào phòng thí nghiệm. Khi có bất kỳ thắc mắc nào cần phải yêu cầu sự hướng dẫn của giáo viên hoặc cán bộ phòng thí nghiệm.

1. Các qui định chung

- + Sinh viên vào phòng thí nghiệm phải mặc trang phục bảo hộ (áo khoác trắng) có bảng tên (thẻ sinh viên)
- + Sinh viên phải tham dự 100% các buổi thí nghiệm
- + Sinh viên phải đến đúng giờ, nếu đến trễ quá 15 phút, sinh viên không được phép vào phòng thí nghiệm và được xem như vắng mặt không lý do
- + Nếu vì bất kỳ lý do bất khả kháng nào sinh viên không tham dự được buổi thí nghiệm, sinh viên phải báo trước (hoặc vào buổi thí nghiệm) cho cán bộ các trách nhiệm
- + Khi làm hư hỏng các trang thiết bị/dụng cụ của phòng thí nghiệm, sinh viên có nghĩa vụ phải hoàn trả lại
- + Sinh viên phải đọc kỹ bài trước khi vào thí nghiệm và không được mang tài liệu thí nghiệm vào phòng
- + Khi làm đổ/tràn các dung dịch hoặc làm bể dụng cụ thủy tinh 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.
- + Giảm thiểu sự hình thành khí dung khi thao tác.
- + Rửa tay trước và sau khi thí nghiệm.
- + Không được ăn/uống/nghe nhạc/đọc sách-báo trong phòng thí nghiệm.
- + Đọc kỹ các nội qui/qui định có ở cửa phòng thí nghiệm.
- + Vệ sinh bàn/ghế/kệ và các dụng cụ trước và sau khi thí nghiệm.
- + Đổ bỏ rác thải đúng qui định.
- + Không ngậm các đồ dùng (viết, kiếng...) trong miệng hay cắn vào tai.
- + Đọc và ký tên vào các qui định/nội qui để chắc chắn sinh viên đã đọc và hiểu.
- + Trả đầy đủ dụng cụ sau khi hoàn thành xong bài thí nghiệm. Dụng cụ phải được rửa sạch.

+ Vệ sinh phòng thí nghiệm theo yêu cầu của người phụ trách

2. Các yêu cầu an toàn

+ Cột tóc, mặc các phục trang bảo hộ (áo khoác trắng, găng tay chống nhiệt...) và dùng dụng cụ/thiết bị đúng lúc, đúng nơi.

+ Nghiêm cấm dùng miệng hút pipette.

3. Trong các tình huống khẩn cấp

+ Lưu ý vị trí các trang bị cấp cứu khi cần (dụng cụ y tế, bình cứu hỏa, vòi nước, 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 phòng thí nghiệm.

+ Bình tĩnh khi có tình huống khẩn cấp.

PTN Chất lượng Thực phẩm

CÁC THAO TÁC CƠ BẢN TRONG PHÒNG THÍ NGHIỆM VI SINH

1. Môi trường , pha chế và chuẩn bị môi trường

1.1. Môi trường nuôi cấy vi sinh vật:

Để phân lập, nuôi cấy hay bảo quản giống vi sinh vật, người ta phải sử dụng các môi trường dinh dưỡng đặc (hoặc lỏng). Môi trường dinh dưỡng không chỉ chứa các thành phần cần cho sự phát triển của vi sinh vật mà còn phải đảm bảo các điều kiện lý hóa thích hợp cho sự trao đổi chất của vi sinh vật với môi trường bên ngoài.

Vì vậy, để thiết lập môi trường cần phải biết rõ nhu cầu của vi sinh vật về các chất dinh dưỡng và các đặc điểm trao đổi chất của chúng. Cần lưu ý là nồng độ các chất hòa tan trong môi trường phải cân bằng áp suất thẩm thấu của tế bào vi sinh vật thì mới đảm bảo được sự phát triển tối ưu của chúng

Môi trường thường đặt tên theo người đã sáng tạo ra chúng (ví dụ môi trường Kzapek, môi trường Hansen) hay theo các thành phần dinh dưỡng đặc trưng của môi trường đó (ví dụ môi trường dịch trích giá đậu, khoai tây)

1.2. Nguyên tắc pha chế môi trường:

Nguyên tắc cơ bản nhất để pha chế môi trường là phải đảm bảo các nhu cầu cơ bản của vi sinh vật (nguồn C, N và các khoáng). Ngoài ra còn có một số nguyên tắc sau:

a. Tùy theo nhu cầu nghiên cứu hay học tập mà pha chế môi trường phù hợp:

- Nếu muốn nuôi cấy vi sinh vật để quan sát hình thái thì phải nuôi cấy trên môi trường đặc
- Nếu muốn tìm hiểu sự trao đổi chất của vi sinh vật thì dùng môi trường lỏng
- Môi trường chỉ chứa cao thịt, pepton dùng nuôi cấy vi khuẩn hoại sinh

b. Tùy vào nhu cầu dinh dưỡng đặc biệt của vi sinh vật để bổ sung thành phần khác nhau nào đó:

- Cần nuôi cấy vi sinh vật phân giải cellulose cần bổ sung cellulose vào môi trường
- Cần nuôi cấy vi sinh vật chuyển hóa N, cần bổ sung các hợp chất chứa N vào môi trường
- Hay bổ sung các kháng sinh vào môi trường nhằm nuôi cấy các vi sinh vật có khả năng kháng lại kháng sinh

1.3. Phân loại môi trường

i. Dựa vào thành phần

- Môi trường tự nhiên: Các loại môi trường là các hợp chất tự nhiên như: khoai tây, cám gạo, bã khoai mì, phế phẩm chế biến thịt, dịch sữa... thành phần môi trường thường phức tạp và không ổn định
- Môi trường tổng hợp: sử dụng các loại hóa chất hữu cơ hoặc vô cơ tinh khiết để pha chế môi trường với tỷ lệ chính xác
- Môi trường bán tổng hợp: sử dụng cả các hóa chất tinh khiết lẫn các thành phần tự nhiên.

ii. Dựa vào tính chất vật lý

- Môi trường lỏng
- Môi trường rắn: thường có từ 1,5-2% agar hoặc gelatine
- Môi trường bán lỏng: có khoảng 0,3-0,7% agar

iii. Dựa vào công dụng:

- Môi trường đặc trưng hay chọn lọc: môi trường có chứa một thành phần đặc biệt chỉ phù hợp với 1 hoặc 1 nhóm vi sinh vật nào đó. Ví dụ môi trường dùng để phân lập vi sinh vật chuyển hóa đạm, chuyển hóa lân...
- Môi trường kiểm định: dùng để xác định một tính chất nào đó của vi sinh vật. Người ta thường bổ sung một hợp chất đặc biệt có sự biến đổi có thể nhìn thấy được trong quá trình nuôi cấy vi sinh vật như các chất chỉ thị màu.

1.4. Cách pha chế môi trường

Pha chế môi trường là một khâu quan trọng do vậy cần phải chính xác. Gồm các bước sau:

- Cân các thành phần môi trường
- Nếu là môi trường lỏng: pha các thành phần vào nước, chú ý thứ tự pha chế
- Nếu là môi trường đặc: hòa tan các thành phần vào nước rồi thêm 1,5-2% agar và đun đến khi agar tan chảy.
- Lọc: thường lọc môi trường qua vải hoặc bông
- Chỉnh pH: tùy theo yêu cầu vi sinh vật hoặc yêu cầu nghiên cứu, thường điều chỉnh pH phù hợp. Thường dùng các loại hóa chất như: H_2SO_4 , H_3PO_4 , KOH, NaOH...
- Phân phối vào dụng cụ chứa: nếu là bình chứa thì cho vào khoảng 2/3 thể tích bình, nếu là làm môi trường thạch đĩa thì cho vào khoảng 10-

15ml/dĩa, nếu làm thạch nghiêng thì cho vào 1/4-1/5 chiều cao ống nghiệm.

- Tiệt trùng môi trường: thường dùng phương pháp chủ yếu là nhiệt ẩm với áp suất cao (121°C, 1atm) nhằm tiêu diệt tất cả các bào tử cũng như các vi sinh vật không mong muốn có sẵn trong môi trường .

Thực hiện pha chế môi trường

Mỗi nhóm thực hành pha chế hai môi trường dùng để nuôi cấy vi sinh vật như sau:

- Môi trường 1 (môi trường dịch trích giá đậu):

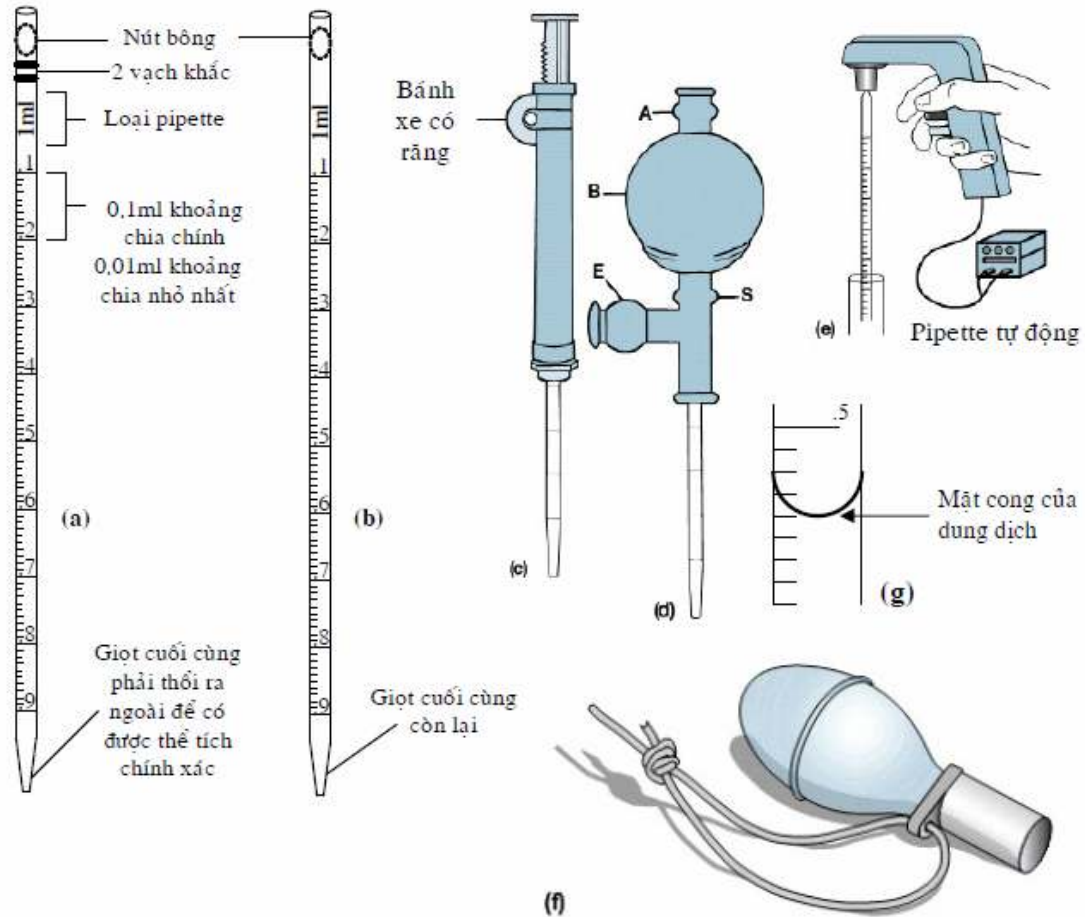
- + Giá đậu: 200g
- + Glucose: 10g
- + Trypton: 5g
- + Yeast extract: 1g
- + Agar: 15g
- + H₂O: đủ 1l

- Môi trường 2 (Môi trường dịch trích khoai tây):

- + Khoai tây: 200g
- + Saccharose: 50g
- + Pepton: 5g
- + Yeast extract: 1g
- + Agar: 20g
- + H₂O: đủ 1l

Cách thực hiện: giá đậu hoặc khoai tây đun với H₂O để sôi trong 20 phút, lọc lấy dịch trong, bổ sung các thành phần còn lại. Sau đó tiếp tục đun đến khi agar tan hoàn toàn. Phân phối vào các bình chứa và đem tiệt trùng ở 121°C trong 15 phút.

2. Các dụng cụ sử dụng trong vi sinh vật học



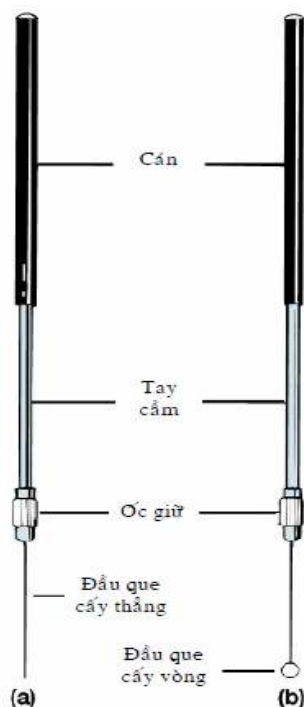
Các loại pipette. (a) blow-out (huyết thanh) pipette. (b) to-deliver (Mohr) pipette. (c) bơm plastic. Bơm này được gắn với pipette và bánh xe có răng dùng để hút/thổi dung dịch vào/ra khỏi pipette. (d) ống bóp pipette. Khi nhấn van A, và bóp quả bóp cao su B sẽ làm nó xẹp xuống. Để hút dung dịch, nhấn van S; để thổi dịch ra ngoài, nhấn van E. (e) pipette tự động với thể tích 1 đến 150 ml. Chỉ cần nhấn nút là có thể hút và tháo dịch vào/ra khỏi pipette. (f) Quả bóp cao su loại thường dùng. Quả bóp cao su với một miếng silicon hình nón được gắn với các pipette nhỏ. Quả bóp cao su sau khi được bóp xẹp sẽ được gắn vào pipette. Để hút dịch chỉ cần buông quả bóp ra, sau đó rút bỏ quả bóp ra khỏi pipette và dùng ngón trỏ để điều chỉnh thể tích dung dịch trong pipette. (g) thể tích dung dịch trong pipette được đọc tại mặt cong của dung dịch.

2.1. Dụng cụ dùng cấy chuyên

Các loại dụng cụ dùng cấy chuyên đều nhằm mục đích chuyển vi sinh vật từ môi trường cũ sang một môi trường mới cho các nhu cầu khác nhau: cấy chuyên, nhân giống, phân lập vi sinh vật.

Tất cả các dụng cụ dùng cấy chuyên đều phải đảm bảo được vô trùng bằng nhiều cách khác nhau, nhằm tránh việc đưa vào môi trường những vi sinh vật không

mong muốn. thường sử dụng phương pháp tiệt trùng bằng nhiệt khô 140-150°C trong ít nhất 1 giờ. Các dụng cụ kể trên đều chủ yếu dùng chuyển đổi vi sinh vật từ một môi trường lỏng sang môi trường khác. Để chuyển vi sinh vật từ môi trường rắn sang môi trường khác, người ta chủ yếu sử dụng que cấy vòng/ thẳng hoặc que cấy móc.



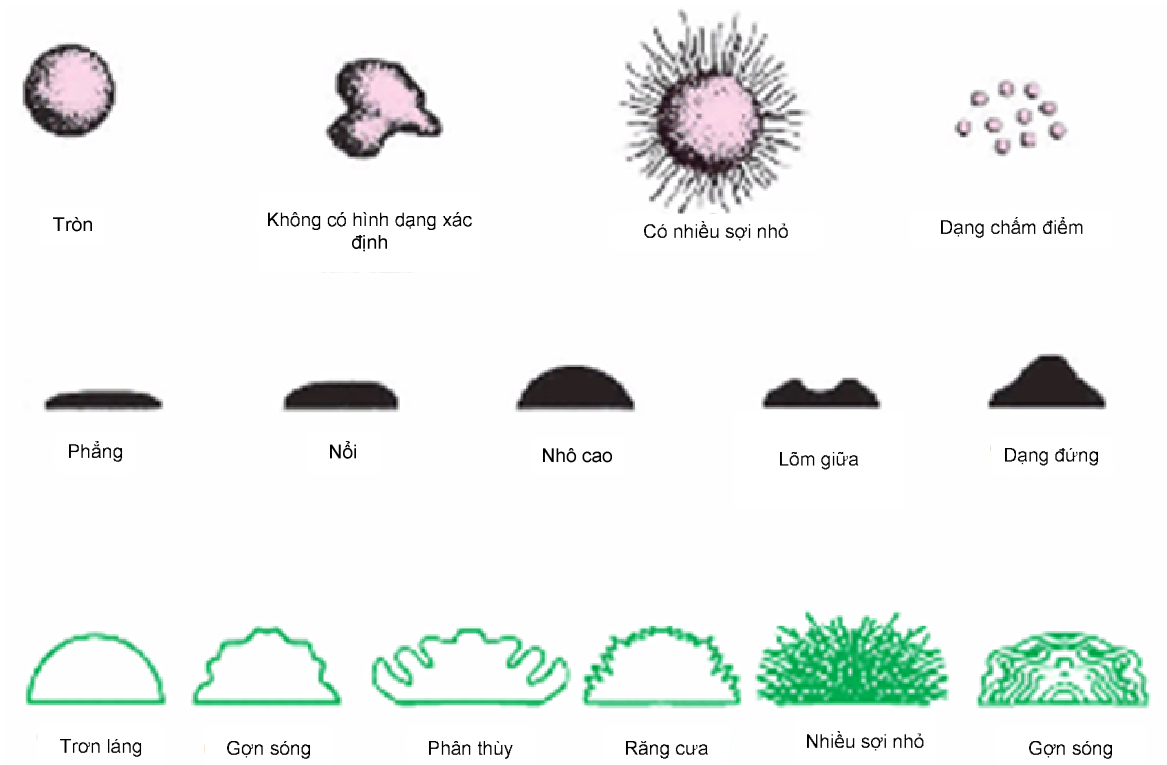
Que cấy thẳng (a) và que cấy vòng (b)

Khi sử dụng que cấy, thường que cấy sẽ được tiệt trùng trên ngọn lửa đèn cồn hoặc đèn Bunsen. Khi tiệt trùng phải đảm bảo đầu que cấy hoặc bất cứ thành phần nào của que cấy phải được tiệt trùng hoàn toàn bằng cách đốt nóng đỏ.

2.2. Các phương pháp phân lập và cấy chuyển vi vi sinh vật:

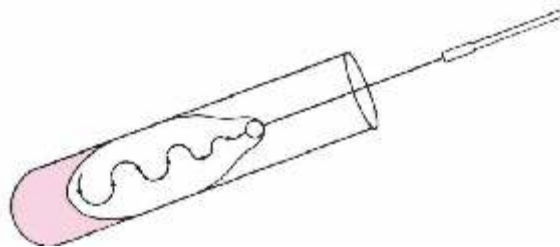
Phân lập vi sinh vật là việc phân tách các chủng vi sinh vật trong môi trường tự nhiên và cô lập chúng nhằm chọn lựa giống vi sinh vật thuần khiết cho những mục đích khác nhau. Để phân lập vi sinh vật, người ta thường tiến hành nuôi cấy vi sinh vật trên các môi trường chọn lọc nhằm ưu tiên sự phát triển của một loại vi sinh vật nào đó.

Nếu như không có được môi trường đặc trưng thì thường người ta sẽ nuôi vi sinh trên các môi trường rắn và làm cách nào đó tách rời các tế bào vi sinh vật và cho chúng phát triển riêng rẽ trên môi trường rắn để tạo thành khuẩn lạc (colony) với hình dáng đặc trưng và việc chọn lựa sẽ được tiến hành trên các khuẩn lạc này.

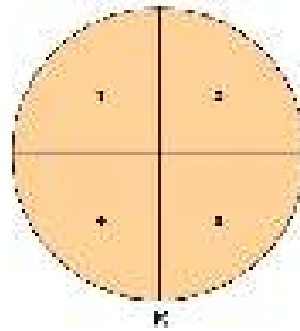
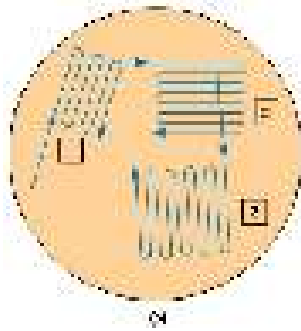
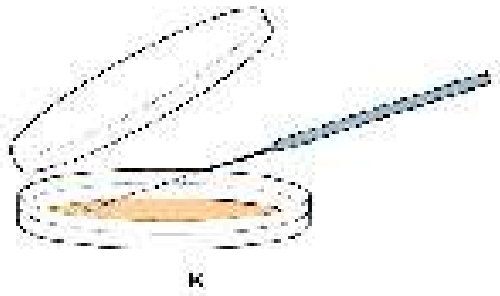


Một số hình dạng khuẩn lạc mọc trên môi trường rắn: hàng 1 (nhìn từ trên xuống), hàng 2 (nhìn ngang), hàng 3 (dạng rìa khuẩn lạc)

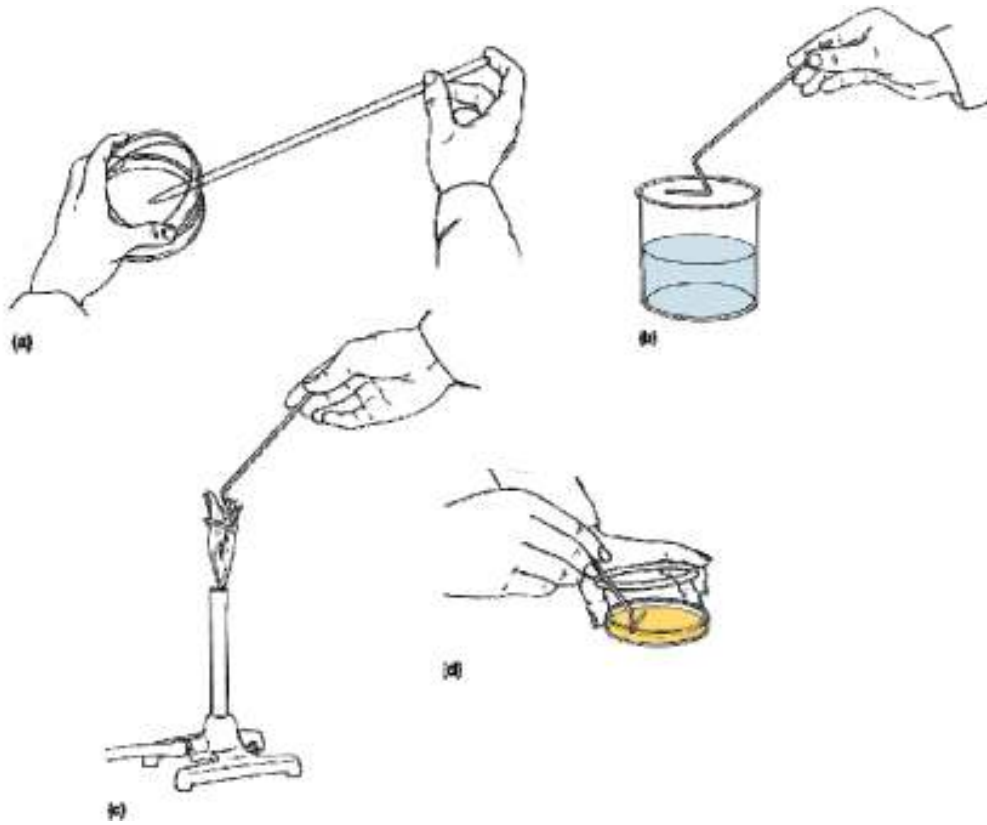
Các phương pháp cấy



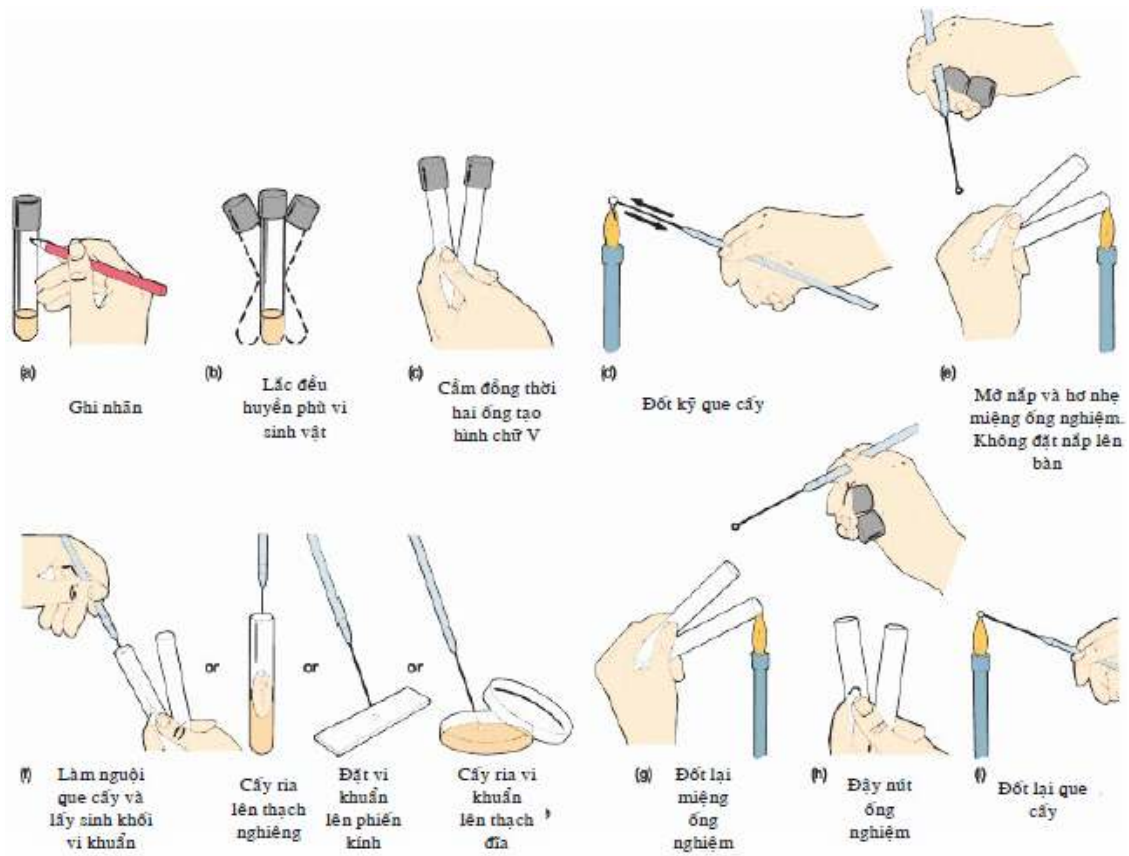
Cách cấy trong ống thạch nghiêng



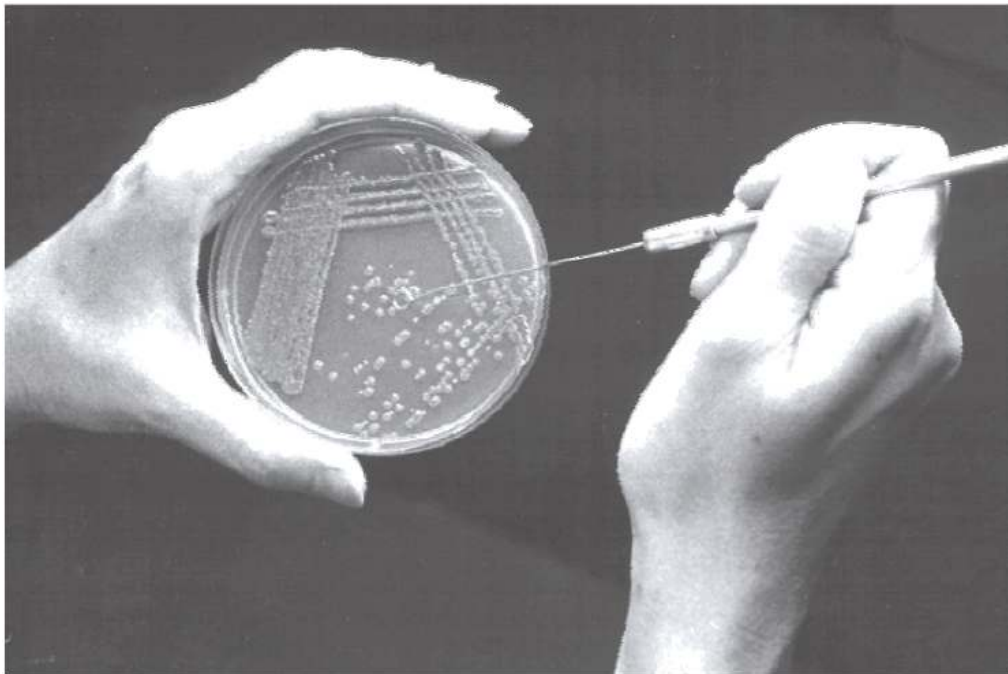
Cấy trên đĩa môi trường thạch bằng que cấy vòng



Cấy trên đĩa môi trường thạch bằng que trải



Các thao tác chính khi cấy vi sinh vật



Các khuẩn lạc mọc riêng rẽ, dễ chọn lựa

Thực hành:

Sử dụng môi trường đã pha chế ở phần trên, tiến hành làm các dạng môi trường thạch đĩa, thạch nghiêng và tiến hành cấy một số giống vi sinh vật do phòng thí nghiệm cung cấp. Nuôi ủ ở nhiệt độ thích hợp và đánh giá kết quả sau 48 giờ nuôi cấy.

KÍNH HIỂN VI QUANG HỌC NỀN SÁNG

Một kính hiển vi tốt 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*). Kính hiển vi này có nhiều thấu kính và có một nguồn ánh sáng trắng. 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. Kính hiển vi loại này sẽ được chúng ta sử dụng trong toàn bộ môn học này. Nếu sử dụng thành thạo kính hiển vi, sinh viên có thể thu nhận được những thông tin chính xác và hữu ích về các tiêu bản hoặc mẫu nuôi cấy vi sinh vật. Việc nghiên cứu trong phòng thí nghiệm với kính hiển vi sẽ giúp cho chúng ta có được những ấn tượng sâu sắc về các hình thái rất nhỏ bé của sự sống, những hình thái chỉ quan sát được khi chúng được phóng đại nhiều lần.

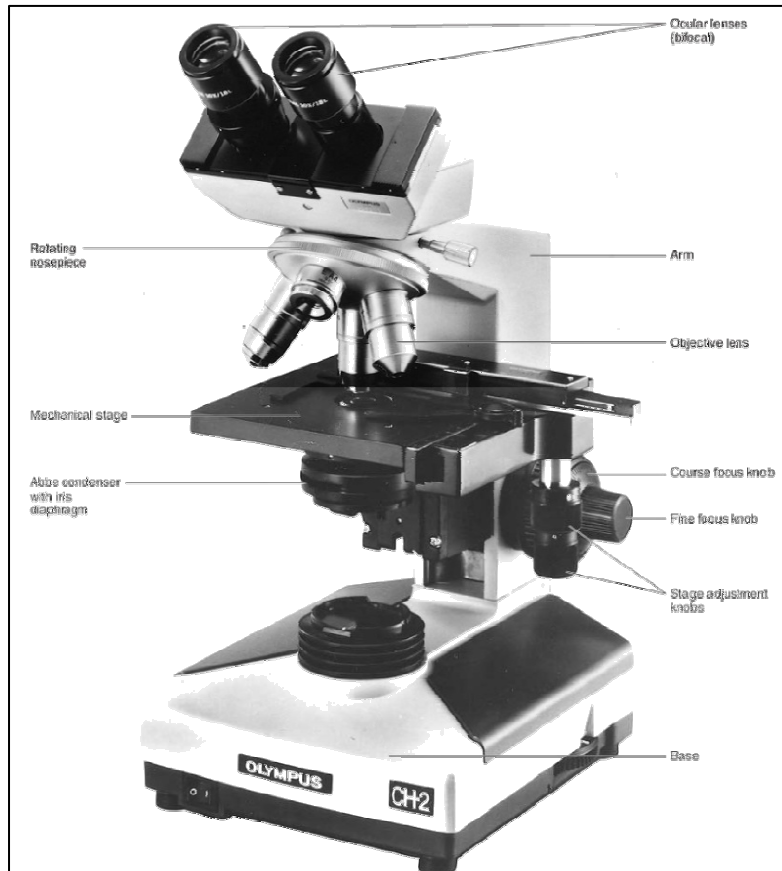
1. Các bộ phận chủ yếu của kính hiển vi quang học nền sáng và chức năng của chúng

- a. Hãy nhìn vào kính hiển vi trước mặt và so sánh nó với hình vẽ. Kính hiển vi 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). Không bao giờ được nhấc kính lên bằng cách nắm vào các thấu kính.
- b. Hãy nhìn vào bàn chứa tiêu bản, chúng 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. Lưu ý đến núm điều chỉnh bên cạnh bàn chứa tiêu bản, chúng 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*)
- c. Một đèn chiếu được đặt trong chân đế. 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 núm 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.

- d. Phía trên bàn chứa tiêu bản, được gắn với tay cầm, là một ống tròn (*tube*) có các thấu kính phóng đại. 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).
- e. 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. Khi sử dụng phải vặn nút 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. 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 nút thứ cấp khi mắt đang nhìn vào thị kính và điều chỉnh nhẹ nhàng để chỉnh rõ nét ảnh đang quan sát.
- f. Lưu ý chỉ được hạ bàn chứa mẫu vật 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
- g. Khi xoay nút thứ cấp quá nhanh có thể làm cho nút xoay bị kẹt cứng, khi đó không được cố xoay tiếp mà phải thông báo ngay cho giáo viên hướng dẫn.
- h. Tổng số lần phóng đại tùy thuộc vào vật kính và thị kính đang dùng. Nhìn vào thị kính, sinh viên sẽ thấy một ký hiệu “**10X**”, có nghĩa là phóng đại 10 lần. Nhìn vào các vật kính sẽ thấy ký hiệu “**4X**”, “**10X**”, “**40X**” và “**100X**”, tương ứng với độ phóng đại 4, 10, 40, và 100 lần. Vật kính *low-power* còn được gọi là vật kính 10x hay 16mm. Vật kính *high-dry (high-power)* còn được gọi là vật kính 40x hay 4mm. Vật kính dầu còn gọi là vật kính 90x, 100x hay 1.8mm. 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 sinh viên 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, 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. 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 10x và vật kính 43x thì độ phóng đại chung là $10 \times 43 = 430$ lần.

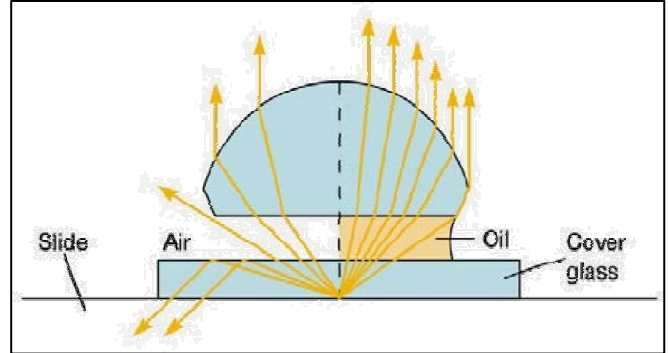


Kính hiển vi quang học nền sáng

- i. Độ dài tiêu cự (*focal length*) của một vật kính tỉ 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.
- j. 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.
- k. 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).
- l. Chỉ những người đã học cách sử dụng mới được dùng kính hiển vi.



Cách cầm để di chuyển kính hiển vi



Ánh sáng truyền qua tiêu bản, dầu soi và vật kính

2. Thực hành trên kính hiển vi với tiêu bản

- a. Sử dụng một số tiêu bản có sẵn hoặc tự làm.
- b. 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.
- c. Đưa 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.
- d. Đưa mắt vào thị kính để quan sát. Nếu sử dụng loại kính đơn tròng (*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 tròng (*binocular scope*), sinh viên hiệu chỉnh hai tròng 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 để quan sát. Hạ bàn chứa mẫu vật xuống từ từ bằng nút sơ cấp cho đến khi thấy những vật thể có màu xuất hiện trong thị trường.
- e. 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 vừa ý. Để quan sát rõ hơn cần phải chuyển sang một độ phóng đại cao hơn.
- f. 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 bàn 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.

- g. 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.
- h. 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.
- i. Sau khi hoàn tất việc quan sát, lấy tiêu bản ra khỏi kính hiển vi (không được để đầu soi kính dính vào vật kính *high-dry*)

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

Vấn đề gặp phải	Cách xử lý
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
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
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 vật kính

TIÊU BẢN GIỌT TREO – QUAN SÁT SỰ DI ĐỘNG CỦA VI KHUẨN

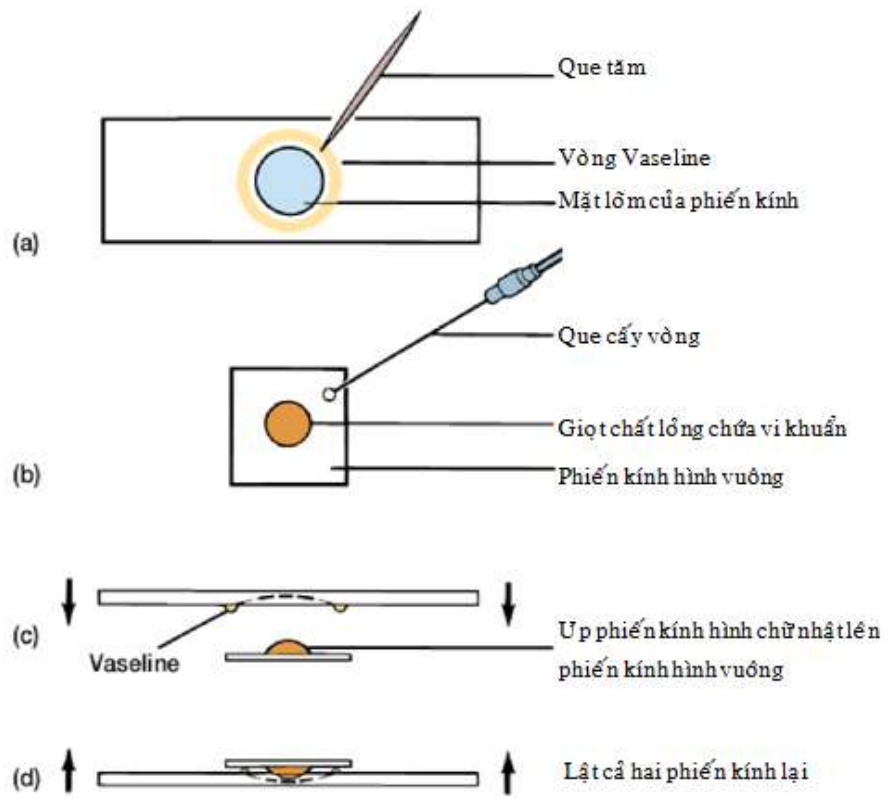
Một số vi khuẩn không di động (*non-motile*) nhưng trong môi trường lỏng chúng thường di chuyển hỗn loạn, gọi là chuyển động Brown (*Brownian movement*). Đây là kết quả chuyển động của các phân tử nước từ đó kéo các vi khuẩn chuyển động theo.

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 (*flagella motion*). Các xoắn khuẩn có các lông mao xung quanh (*axial fibrils*) 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*). Tiêu bản giọt treo cũng dùng để quan sát hình dạng vi khuẩn ở trạng thái sống cũng như sự sắp xếp của các tế bào vi khuẩn khi chúng kết hợp với nhau (xem hình). Một vòng Vaseline xung quanh gờ của chỗ lõm (*coverslip*) sẽ giúp tiêu bản không bị khô.

Tiêu bản giọt treo

- Sử dụng các vi sinh vật sau trong thí nghiệm
 - Saccharomyces cerevisiae*
 - Lactobacillus acidophilus*
 - Acetobacter aceti*
 - Một số chủng khác...
- Dùng que tăm, vẽ một vòng tròn nhỏ bằng Vaseline xung quanh chỗ lõm của phiến kính. Không nên dùng nhiều Vaseline.
- Sau khi lắc thật kỹ dung dịch huyền phù vi sinh vật, dùng que cấy vòng đã vô trùng đặt một giọt dung dịch huyền phù này lên giữa phiến kính hình vuông (*coverslip*).
- Đưa phiến kính hình chữ nhật (*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.
- Lật ngược hai phiến kính lại và đặt lên kính hiển vi để quan sát với vật kính dầu.



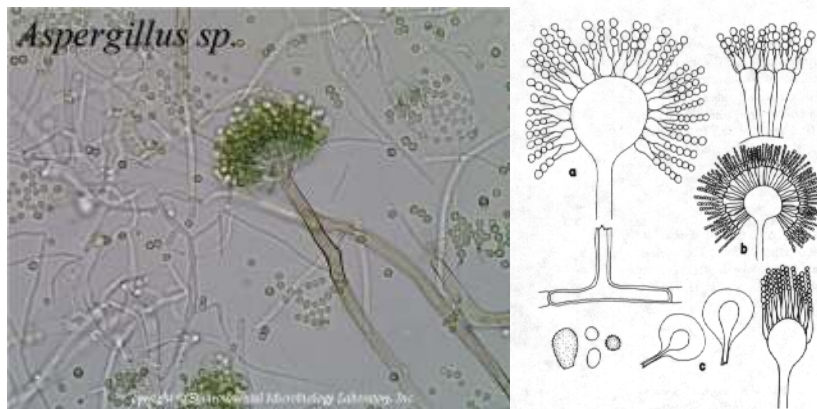
Cách làm tiêu bản giọt treo

QUAN SÁT NẤM SỢI

Nấm sợi (nấm mốc) thường được nhận diện bằng các đặc điểm hình thái đặc trưng quan sát được dưới kính hiển vi. Tế bào nấm thường phát triển thành hệ sợi gọi là khuẩn ty thể. Sợi nấm có thể có hoặc không có vách ngăn. Khuẩn ty mọc lên trên bề mặt cơ chất thường là những cấu trúc mang bào tử. Cuống mang bào tử có thể phân nhánh hoặc không phân nhánh. Bào tử vô tính của nấm sợi thường tập trung trong hai nhóm: bào tử kín và bào tử trần.

Hai giống nấm sợi *Aspergillus* và *Penicillium* thuộc lớp nấm bất toàn *Deuteromycetes*, không có hình thức sinh sản hữu tính. Hệ sợi có vách ngăn. Bào tử vô tính là bào tử trần.

Mucor và *Rhizopus* thuộc nhóm nấm tiếp hợp *Zygomycetes*. Hệ sợi không có vách ngăn và có thể có rễ giả. Bào tử vô tính là bào tử kín. Bào tử hữu tính là bào tử tiếp hợp. *Rhizopus* có cuống mang bào tử và không phân nhánh. *Mucor* có cuống mang bào tử phân nhánh.



Aspergillus sp.



Mucor sp.

Rhizopus sp.

Qui trình

- + Sử dụng các nấm sợi sau trong thí nghiệm: *Mucor*, *Aspergillus*, *Rhizopus*...
- + Quan sát hình thái khuẩn lạc, màu sắc sợi nấm trên hộp petri.
- + Dùng một miếng băng keo trong, đặt mặt có keo dính lên khuẩn lạc nấm mốc. Sau đó lấy ra và áp sát vào phiến kính sao cho băng dính dính chặt vào phiến kính.
- + Quan sát dưới kính hiển vi

TẠO VẾT BÔI VÀ NHUỘM ĐƠN

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.

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*), basic (*cơ bản*) 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 ion âm sẽ kết hợp với các cation (thành phần chính của tế bào) để tạo một dạng muối. Phẩm nhuộm dạng cơ bản có nhiều ion âm 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. Vì vậy 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 cơ bản 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 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 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.

1. Tạo vết bôi và làm tiêu bản nhuộm đơn

Tạo vết bôi vi khuẩn (*bacterial smear*) là làm khô tế bào vi khuẩn trên phiến kính. Các bước thực hiện cơ bản là (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 (xem hình) và sau đó, trải vi khuẩn thành một bề mặt rộng (xem hình). 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).

Tạo vết bôi

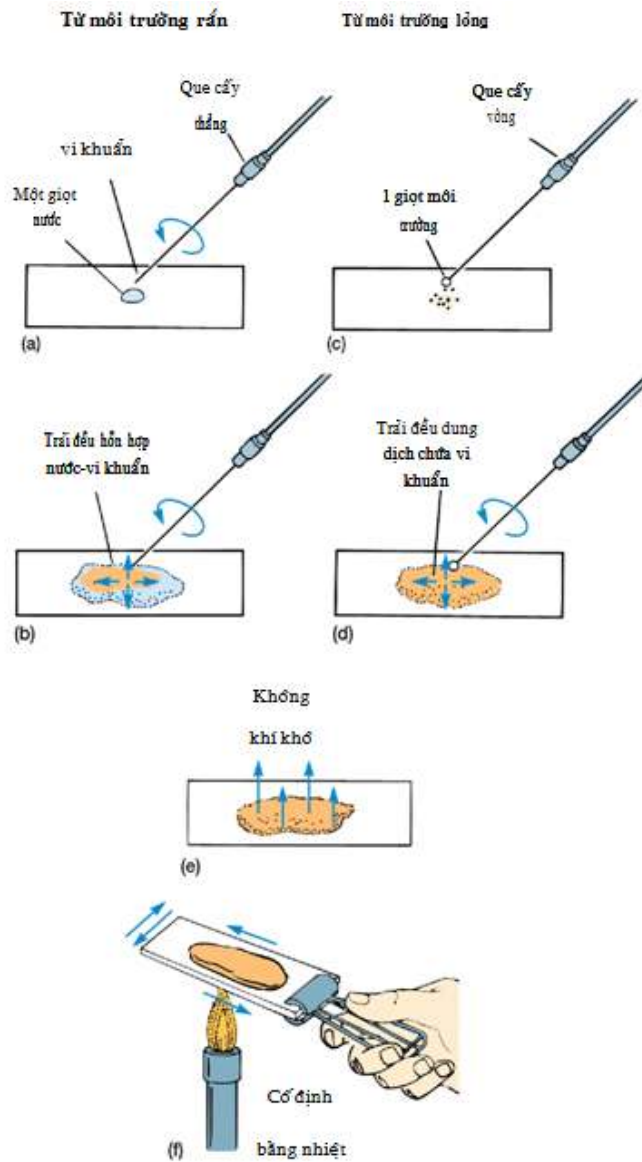
- i. Dùng bút lông (không xóa) khi chú tên vi khuẩn ở một đầu phiến kính. Dùng băng keo trong dán đề lên dòng chữ vừa ghi
- ii. Lắc kỹ dung dịch vi khuẩn. Với thao tác vô trùng chuyên 1 hoặc hai vòng cấy vi khuẩn vào giữa phiến kính. Trải đều trên diện tích khoảng ½ inch. Nếu tạo vết bôi từ môi trường 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 ½ inch.

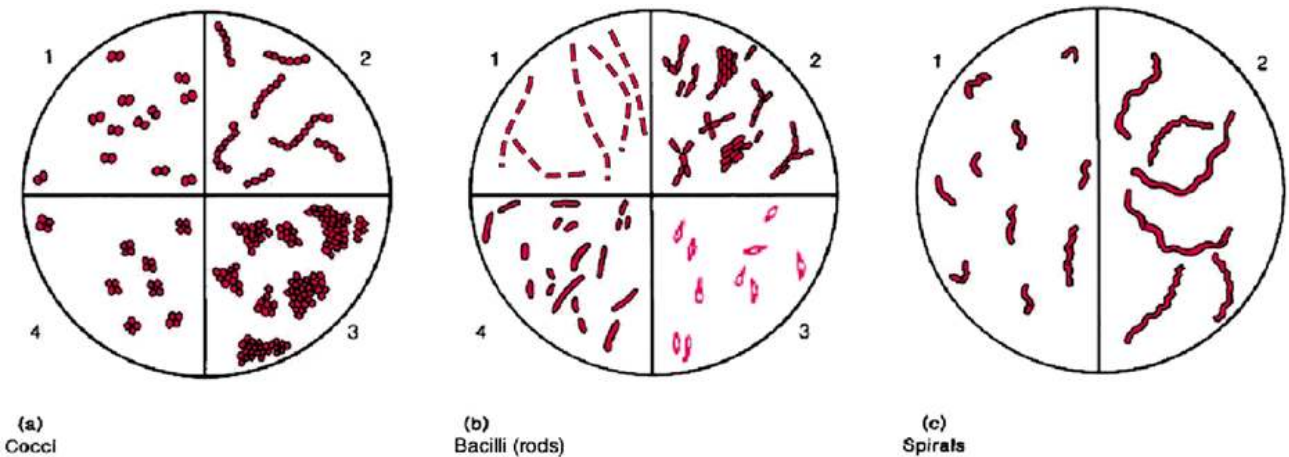
iii. Hơ phiến kính trên ngọn lửa để cố định và giết chết vi khuẩn.

Nhuộm đơn

- i. Đặt phiến kính lên bàn (hay lên giá).
- ii. Nhuộm với phẩm nhuộm (alkaline methylene blue trong 1~1.5 phút, cabolfuchsin trong 5 ~10 giây, hoặc crystal violet trong 20 ~30 giây)
- iii. Rửa trôi thuốc nhuộm bằng nước trong vài giây.
- iv. Thấm khô bằng giấy thấm. Không được chà xát lên vết bôi.
- v. Quan sát bằng kính hiển vi với vật kính dầu
- vi. Có thể sử dụng ba loại phẩm nhuộm khác nhau với cùng một loại vi sinh vật để có sự so sánh.

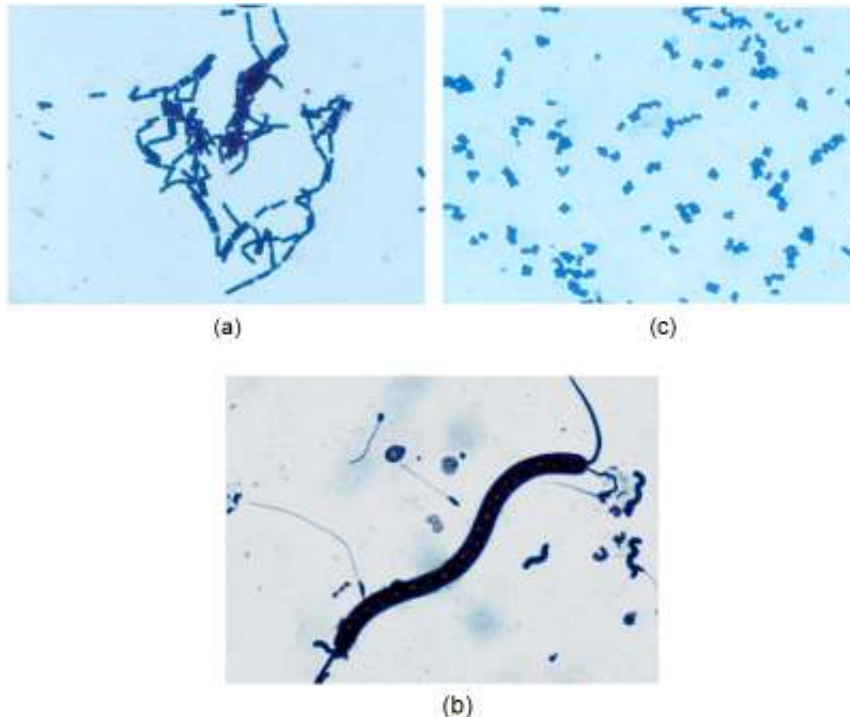


Tạo vết bôi vi sinh vật

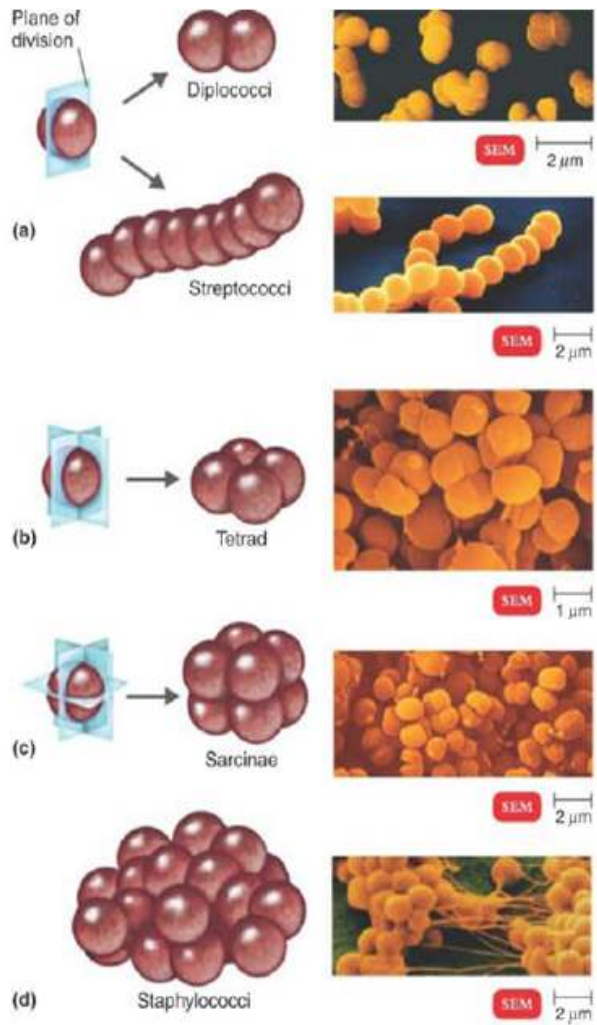


Hình dạng cơ bản và sự sắp xếp của các tế bào vi khuẩn.

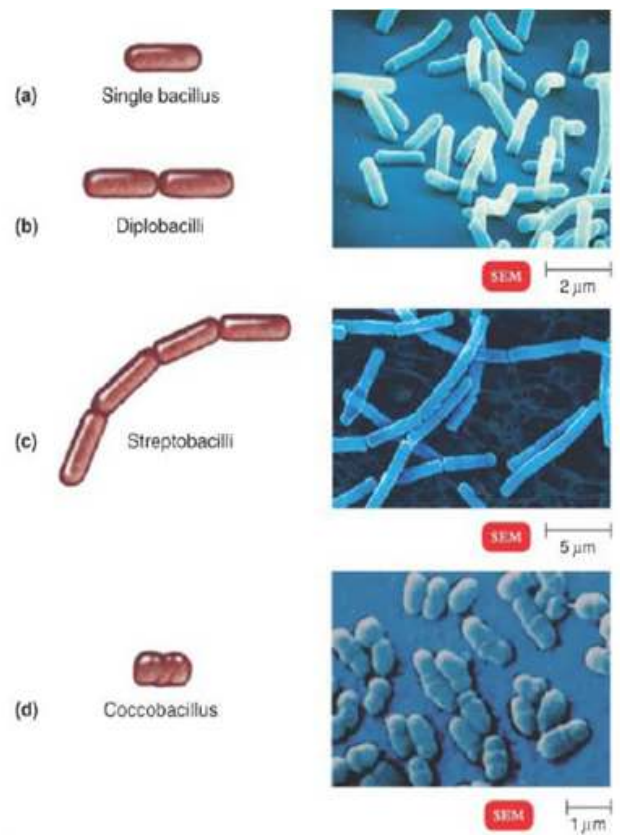
(a) Cocci. 1. Diplococci (cặp); 2. Streptococci (chuỗi); 3. Staphylococci (chùm nhỏ); 4. Tetrads (nhóm 4 tế bào). (b) Bacilli (hình que). 1. Streptobacilli (chuỗi); 2. Palisades; hình V, X và Y; 3. Bacilli tạo bào tử (bào tử nhỏ, tròn, rộng, không bị nhuộm màu, ở giữa hay một đầu của tế bào); 4. Một bacillus đa hình thể (chiều dài và rộng khác nhau). (c) Xoắn khuẩn. 1. Spirilla (hình uốn cong hay xoắn ngắn); 2. Spirochetes (dài, cuộn xoắn chặt hay lỏng lẻo)



Vi khuẩn được nhuộm bằng Crystal Violet. (a) Bacillus subtilis (x1000). (b) Spirillum volutans (x 1000). (c) Micrococcus luteus (x 1000)



Arrangements of cocci. (a) Division in one plane produces diplococci and streptococci. (b) Division in two planes produces tetrads. (c) Division in three planes produces sarcinae, and (d) division in multiple planes produces staphylococci.



Bacilli. (a) Single bacilli. (b) Diplobacilli. In the top micrograph, a few joined pairs of bacilli serve as examples of diplobacilli. (c) Streptobacilli. (d) Coccobacilli.

Một số hình dạng thông thường của vi khuẩn

NHUỘM GRAM

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 2 màu khác nhau, ông ta đã nhận thấy vi khuẩn được chia thành 2 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 carbon 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 của kỹ thuật nhuộm này chưa được hiểu một cách tường tận. Tuy nhiên, người ta vẫn cho rằng đó là do có sự khác biệt về thành phần hóa sinh của thành tế bào vi khuẩn. Thành tế bào vi khuẩn Gram dương thì có nhiều peptidoglycan (phức chất của protein- đường) và các peptidoglycan này được liên kết chặt chẽ với nhau từ đó giúp cho tế bào có thể kháng lại chất tẩy màu. Thành tế bào vi khuẩn Gram âm có thành phần lipid ở nồng độ cao cho nên chúng có thể hòa tan trong chất khử màu (alcohol, acetone,...) và bị rửa trôi cùng với crystal violet.

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 biên bằng cách thay đổi nồng độ phẩm nhuộm, thời gian nhuộm và thành phần của chất tẩy màu. Phương pháp cải biên của Hucker, được sử dụng trong bài thí nghiệm này, hiện nay đang được sử dụng rộng rãi. 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.

Vật liệu và hóa chất

Dung dịch Crystal violet

- + 2 g Crystal violet hòa tan trong 20 ml ethanol 95%
- + 0.8 g Ammol oxalate hòa tan trong 80 ml nước cất
- + Trộn 2 dung dịch trên lại với nhau, giữ 48 giờ rồi lọc. Bảo quản trong lọ sẫm màu, sử dụng trong vài tháng

Dung dịch Iodine

Hòa tan 1 g Iodine trong 3 ~ 5 ml nước cất, thêm 2 g KI. khuấy cho tan hoàn toàn, thêm nước cất cho đủ 300 ml . Bảo quản trong lọ sẫm màu

Dung dịch tẩy màu

+ Ethanol 95% hoặc hỗn hợp gồm 70ml ethanol 95% và 30 ml aceton

Dung dịch Safranin

+ Chuẩn bị sẵn dung dịch Safranin O 2.5%, trước khi dùng pha với nước cất theo tỉ lệ 1:5 (v/v) để có dung dịch 0.5%

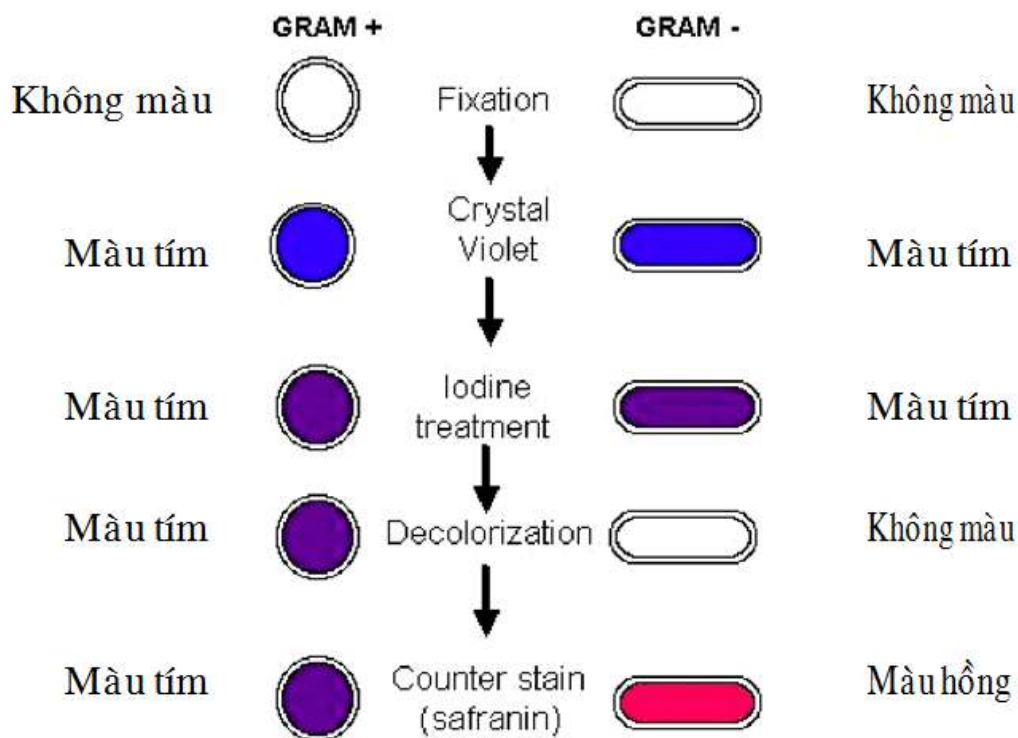
Qui trình

- i. Sử dụng các vi sinh vật sau để thí nghiệm
 - *Acetobacter aceti*
 - *Bacillus subtilis*
 - *Lactobacillus acidiphilus*
- ii. Chuẩn bị vết bôi và cố định vi sinh vật
- iii. Dùng dung dịch crystal violet phủ lên vết bôi. Để yên trong 1 phút
- iv. 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)
- v. Phủ lên vết bôi dung dịch iodine. Để yên 1 phút
- vi. Để nghiêng phiến kính 45°, tẩy màu bằng dung dịch alcohol 95% 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
- vii. Ngay lập tức rửa phiến kính dưới vòi nước
- viii. Phủ lên vết bôi dung dịch Safranin. Để yên 1 phút
- ix. Rửa dưới vòi nước
- x. Thấm nhẹ bằng giấy thấm. Hơ khô phiến kính trước khi quan sát dưới kính hiển vi
- xi. Sử dụng dầu soi kính và vật kính dầu để quan sát

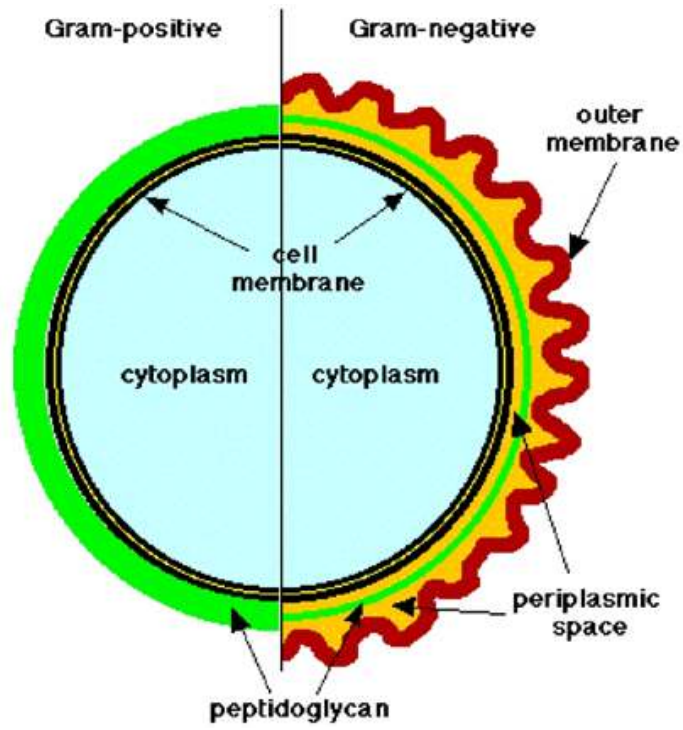
Lưu ý:

- 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 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 không.
- 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) hơi nóng quá mức khi cố định vi sinh vật trên phiến kính. Hơi 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
- Vi khuẩn Gram (+) bắt màu tím, Gram (-) bắt màu hồng



Sự bắt màu của tế bào vi khuẩn khi nhuộm Gram



Cấu tạo thành tế bào vi khuẩn Gram (+) và Gram (-)

NHUỘM BÀO TỬ

Một số vi khuẩn (*Clostridium botulinum*, *Bacillus subtilis*...) có khả năng tạo bào tử (spore, endospore). Bào tử là một thể nghỉ có dạng hình cầu hay hình bầu dục hình thành bên trong tế bào vào cuối thời kỳ sinh trưởng phát triển. Vì mỗi tế bào chỉ sinh ra một bào tử nên đây không phải là loại bào tử có chức năng sinh sản như ở nấm sợi. Bào tử tạo thành do môi trường không thích hợp cho sự sinh trưởng và phát triển, do thiếu chất dinh dưỡng, do độ ẩm thấp... Khi môi trường trở nên thích hợp thì bào tử lại hồi sinh và tế bào lại có thể tiếp tục phân chia.

Bào tử có tính kháng nhiệt, kháng bức xạ, kháng hóa chất, kháng áp suất thẩm thấu. Bào tử có thể tồn tại trong môi trường thiếu chất dinh dưỡng, nhiệt độ cao, hóa chất mà các tế bào sinh dưỡng không thể tồn tại được.

Trong thời kỳ nghỉ không thấy bào tử vi khuẩn thể hiện bất kỳ sự trao đổi chất nào, đó là trạng thái sống ẩn (cryptobiosis). Chỉ có một số chi vi khuẩn có khả năng sinh bào tử: *Bacillus*, *Clostridium*, *Sporosarcina* (G+), *Deusulfotomaculum* (G-)...

Bào tử rất khó nhuộm bởi đa số các thuốc nhuộm do màng bào tử dày, chắc, khó bắt màu và chứa nhiều lipid. Vì thế, cần thiết phải có những phương pháp nhuộm đặc biệt đối với bào tử. Với bất kỳ phương pháp nào, tế bào phải được xử lý nhiệt – acid để tế bào chất của bào tử dễ bắt màu. Sau đó nhuộm tế bào chất của bào tử và tế bào với thuốc nhuộm có hoạt tính mạnh rồi tẩy màu của tế bào chất đi và nhuộm nó với một thuốc nhuộm phân biệt khác. Khi đó, tế bào chất sẽ mang một màu, bào tử sẽ mang một màu khác. Đôi khi bào tử được nhìn thấy bên trong tế bào. Hình thái của nó trong tế bào và kích thước bề ngang của tế bào mang nó. Bào tử thường nằm trong tế bào sinh dưỡng theo ba vị trí:

- + Nằm ở tâm tế bào: gọi là bào tử kiểu *Bacillus*
- + Nằm lệch tâm: gọi là bào tử kiểu *Clostridium*
- + Nếu nằm ở cực tế bào: gọi là bào tử kiểu *Plectidium*
- + Các bào tử có thể tồn tại tự do do bởi tế bào xung quanh nó đã tan rã.

1. Nhuộm bằng phương pháp Carbollic Fuchsin

Hóa chất

Dung dịch A

- + 10 ml dung dịch Fuchsin kiềm bão hòa trong ethanol (khoảng 10%)
- + 100 ml dung dịch acid carbollic (phenol 5% trong nước)
- + Trộn đều với nhau (chuẩn bị trước khi dùng)

Dung dịch B

- + 100 ml Ethanol 95%

+ 3 ml HCl đậm đặc

Dung dịch C

+ 30 ml Metylen blue bão hòa trong ethanol (khoảng 2%)

+ 100 ml dung dịch KOH 0.01% trong nước

+ Trộn đều với nhau, để càng lâu càng tốt

Qui trình nhuộm bào tử

- i. Làm vết bôi trên phiến kính
- ii. Nhỏ dung dịch A lên vết bôi, hơi nhẹ bên dưới phiến kính để làm bay hơi, tránh để sôi. Thêm dần dần thuốc nhuộm để không bị khô cạn, giữ trong 5 phút. Đợi nguội, đổ thuốc nhuộm đi.
- iii. Dùng dung dịch B rửa lại cho đến khi thấy vừa hết màu đỏ, rửa nước.
- iv. Nhuộm lại bằng dung dịch C trong 2 ~ 3 phút, rửa nước, thấm khô.
- v. Soi kính: dùng vật kính dầu x100. Bào tử bắt màu đỏ, tế bào bắt màu xanh.

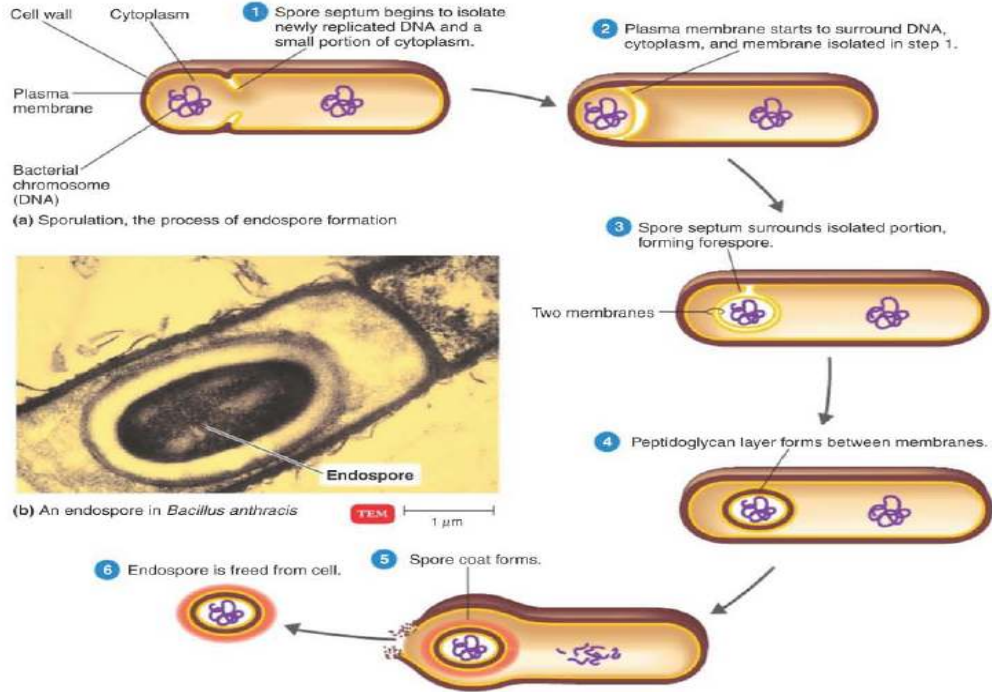
2. Nhuộm bằng phương pháp Malachite green (phương pháp Schaeffer-Fulton hoặc phương pháp Wirtz-Conklin)

Hoá chất

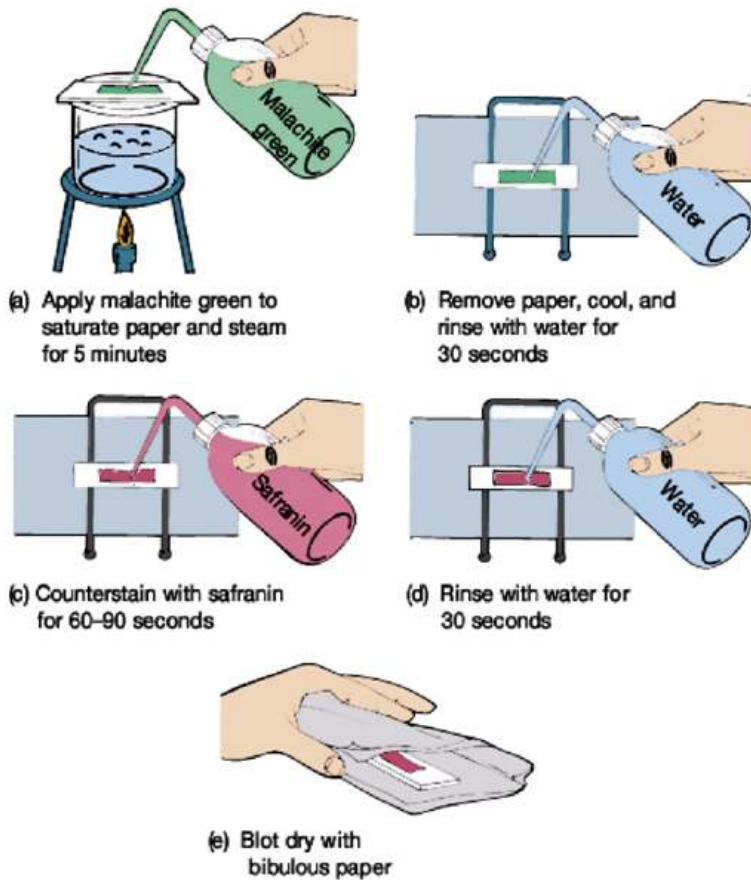
- Dung dịch Malachite green bão hòa (khoảng 7.6%)
- Dung dịch Safranin 0.5%

Qui trình nhuộm

- i. Làm vết bôi và cố định tế bào bằng nhiệt
- ii. Đặt phiến kính lên trên cốc nước sôi. Phiến kính được đậy bằng một tờ giấy thấm có cùng kích thước
- iii. Tắm ướt tờ giấy thấm bằng dung dịch Malachite green. Để yên 5~6 phút. Dùng để tờ giấy thấm bị khô
- iv. Bóc tờ giấy thấm ra, để cho phiến kính nguội hoàn toàn. Rửa phiến kính bằng nước trong 30 giây
- v. Nhuộm với Safranin trong 90 giây
- vi. Rửa phiến kính bằng nước trong 30 giây



Bào tử và sự hình thành nội bào tử ở vi khuẩn



Quy trình nhuộm bào tử theo phương pháp Schaeffer-Fulton

NHUỘM VỎ NHẦY

Một số vi khuẩn có lớp nhầy bao xung quanh gọi là vỏ nhầy. Lớp nhầy này mỏng và khác nhau tùy theo loài vi khuẩn. Vỏ nhầy có thành phần hóa học là các polysaccharide, polypeptide, glycoprotein. Chúng vi khuẩn gây bệnh có lớp vỏ nhầy mỏng sẽ có khả năng gây nguy hiểm hơn chúng không có vỏ nhầy do chúng giúp vi khuẩn chống lại khả năng thực bào của tế bào cơ thể chủ. Ta không thể xác định chính xác vỏ nhầy nếu sử dụng phương pháp nhuộm đơn. Sẽ có sự xuất hiện một vùng xung quanh tế bào vi khuẩn do sự phân tách của tế bào vi khuẩn với vùng thuốc nhuộm xung quanh gây ra bởi quá trình sấy khô. Hiện nay có hai phương pháp nhuộm vỏ nhầy đó là phương pháp: **(1)** Anthony (E. E. Anthony, Jr., một nhà vi khuẩn học ở đại học Texas, Austin, vào những năm 1930); **(2)** phương pháp Graham và Evans (Florence L. Evans, một nhà vi khuẩn học tại đại học Illinois và những năm 1930).

Qui trình của Anthony sử dụng 2 loại thuốc nhuộm. Thuốc nhuộm đầu tiên là Crystal violet. Thuốc nhuộm này sẽ làm vi khuẩn và vỏ nhầy bắt màu đỏ tím. Không giống như tế bào, vỏ nhầy không mang ion nên thuốc nhuộm không bám chặt vào. Đồng sulfate là chất tẩy màu, nó sẽ rửa trôi thuốc nhuộm ra khỏi vỏ nhầy. Đồng sulfate đóng vai trò của một chất chống lại thuốc nhuộm do gắn chặt vào trong vỏ nhầy và làm vỏ nhầy có màu xanh nhạt hoặc hồng nhạt. Với qui trình này, không được cố định vết bôi bằng nhiệt do sẽ làm tế bào co lại và làm xuất hiện vùng không bắt màu xung quanh vi khuẩn làm ngộ nhận đó là vỏ nhầy.

Hoá chất

- Dung dịch đỏ Congo (Congo red) 2% trong nước
- Dung dịch gelatin 0.01 ~ 0.1% trong nước
- Dung dịch HCl 1%
- Hỗn hợp: 30 ml Methylene blue bão hòa (khoảng 2%) trộn với 100 ml dung dịch KOH 0.01%
- Dung dịch 20% (w/v) $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$
- Dung dịch Gram's Crystal violet (1% trong nước)

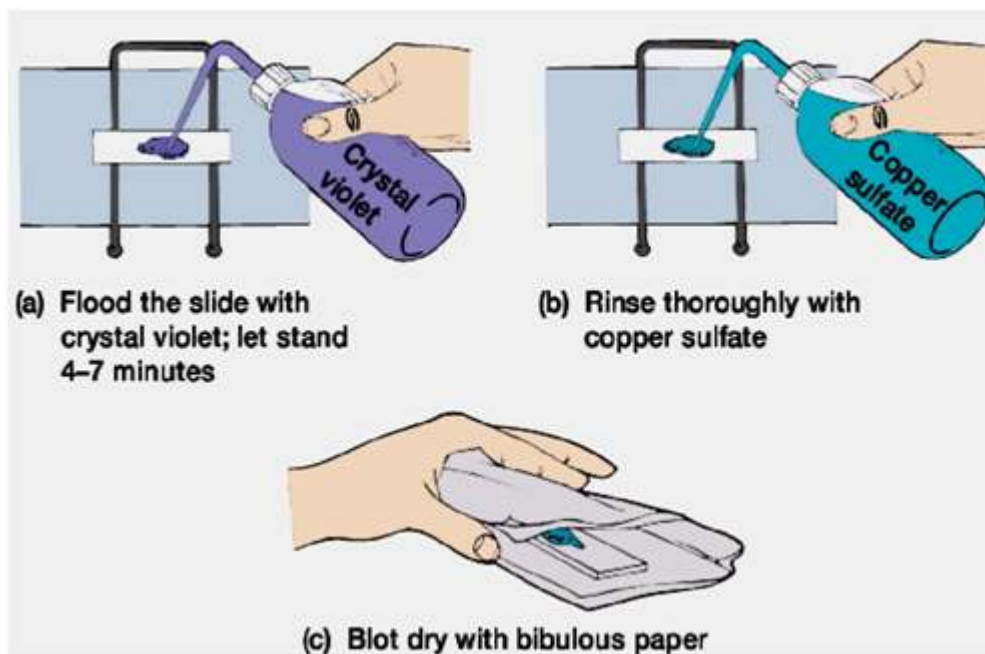
1. Qui trình nhuộm vỏ nhầy bằng phương pháp đỏ Congo

- i. Nhỏ 1 giọt dung dịch Congo red và 1 giọt dung dịch gelatin lên phiến kính sạch.
- ii. Lấy vi khuẩn trộn đều với 2 giọt nói trên để làm vết bôi, để khô trong không khí
- iii. Nhỏ dung dịch HCl lên để rửa, phiến kính có màu xanh.
- iv. Rửa bằng nước để loại bỏ dung dịch HCl.

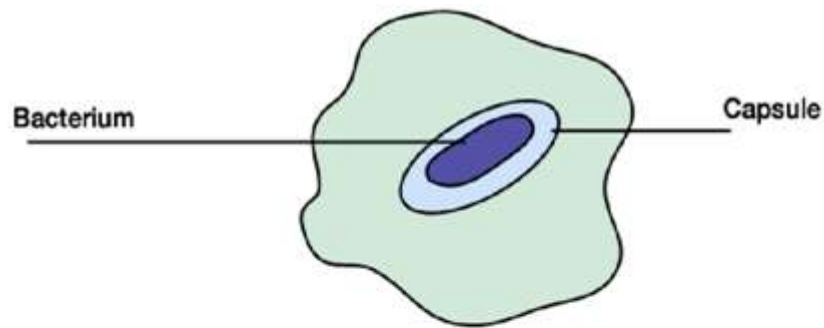
- v. Nhuộm lại bằng Metylen blue trong 1 phút, rửa nước, hong khô.
- vi. Soi kính: dùng vật kính dầu x100.
- vii. Kết quả: nền môi trường màu xanh, tế bào màu đỏ, vỏ nhầy không màu.

2. Quy trình nhuộm vỏ nhầy bằng phương pháp của Anthony

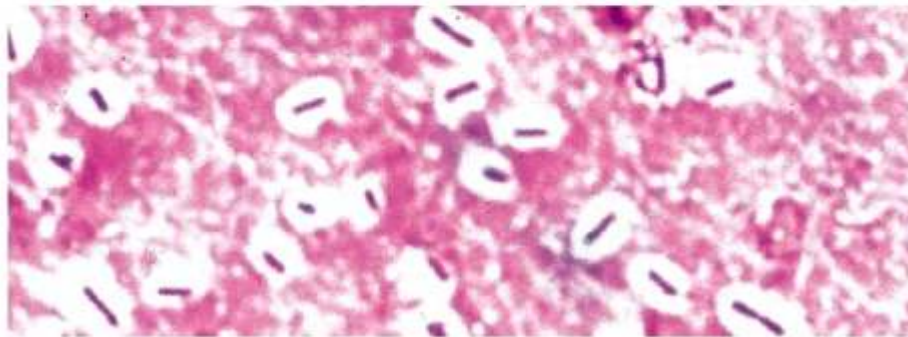
- i. Tạo vết bôi. Làm khô bằng khí nóng hoặc để khô tự nhiên. Không được cố định bằng nhiệt
- ii. Phủ Crystal violet lên vết bôi từ 4~7 phút
- iii. Rửa lại thật kỹ bằng dung dịch 20% $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$
- iv. Thấm khô bằng giấy thấm
- v. Quan sát bằng vật kính x 100. Vỏ nhầy xuất hiện dưới dạng một quần sáng yếu xung quanh tế bào sậm màu



Quy trình nhuộm vỏ nhầy theo phương pháp của Anthony



(a)



(b)

Phương pháp nhuộm vỏ nhầy của Anthony; (a) hình vẽ một tế bào vi khuẩn, vỏ nhầy với nền môi trường xung quanh; (b) vỏ nhầy của Klebsiella pneumoniae, sử dụng kính hiển vi quang học nền sáng (x1000), vỏ nhầy xuất hiện dưới dạng quầng sáng trắng xung quanh tế bào bắt màu đỏ

3. Quy trình nhuộm vỏ nhầy (vỏ nhầy) bằng phương pháp đổ của Graham và Evans

- i. Trộn vi khuẩn với 2 giọt mực tàu tại một đầu phiến kính
- ii. Dùng phiến kính thứ 2 tạo một vệt kéo về đầu còn lại của phiến kính thứ nhất
- iii. Làm khô phiến kính bằng khí nóng hoặc để khô tự nhiên
- iv. Rửa nhẹ bằng nước (ít nước), không dùng nhiều nước để rửa
- v. Nhuộm bằng Gram's Crystal violet trong 1 phút
- vi. Rửa lại bằng nước
- vii. Nhuộm bằng Safranin trong 90 giây
- viii. Rửa lại bằng nước và thấm khô
- ix. Nếu có vỏ nhầy, vi khuẩn sẽ có màu đỏ hồng được bao xung quanh bởi một vùng không màu. Nên có màu đen

MỘT SỐ MÔI TRƯỜNG THÔNG DỤNG

- **M1** (môi trường giá đậu đường)

Cân 100g giá đậu (đã rửa sạch), thêm 1000ml nước. Đun sôi 30 phút. Lấy phần dịch trong. Thêm nước cho đủ 1000ml. bổ sung thêm glucose với hàm lượng 5% (w/v)

- **M2** (môi trường khoai tây đường cám): 1000ml

Khoai tây cắt nhỏ, rửa sạch, cân lấy 300g. Thêm 500ml nước, đun sôi 30 phút. Lọc lấy nước trong. Cân 100g cám, thêm 500ml nước, đun sôi 30 phút. Lọc lấy nước trong.

Trộn

2 loại dịch lọc trên và thêm sucrose 5% (w/v). Bổ sung nước cho đủ 1000ml.

Khoai tây	30%	Cám	10%
Sucrose	5%	Nước đủ	1000ml

- **M3** (môi trường Sabouraud): 1000ml

Pepton	1%	Glucose	4%
Agar	2%	Nước đủ	1000ml

pH 5.6 – 6.0

- **M4** (môi trường Hansen)

Glucose	5%	Pepton	1%
K ₂ HPO ₄	0.3%	MgSO ₄ .7H ₂ O	0.2%

Agar 2% Nước đủ 1000ml

- **M5** (môi trường Potato Dextrose Agar)

Để chuẩn bị chất chiết khoai tây, đun sôi 200g khoai tây xắt lát, không gọt vỏ với 1000ml nước trong 30 phút. Lọc qua vải thưa, giữ lại phần dịch, đó là chất chiết khoai tây.

Trộn với các thành phần khác rồi đun sôi để hoà tan (đối với môi trường Potato dextrose

salt: chuẩn bị như môi trường M5 rồi thêm: 7.5% NaCl)

Chất chiết khoai tây 20% (v/v)	Dextrose	2%	
Agar	2%	Nước đủ	1000ml

- **M6** (môi trường thạch malt)

Lấy 250g malt, nghiền nhỏ, hoà vào 1000ml nước cất. Dùng đũa thủy tinh khuấy đều và gia nhiệt từ từ, đến 45 – 50°C, giữ ở nhiệt độ này trong 30 phút. Sau đó nâng nhiệt độ lên 65 – 68°C, có khuấy, cho đến khi quá trình đường hóa xảy ra hoàn toàn (không thấy màu xanh xuất hiện khi thử dịch cháo với dung dịch Lugol). Lọc tách bã qua vải thô (hay bông gòn thấm nước), đem hấp phần dịch 121°C / 30 phút, lấy ra để

lắng. Lọc bỏ kết tủa, pha loãng để đạt 6 – 8° Brix, thêm 2% agar, đun và khuấy đều cho đến khi thạch tan hết. Cho môi trường thạch vào các dụng cụ chứa, hấp tiệt trùng 121°C / 15 phút.

- **M7** (môi trường BGBL 2% Broth – dạng pha sẵn)

Peptic digest of animal tissue	1%
Lactose	1%
Oxygall	2%
Brilliant green	0.0133g/L

Dùng 40g hỗn hợp pha sẵn để pha thành 1000ml môi trường.

- **M8** (môi trường Plate Count Agar – ATCC medium 1048): 1000ml

Agar	150 g
Yeast extract	2.5 g
Trypton	5 g
Glucose	1.0g

- **M9** (môi trường LST - Lauryl Sufate Broth/Lauryl Trypton Broth): 1000ml

Trypton	20 g
Lactose	5 g
NaCl	5 g
K ₂ HPO ₄	2.75 g
KH ₂ PO ₄	2.75 g
Sodium lauryl sufate	0.1 g

pH 6.8 ± 0.2 Nước Đủ 1000ml

- **M10** (Môi trường VRBL- Crystal Violet neutral Red Bile Lactose agar):

Pepton	7g	Neutral Red	0,03g
Yeast Extract	3g	Crystal Violet	0,002g
Lactose	10g	Agar	15g
NaCl	5g	Nước đến	1000 ml
Muối mật	1,5g		

Hòa tan các thành phần trên trong nước, để yên vài phút, đặt lên bếp đun sôi và khuấy đều, để sôi 2-5 phút. Làm nguội đến 45°C để sử dụng.

Chú ý:

- Không để sôi quá lâu
- Không được tiệt trùng môi trường
- Pha chế xong sử dụng ngay trong vòng 3 giờ