

BÀI 1: CHUẨN BỊ DỤNG CỤ - PHA CHẾ MÔI TRƯỜNG NUÔI CẤY VI SINH VẬT

I. MỤC ĐÍCH YÊU CẦU

- Biết cách bao gói, làm nút bông, khử trùng dụng cụ bằng nồi hấp khử trùng ở áp suất cao và bằng tủ sấy.
- Nắm vững yêu cầu, nguyên tắc, các bước thực hiện pha chế và khử trùng môi trường nuôi cấy vi sinh vật.

II. VẬT LIỆU

- Ống nghiệm, bình tam giác, pipet, đĩa petri ... sạch để bao gói.
- Ống nghiệm, bình tam giác, đĩa petri để pha môi trường
- Gòn không thấm, giấy báo, thun...
- Cân các loại
- Máy đo pH hoặc giấy đo pH
- Cốc thủy tinh, đũa khuấy, phễu thủy tinh, muỗng cân hóa chất, giấy lọc
- Bếp điện, nồi đun
- Dao, kéo, giá ống nghiệm
- Agar, khoai tây, nước cất
- Xilen
- Giấy lau kính hiển vi
- Các loại hóa chất cần cho pha chế môi trường dinh dưỡng

III. CHUẨN BỊ DỤNG CỤ

1. Bao gói dụng cụ

1.1 Nguyên tắc

- Dụng cụ được bao gói để nuôi cấy vi sinh vật phải đạt độ trung tính, phải thật sạch và khô, không bị nứt mẻ.
- Việc bao gói phải thật kín và cẩn thận để dụng cụ sau khi khử trùng vẫn đảm bảo vô trùng trong lớp giấy gói và lấy ra sử dụng dễ dàng.

1.2 Phương pháp bao gói dụng cụ

Việc bao gói dụng cụ gồm hai khâu:

- Làm nút bông: đối với ống nghiệm, bình tam giác, pipet...
- Bao gói: cho hầu hết các dụng cụ thủy tinh.

1.3 Cách làm nút bông

Dùng một miếng gòn không thấm nước cuộn lại, nhét vào miệng ống nghiệm sao cho vừa đủ chặt.

Yêu cầu:

- Nút gòn có kích thước và độ chặt vừa phải
- Đầu nút phải tròn, gọn, phần ngoài lớn hơn phần trong ống nghiệm
- Lấy nút ra hay đóng vào dễ dàng.

Cách làm nút gòn này cũng được áp dụng cho các chai lọ, bình cầu, bình tam giác... cách làm cũng tương tự như đối với ống nghiệm. Nhưng lượng gòn sử dụng phải nhiều hơn và có thể được bọc bằng một lớp vải gạc.

1.4 Cách bao gói dụng cụ

Với các dụng cụ sau khi làm nút bông, cần được bao gói phần có nút bông bằng giấy dầu hay giấy báo để khi hấp khử trùng nút bông không bị ướt và đảm bảo điều kiện vô trùng tốt hơn. Cách làm như sau:

- Cắt các mảnh giấy hình chữ nhật với kích thước tùy theo dụng cụ cần bao gói.
- Quấn giấy quanh phần đầu của nút bông.
- Gập ống giấy sát vào nút bông ở mặt trước và hai bên.
- Gập nốt phần giấy còn lại và cài sâu vào bên trong.

Yêu cầu:

- + Phần giấy bao ngoài phải chặt và kín.
- + Bao bằng giấy dầu với dụng cụ hấp ướt.
- + Bao bằng giấy báo với dụng cụ sấy khô khi khử trùng

Với các dụng cụ như pipet, đĩa petri, que gạt phải dùng giấy bao kín toàn bộ. Có thể thay giấy báo bằng 1 hộp nhôm kín đậy tất cả các dụng cụ trên để khử trùng.

2. Phương pháp khử trùng dụng cụ

Có thể khử trùng bằng một số tác nhân lý hóa như nhiệt độ, bức xạ, lọc và hóa chất. Tác nhân khử trùng được chọn tùy mục đích và vật liệu cần khử trùng.

- Các dụng cụ thủy tinh bền với nhiệt nên thường được khử trùng bằng phương pháp nhiệt khô trong tủ sấy. Các thanh gạt thủy tinh được khử trùng bằng cách đốt với cồn 70°C và các que cấy kim loại được khử trùng bằng cách đốt trực tiếp trên ngọn lửa.

- Trường hợp cần khử trùng môi trường nuôi cấy vi sinh vật, phương pháp nhiệt ẩm bằng nồi hấp áp lực (autoclave, 1atm, 121°C) thường được sử dụng để các thành

phần hữu cơ của môi trường không bị cháy, biến tính và môi trường không bị mất nước

- Trường hợp môi trường chứa các chất phân tử lượng nhỏ không bền với nhiệt như vitamin, amino acid, hoặc huyết thanh chứa các protein là nhân tố tăng trưởng, phương pháp nhiệt ẩm có thể làm biến tính các thành phần này nên thường được khử trùng riêng bằng phương pháp lọc qua màng.

2.1 Khử trùng dụng cụ, môi trường bằng nồi hấp áp lực

Phương pháp này thực hiện trong nồi hấp vô trùng ở áp suất cao. Là thiết bị làm bằng kim loại, chịu được nhiệt độ và áp suất cao, có khả năng tự động điều chỉnh áp suất và thời gian khử trùng theo yêu cầu của người sử dụng.

- Nguyên tắc hoạt động

Làm gia tăng nhiệt độ bằng hơi nước bão hòa dưới một áp suất lớn hơn áp suất bình thường của khí quyển. Khi áp suất hơi nước tăng lên thì nhiệt độ cũng tăng theo nhờ hệ thống van rất chặt chẽ.

Mối quan hệ giữa áp suất ghi trên áp kế với nhiệt độ trong nồi biểu hiện qua bảng sau đây:

Áp suất (atm)	Nhiệt độ ($^{\circ}\text{C}$)
0	100
0,5	112
1,0	121
1,5	128
2,0	134

Phương pháp khử trùng bằng nhiệt ẩm cho phép diệt cả tế bào dinh dưỡng lẫn bào tử của vi sinh vật.

- Trình tự các bước sử dụng nồi hấp áp lực như sau

- + Bổ sung nước ở đáy nồi đến vạch quy định
- + Xếp dụng cụ và vật liệu cần khử trùng vào giá đặt bên trong nồi hấp, không nên xếp quá chặt để hơi nước lưu thông dễ dàng
- + Đậy kín nắp nồi hấp. Trường hợp nắp có nhiều ốc vặn, cần vặn ốc theo từng cặp đối xứng nhau.
- + Mở van thông hơi giữa 2 nồi (trường hợp nồi hấp 2 lớp)
- + Bật công tắc, đun nồi hấp.
- + Khi nhiệt độ lên đến 80°C hoặc 0,5 atm, mở từ từ van xả để đuổi hết không khí ra khỏi nồi trong vòng 3 – 5 phút cho đến khi luồng hơi nước thoát ra liên tục, đóng van lại.

- + Khi áp suất lên đến mức cần thiết thì bắt đầu tính thời gian khử trùng.
- + Khi đủ thời gian khử trùng, tắt điện, chờ nhiệt độ và áp suất hạ xuống giá trị 0 mới được mở nắp để tránh gây ra tai nạn hoặc tránh áp suất thay đổi đột ngột làm hư môi trường.

Một số nồi hấp hiện đại có thể tự kiểm soát thời gian, áp suất và tự đuổi khí ra khỏi nồi, cho phép bỏ qua một số thao tác tương ứng ở phần trên.

Chú ý: để đảm bảo an toàn và hiệu quả của việc hấp khử trùng, ngoài việc thận trọng thực hiện đúng qui trình đã chỉ dẫn, người làm thí nghiệm cần phải

- + Kiểm tra mực nước và bổ sung lượng nước cần thiết trước khi sử dụng.
- + Với nắp nồi có nhiều ốc vặn, cần phải xiết ốc theo từng cặp đối xứng để đảm bảo độ kín, tránh làm nắp nồi bị chênh hoặc hư vòng đệm cao su.
- + Tuyệt đối không mở nắp nồi khi kim chỉ nhiệt độ và áp suất chưa trở về 0.
- + Trực tiếp theo dõi quá trình hấp khử trùng cho đến khi kết thúc và ngắt điện.

Các bình tam giác, chai lọ, ống nghiệm chứa môi trường trước khi được khử trùng bằng phương pháp nhiệt ẩm cần được đậy chặt nhưng đảm bảo cho phép không khí và hơi nước thông qua.

Thông thường, các hộp petri hoặc nút bông còn được bao gói bằng giấy hoặc giấy nhôm để tránh nguy cơ bị nhiễm sau khi khử trùng. Sau khi hấp các hộp petri cần được sấy khô trước khi dùng.

2.2 Khử trùng dụng cụ thủy tinh bằng phương pháp nhiệt khô

Các hộp petri, ống hút thủy tinh bền với nhiệt có thể được khử trùng bằng phương pháp sấy ở 170°C trong 2 giờ trong tủ sấy. Trong trường hợp này, các ống hút cần được nhét nút bông không thấm nước ở đầu hút. Hộp petri, ống hút, các dụng cụ cần khử trùng khác được gói kín bằng giấy hoặc giấy nhôm trước khi sấy.

IV. PHA CHẾ MÔI TRƯỜNG

1. Khái niệm chung

Môi trường dinh dưỡng là hỗn hợp gồm các chất dinh dưỡng và các chất có nhiệm vụ duy trì thế oxy hóa khử, áp suất thẩm thấu của tế bào và sự ổn định pH của môi trường.

2. Các yêu cầu cơ bản của môi trường dinh dưỡng

Bất kỳ một môi trường dinh dưỡng nào để nuôi cấy vi sinh vật cũng cần đạt được các yêu cầu cơ bản sau đây:

- Có đủ chất dinh dưỡng cần thiết
- Có độ pH thích hợp
- Có độ nhớt nhất định

- Hoàn toàn vô khuẩn
- Không chứa các yếu tố độc hại

3. Phương pháp làm môi trường

3.1 Nguyên tắc

Khi điều chế môi trường, ta dựa trên các nguyên tắc sau đây:

- Dựa trên cơ sở nhu cầu về các chất dinh dưỡng và khả năng đồng hóa các chất dinh dưỡng của từng loại vi sinh vật.
- Đảm bảo sự cân bằng về áp suất thẩm thấu giữa môi trường và tế bào vi sinh vật nên cần điều chỉnh tỷ lệ và nồng độ các chất trong thành phần môi trường.
- Đảm bảo các điều kiện hóa lý cần thiết cho các hoạt động trao đổi chất của vi sinh vật.

3.2 Các bước làm môi trường dinh dưỡng

a. Pha chế

Cân, đong chính xác từng thành phần của môi trường và pha chế đúng theo trình tự đã hướng dẫn.

- + Với môi trường lỏng: các chất cân đong xong cho hòa tan vào nước
- + Với môi trường đặc: là môi trường lỏng có bổ sung thêm agar (1,5 – 2,5%). Cân hóa chất cho hòa tan vào nước, bổ sung lượng nước đủ theo công thức. Cho agar vào, đun sôi và khuấy đều cho đến khi agar vừa tan.

b. Làm trong môi trường

Môi trường nuôi cấy vi sinh vật – nhất là môi trường lỏng cần phải hoàn toàn trong để dễ quan sát sự phát triển của chúng. Có thể làm trong môi trường bằng những phương pháp sau:

- + Với môi trường lỏng: người ta lọc qua vải màn nhiều lớp, qua bông thấm nước hoặc qua giấy lọc.
- + Với môi trường đặc thường lọc qua vải màn 2 lớp hoặc giấy lọc trong điều kiện có phễu lọc nóng.

c. Điều chỉnh pH của môi trường

Độ pH của môi trường tùy theo đối tượng vi sinh vật nuôi cấy và tùy theo yêu cầu khảo cứu. Vì vậy khi làm môi trường cần điều chỉnh pH cho thích hợp.

Muốn điều chỉnh pH của môi trường, người ta dùng HCl, NaOH 0,1N hoặc nồng độ 10%. Cũng có thể dùng các chất khác như H₃PO₄, H₂PO₄, H₂SO₄, KOH....

Để kiểm tra pH của môi trường tốt nhất là dùng máy đo pH. Phương pháp này nhanh nhạy và độ chính xác cao. Trong phòng thí nghiệm, người ta thường dùng chỉ thị màu xanh bromotinol (ở pH = 7,3 chỉ thị màu xanh có màu lam lục. Ở pH ≤ 6 có màu vàng, ở pH ≥ 7,6 có màu lam lục) hay giấy quỳ để đo pH. Phương pháp này tiện lợi, nhanh nhưng độ chính xác không cao.

d. Phân phối môi trường vào dụng cụ

Người ta thường phân phối môi trường vào ống nghiệm, đĩa petri, bình tam giác. Nếu là môi trường đặc, cần phải đun cho agar vừa tan rồi mới phân phối vào dụng cụ. Khi phân phối môi trường vào các dụng cụ thì cần phải chú ý:

- + Đối với ống nghiệm: nếu dùng làm môi trường thạch nghiêng thì lượng môi trường cần được phân phối chiếm ¼ thể tích ống nghiệm.
- + Nếu dùng làm thạch đứng thì lượng môi trường là 1/2 - 1/3 thể tích ống nghiệm.
- + Đối với bình cầu hay bình tam giác, lượng môi trường được phân phối chiếm 1/2 - 2/3 thể tích của bình.
- + Các thao tác phải nhanh, gọn, khéo léo để môi trường không dính lên miệng dụng cụ hoặc nút bông và việc phân phối cần thực hiện xong trước khi môi trường bị đông đặc.

e. Khử trùng môi trường

Tùy theo tính chất và điều kiện cụ thể của từng loại môi trường mà chế độ và phương pháp khử trùng khác nhau như sau:

- + Phương pháp Pasteur
- + Phương pháp Tyndal.
- + Phương pháp lọc bằng dụng cụ lọc vô khuẩn.
- + Phương pháp hấp bằng hơi nước bão hòa ở áp suất cao

f. Phương pháp làm môi trường đặc

- Làm thạch nghiêng

Sau khi khử trùng xong, ta lấy các ống nghiệm còn lỏng đặt nghiêng trên thước gỗ hoặc que thủy tinh sao cho thạch trong ống nghiêng tới 2/3 chiều dài của ống. Tuyệt đối không để thạch chạm vào nút bông. Để yên cho đến khi thạch đông đặc. Yêu cầu mặt thạch phải phẳng, nhẵn, không bị đứt (hình 3a)

- Làm thạch đứng

Cho các ống nghiệm với lượng môi trường đặc chiếm ½ đến 2/3 ống nghiệm. Thạch còn nóng ta để đứng ống thạch vào giá, để yên cho đến khi môi trường nguội và đông đặc (hình 3b).

- **Đổ thạch vào đĩa petri (hình 4)**

Trong toàn bộ qui trình đổ thạch vào đĩa petri đều thực hiện trong tủ cấy vô trùng và gồm các thao tác sau:

- + Mở bao gói giấy các đĩa petri
- + Tay phải cầm dụng cụ chứa môi trường
- + Tay trái lấy nút bông ra và hơi miệng bình trên ngọn đèn cồn.
- + Nghiêng bình và rót nhẹ môi trường vào đĩa petri sau khi tay trái mở hé nắp trên của đĩa
- + Đậy nắp trên lại, xoay tròn đĩa petri để môi trường được phân phối đều trên mặt đĩa.
- + Để yên cho môi trường nguội và đông đặc.
- + Lật ngược hộp cho đáy lên trên.

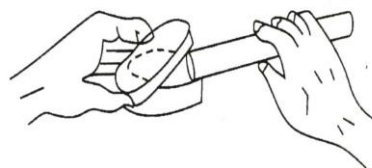
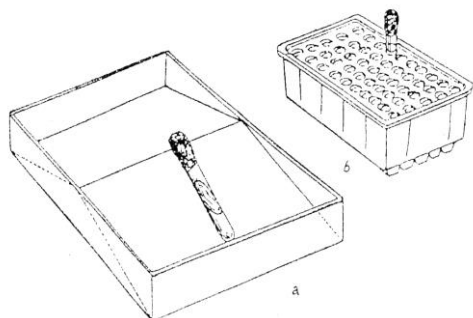
Chú ý:

Thao tác đổ thạch phải hết sức khẩn trương và khéo léo để hạn chế sự nhiễm khuẩn.

Mặt thạch phải phẳng, nhẵn, có độ dày khoảng 2 mm.

Sau 1 – 2 ngày kiểm tra xem môi trường có nhiễm khuẩn không rồi mới sử dụng.

Nhớ viết vào nhãn tên môi trường, ngày pha chế.



Hình 1:

Cách đặt thạch nghiêng (a);

Cách đặt thạch đứng (b)

Hình 2: Cách đổ thạch vào đĩa petri

g. Bảo quản và kiểm tra môi trường

Môi trường chưa dùng cần được bảo quản ở chỗ mát, hạn chế tác dụng của ánh sáng, nhiệt độ từ 0 – 5⁰ C và không để môi trường bị khô.

Trước khi sử dụng, để kiểm tra độ vô khuẩn của môi trường người ta thường đặt chúng vào tủ ấm 37⁰C, trong 48 – 72h. Sau lấy ra quan sát loại bỏ các môi

trường có vi sinh vật phát triển và chỉ sử dụng những ống nghiệm, những đĩa petri có môi trường đạt yêu cầu.

3.3 Pha chế một số môi trường thông dụng

a. Môi trường PGA (potato glucose agar): dùng nuôi cấy nấm mốc.

- Khoai tây 200g.
- Glucose 20 g.
- Agar 20g.
- Nước cất 1000ml.
- pH 6,5

Cách pha chế:

- Cân lượng cần thiết các thành phần môi trường đủ cho 1000 ml môi trường PGA

- Khoai tây gọt sạch vỏ và rửa sạch, dùng dao cắt thành các lát, nấu sôi rồi lọc lấy nước chiết

- Cho glucose vào dịch chiết khoai tây và làm tan hoàn toàn. BỔ sung lượng nước cho đủ theo công thức

- Cho agar vào, đun sôi và khuấy đều cho đến khi agar tan hoàn toàn.

- Dùng phễu thủy tinh, rót môi trường vào ống nghiệm để làm thạch nghiêng. Đậy ống nghiệm bằng nút bông.

- Khử trùng 1 atm/15 phút.

- Sau khi hấp vô trùng xong, lấy ra và để nghiêng một góc 20°. Để nguội cho môi trường đặc lại.

b. Môi trường peptone lỏng: nuôi cấy vi khuẩn.

- Cao thịt 5 g
- Peptone 10 g
- Nước cất 1000 ml

Cách pha chế:

- Cân đúng các thành phần trên cho vào trong cốc chứa 1000ml nước cất. Đem đun nhẹ cho tan đều.

- Dùng phễu thủy tinh rót vào mỗi ống nghiệm 5ml.

- Đậy nút bông, gói giấy và hấp vô trùng 1 atm/15 phút.

Nếu pha môi trường peptone đặc thì bổ sung thêm 20 gam agar/1 lít.

c. Môi trường PCA (Plate Count Agar).

- Cân chính xác 23,5 g môi trường bột tổng hợp khô cho vào cốc chứa khoảng 600 ml nước cất, đun cho tan môi trường trên bếp điện.

- Khi môi trường đã tan đều bổ sung thêm nước cất cho đủ 1000 ml.
- Phân vào 9 bình tam giác mỗi bình khoảng 60 – 80 ml môi trường.
- Tất cả đều làm nút bông, gói giấy và hấp vô trùng 121°C/15 phút.

d. Môi trường Gause: dùng để nuôi cấy xạ khuẩn

- Tinh bột tan 20,0 g
- K_2HPO_4 0,5 g
- $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,5g
- KNO_3 1 g
- NaCl 0,5 g
- $FeSO_4$ 0,1g
- Thạch 20 g
- Nước 1000 ml
- pH 7,2 - 7,4

e. Môi trường Hansen: dùng để nuôi cấy nấm men

- Glucose 50g
- Peptone 10 g
- KH_2PO_4 3g
- $MgSO_4$ 3g
- Agar 20 g
- Nước cất 1000 ml
- pH 6

V. THỰC HÀNH VÀ BÁO CÁO KẾT QUẢ

- Thực hành bao gói và khử trùng các loại dụng cụ: ống nghiệm, ống hút, que gạt, đĩa petri, bình tam giác...

- Thực hành pha môi trường dinh dưỡng nuôi cấy vi sinh vật.

Câu hỏi:

1. Trình bày mục đích và nguyên tắc cơ bản của việc bao gói dụng cụ?
2. Trình bày nguyên tắc hoạt động và các bước sử dụng nồi hấp vô trùng?
3. Trình bày những nguyên tắc và yêu cầu cơ bản của việc pha chế môi trường dinh dưỡng?
4. Trình bày các bước chế môi trường dinh dưỡng mà nhóm được phân công?