

CÁCH PHA CHẾ MỘT SỐ MÔI TRƯỜNG NUÔI CẤY VI SINH VẬT TRONG DẠY THỰC HÀNH SINH HỌC

PGS. TS Biền Văn Minh

Trường DHSP – Đại học Huế

Cũng như động - thực vật, để sinh trưởng các tế bào vi sinh vật (VSV) cần các chất dinh dưỡng thích hợp. Trong nuôi cấy nhân tạo người ta chuẩn bị các loại “thức ăn” cung cấp cho từng nhóm VSV khác nhau. Dạng “thức ăn” này được gọi là “môi trường nuôi cấy”.

Môi trường nuôi cấy thường được gọi theo tên người chế tạo công thức, ví dụ môi trường Hansen, Sabouraud... hoặc theo nguồn chất dinh dưỡng chính có trong môi trường, ví dụ môi trường thạch - thịt - pepton... Một môi trường được sử dụng để nuôi cấy VSV phải có đủ các chất dinh dưỡng cần thiết, có pH thích hợp, có độ nhớt nhất định, không chứa các yếu tố độc hại và phải tuyệt đối vô trùng.

Làm môi trường nhằm thực hiện việc phân lập, nhân giống, giữ giống VSV, đồng thời để nuôi cấy và nghiên cứu các đặc điểm sinh học của chúng.

1. Nguyên tắc pha chế môi trường

- Pha chế môi trường phải dựa trên cơ sở nhu cầu về các chất dinh dưỡng và khả năng đồng hoá các chất dinh dưỡng của từng loài VSV.
- Cần phải điều chỉnh tỉ lệ và nồng độ các chất trong thành phần môi trường để đảm bảo sự cân bằng về áp suất thẩm thấu giữa môi trường và tế bào VSV.
- Đảm bảo các điều kiện lý - hoá cần thiết cho các hoạt động trao đổi chất của VSV
- Môi trường phải vô trùng tuyệt đối để khi nuôi cấy chỉ phát triển một loại VSV mong muốn.

2. Phân loại môi trường

- Dựa vào mục đích sử dụng, người ta chia môi trường thành các loại: Môi trường cơ sở, môi trường làm giàu, môi trường chọn lọc và môi trường giám biệt.

a. *Môi trường cơ sở (minimum medium)*: là môi trường có đủ các chất cần thiết cho đa số các VSV phát triển được. Môi trường này thường được dùng để nuôi cấy các VSV để phát triển. Ví dụ, môi trường thạch – thịt – peptone dùng để phân lập, nuôi cấy vi khuẩn.

b. *Môi trường làm giàu (enrichment medium)*: trên môi trường cơ sở cho thêm một số chất dinh dưỡng đặc biệt để thích hợp với việc nuôi cấy một số nhóm VSV. Các chất bổ sung thêm có thể là máu, huyết thanh, cao nấm men, mô động vật hoặc nước chiết thực vật. Ví dụ, để nuôi cấy vi khuẩn *Bordetella pertussis* người ta dùng môi trường cơ sở Difco 0048 (đã khử trùng môi trường ở 110°C trong 30 phút) có bổ sung máu thỏ vô trùng (đã lọc qua nền lọc), sao cho nồng độ cuối là 15%.

c. *Môi trường chọn lọc (Selective medium)*: là môi trường, ngoài các chất dinh dưỡng cơ sở còn có một số chất đặc hiệu để kích thích VSV phát triển hoặc một số chất kìm hãm để ức chế sự phát triển của các VSV khác. Môi trường này thường được dùng để nuôi cấy, phân lập một loại VSV nhất định. Ví dụ, môi trường Hansen dùng để phân lập, nuôi cấy nấm men.

d. *Môi trường giám biệt (differential medium)* dùng trong việc giám định các loài VSV khác nhau để xác định vị trí phân loại của chúng. Chẳng hạn, khi xác định khả năng sinh protease thì bổ sung casein hay gelatin vào môi trường, khả năng sinh amylase thêm tinh bột tan vào môi trường, khả năng sinh lipase thêm dầu ăn và chỉ thị màu, khả năng sinh H₂S thêm Pb acetate...

- Dựa vào trạng thái vật lý, người ta chia môi trường làm 4 loại:

+ Môi trường lỏng hay dịch thể (*liquid medium*): Trong thành phần chỉ có các chất dinh dưỡng và nước, được dùng để nuôi cấy sinh, thử nghiệm các đặc tính sinh lý, sinh hóa hoặc dùng để giữ giống và bảo quản VSV không tăng trưởng tốt trên môi trường rắn.

+ Môi trường đặc hay cứng (*solid medium*): là môi trường dịch thể có bổ sung 2% thạch (agar - agar) dùng để phân lập VSV hiếu khí.

+ Môi trường bán đặc (*semisolid medium*): là môi trường dịch thể chứa 0,35-0,75% thạch (dùng để kiểm tra khả năng di động) và môi trường xốp là môi trường có sử dụng các nguyên liệu làm xốp như cám, cơm, mạt cưa, than bùn...(dùng để nuôi cấy các VSV hiếu khí dạng sợi).

3. Các bước pha chế một môi trường nuôi cấy

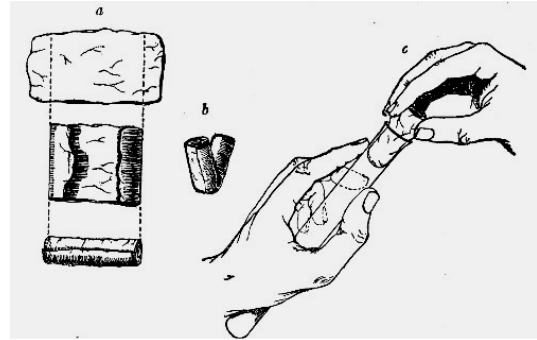
Bước một: Chuẩn bị dụng cụ: pipet, ống đong, ống nghiệm, cân, bình cầu.

Bước hai: Đối với môi trường lỏng: cân, đong đủ các thành phần của môi trường rồi cho vào bình cầu; đối với môi trường đặc thêm 2% thạch (cân thạch ngâm vào nước trước 5-10 phút, vớt thạch, vắt khô).

Bước ba: Đun sôi nhỏ lửa và khuấy đều cho tan hết rồi lọc qua vải màn khi còn nóng (50°C) hoặc làm trong bằng cách dùng lòng trắng 1 quả trứng gà với 1 lít môi trường. Đánh trứng sủi bọt rồi cho vào môi trường, khuấy đều, đun sôi 5 phút, để lắng rồi lọc qua vải màn.

Bước bốn: Đo pH của môi trường bằng máy đo pH. Chỉnh pH đến giá trị thích hợp bằng dung dịch NaOH 10% hoặc HCl 10%.

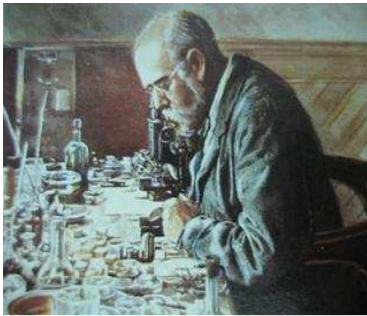
Bước năm: Dùng phễu thủy tinh, rót môi trường vào các dụng cụ (1/4 chiều cao ống nghiệm để chế thạch nghiêng, 1/2 chiều cao ống nghiệm - thạch đứng, 1/3 chiều cao đĩa petri – môi trường thạch đĩa). Làm nút bông (dùng bông không thấm nước) để nút miệng ống nghiệm (nút không được quá chặt hoặc quá lỏng, thường dài 3-4cm). Bao giấy chống thấm trên mỗi đầu ống nghiệm hay bình nón đựng môi trường (hình trên).



Làm nút bông theo trình tự a, b, c.

Bước sáu: Hấp 110°C môi trường trong 30 phút, đem ra chế thạch đĩa, hay lát nghiêng để cho môi trường đông lại ta được môi trường thạch nghiêng (xem hình dưới).

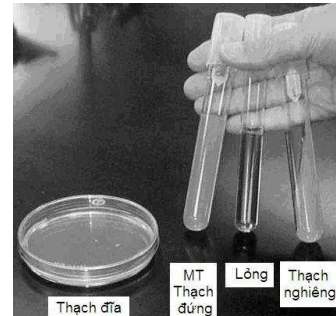
Bước bảy: Nhận định kết quả.



Người đầu tiên nghĩ đến sử dụng môi trường đặc trong nghiên cứu vi sinh vật là Robert Koch vào năm 1881.



Thạch là sản phẩm chế tạo từ Rau câu chi vàng (*Gracilaria verucosa*) là chất làm cứng môi trường.



Các loại môi trường nuôi cấy vi sinh vật cần pha chế tại các phòng thí nghiệm sinh học.

4. Thành phần một số môi trường và cách pha chế

a. *Môi trường thạch – thịt – peptone* (phân lập, nuôi cấy vi khuẩn)

* Công thức: Nước thịt bò 1000ml; peptone 10g; NaCl 5g; glucose 20g; thạch 20g.

Làm nước thịt bò: Lọc hết gân mỡ của thịt, xay hoặc băm nhỏ, cân 500g rồi ngâm thịt vào 1000ml nước cất, để tủ lạnh qua đêm. Đun từ từ cho tới sôi, vớt bọt, khuấy đều, duy trì sôi âm ỉ trong 1 giờ, thỉnh thoảng khuấy đều. Lọc qua giấy lọc để loại mỡ, bã thịt, rồi thêm nước cất cho đủ 1000ml. Nếu cất giữ để dành thì đóng chai hấp 110°C trong 30 phút.

* Pha chế:

+ Chuẩn bị dụng cụ: bình cầu (hoặc nồi nhôm), ống đong, giấy lọc, dao, máy xay thịt, cân.

Cân đong đủ nước thịt, peptone, muối rồi cho vào nồi nhôm đun nóng cho tan. Điều chỉnh pH đến 7,2 – 7,4. Cho thạch (đã ngâm nước trước 10 phút, rửa sạch) vào, đun sôi, lọc qua bông gạc khi môi trường còn nóng rồi phân phối vào các ống nghiệm, bình cầu hay bình nón. Dùng nút bông nút các ống nghiệm, bao giấy bịt đầu miệng của chúng. Hấp 110°C trong 30 phút; lấy các ống nghiệm ra và đặt nằm nghiêng cho thạch đông.

+ Yêu cầu: thạch phải tan đều, màu vàng nhạt hoặc hơi sẫm, không quá cứng hoặc quá mềm.

b. *Môi trường Hansen* (phân lập, nuôi cấy nấm men)

Glucose 50g; peptone 10g; KH_2PO_4 3g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 3g; thạch 20g; nước cất 1000ml; pH= 6,0.

c. *Môi trường Czapek* (phân lập và nuôi cấy nấm mốc)

Saccharose 30g; NaNO_3 2g; $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 1g; KCl 0,5g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,5g; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,01g; thạch 20g; nước cất 1000ml; pH =7,0.

d. *Môi trường Gause 1* (phân lập và nuôi cấy xạ khuẩn)

Tinh bột tan 20g; KH_2PO_4 0,5g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,5g; KNO_3 1g; NaCl 0,5g; FeSO_4 0,01g; thạch 20g; nước cất 1000 ml; pH = 7,2 - 7,4 .

Cách pha: Hòa tan các hoá chất trong thành phần môi trường vào nước, còn tinh bột hoà tan trong nước ấm. Khuấy cho tan đều rồi đổ trộn vào nhau, thêm nước cho đủ 1000ml.

e. *Môi trường nước chiết khoai tây và giá đậu xanh* (nuôi cấy vi khuẩn, nấm men, nấm mốc)

Khoai tây 100g, giá đậu xanh 100g, đường kính 50g; thạch 20g; nước cất 1000 ml.

Đun sôi khoai tây (đã gọt vỏ, thái lát) cùng giá đậu xanh với nước cất trong bình cầu 10 phút, sau đó đem lọc lấy dịch trong, cho hỗn hợp đường kính và thạch vào bình chứa dịch trong, đun sôi, khuấy đều cho hoà tan, lọc qua bông gạc khi môi trường còn nóng rồi phân phối vào các ống nghiệm, bình cầu hay bình nón. Dùng bông nút các ống nghiệm lại, bao giấy bịt đầu miệng ống, hấp 110°C trong 30 phút; lấy các ống nghiệm ra và đặt nằm nghiêng cho thạch đông.

Câu hỏi:

- 1) Trình bày nguyên tắc cơ bản của việc pha chế môi trường nuôi cấy vi sinh vật?
- 2) Nêu các bước pha chế một loại môi trường nuôi cấy vi sinh vật? Nguyên nhân môi trường bị hư hỏng ? Phương pháp bảo quản môi trường?
- 3) Trình bày các loại môi trường nuôi cấy VSV cần pha chế tại các phòng thí nghiệm ? Ứng dụng?

5. Những điểm cần lưu ý:

- Thạch (agar - agar) là chất rắn bổ sung làm cứng môi trường, không phải là chất dinh dưỡng đối với VSV. Thạch nóng chảy ở 100°C và đông lại ở 40°C . Nếu cần cấy VSV trước khi môi trường đông đặc, người ta để môi trường nguội đến $45 - 50^\circ\text{C}$ rồi mới cấy vào.

- Với các bình môi trường đã đông cần đun cách thủy để môi trường lỏng đồng đều. Khi lấy bình ra khỏi nồi phải dùng khăn sạch thấm khô bình (tránh nước trên thành bình nhỏ vào các đĩa môi trường gây nhiễm). Có thể đặt bình vào nồi hấp đun đến khi hòa tan, không nên đun bình trên bếp điện.

- Trong quá trình thạch đông không được làm rung bàn hay rung ống thạch. Sau khi thạch đông, ống nguội hẳn mới gói các ống thạch nghiêng bằng giấy vô trùng, đặt vào tủ ẩm $30-37^\circ\text{C}$ để kiểm tra độ vô trùng và để làm khô mặt thạch. Sau vài ngày lấy ra quan sát. Những ống thạch nghiêng vô trùng (không chứa các khuẩn lạc VSV) được dùng để nuôi cấy VSV.

- Rất nhiều loại đường dễ bị phân giải trong quá trình khử trùng ở pH kiềm (đặc biệt khi có mặt của muối phosphate và peptone) làm cho màu môi trường chuyển thành màu nâu và các sản phẩm tạo thành có thể ức chế sự sinh trưởng của VSV. Để tránh tình trạng đó người ta khử trùng ở môi trường pH acid nhẹ hoặc khử trùng riêng biệt đối với đường. ♦

Tài liệu tham khảo

- [1] Vũ Thị Minh Đức, *Thực tập vi sinh vật học*, NXB Đại học Quốc gia Hà Nội năm 2001.
- [2] John William Henry Eyre, 2009. *A Laboratory Guide for Medical, Dental, and Technical Students*, <http://www.gutenberg.org/>.