

BÀI 5: QUAN SÁT HÌNH THÁI VI SINH VẬT DƯỚI KÍNH HIỂN VI

I. MỤC ĐÍCH YÊU CẦU

- Nắm vững cách sử dụng kính hiển vi quang học, đặc biệt là kỹ năng sử dụng vật kính dầu.
- Biết cách làm tiêu bản (tạm thời) và quan sát một số đặc điểm của vi sinh vật dưới kính hiển vi.
- Nắm vững phương pháp làm tiêu bản phòng ẩm để quan sát cuống sinh bào tử của nấm mốc.
- Nắm vững nguyên tắc, các bước thực hiện khi làm tiêu bản cố định nhuộm màu và quan sát được các đặc điểm sinh học của vi sinh vật trên kính hiển vi.

II. VẬT LIỆU

- Kính hiển vi, dầu soi
- Đèn cồn, cồn 70⁰, 90⁰
- Gòn thấm
- Que cấy vòng, que cấy móc
- Phiến kính và lá kính sạch
- Hộp petri có chứa phiến kính và lá kính đã vô trùng
- Ống nghiệm chứa nước cất vô trùng
- Pipet 5 ml, 10 ml vô trùng
- 200 ml môi trường PGA vô trùng
- Thuốc nhuộm xanh metylen 0,001%.
- Mẫu cấy của vi khuẩn, nấm men, nấm mốc trên môi trường thạch đĩa.
- Tiêu bản nhuộm đơn của vi khuẩn *E. coli*, *Bac.subtilis*, *Streptococcus* ... và nấm men.
- Tiêu bản phòng ẩm nấm sợi: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor*, *Rhizopus* ...
- Thuốc nhuộm đơn, nhuộm bào tử, nhuộm gram
- Giá và mâm nhuộm
- Bình tia, giấy lọc, giấy thấm
- Đèn cồn, que cấy vòng
- Cồn 95⁰, HCl 0,5%, H₂SO₄ 1%
- Dịch nuôi cấy tế bào vi khuẩn *E. coli*, *Bac.subtilis* (1 – 2 tuần), nấm men.

III. QUAN SÁT HÌNH THÁI VI SINH VẬT

1. Quan sát vi sinh vật ở trạng thái sống – làm tiêu bản tạm thời

Là quan sát vi sinh vật ở trạng thái tự nhiên về hình dạng, cấu tạo, sự chuyển động, sự tăng trưởng và phát triển....

1.1 Cách làm tiêu bản giọt ép

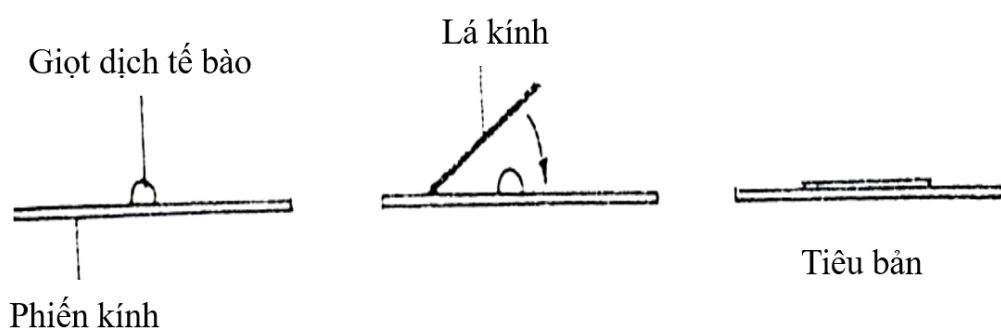
a. Đối với vi khuẩn và nấm men

- Cho một giọt nước vô trùng lên phiến kính sạch
- Dùng que cấy vòng lấy một vòng dịch vi khuẩn hoặc nấm men hòa vào giọt nước
- Đặt lá kính lên giọt canh trường thật nhẹ để tránh không tạo bọt khí
- Đặt tiêu bản lên bàn kính hiển vi.
- Quan sát ở vật kính 10x và 40x

Chú ý:

Nếu giọt dịch nhiều quá, tràn ra ngoài phần tiếp xúc của phiến kính và lá kính ta dùng giấy thấm bớt đi

Trong trường hợp mẫu ở dạng khuẩn lạc trên môi trường thạch, dùng que cấy vòng chấm nhẹ vào bìa mép khuẩn lạc rồi hòa vào giọt nước vô trùng được chuẩn bị sẵn trên phiến kính.



Hình 10: Cách làm tiêu bản giọt ép

b. Đối với nấm sợi và xạ khuẩn

Do nấm mốc và xạ khuẩn phát triển thành hệ sợi. Do đó khi làm tiêu bản phải dùng kim đơm khuẩn ty vào dịch thấm ướt. Đồng thời tách các sợi rời ra. Sau đó đặt lá kính lên. Quan sát dưới kính hiển vi ở vật kính 10x và 40x. Dịch thấm ướt của xạ khuẩn là nước còn nấm mốc phải dùng dung dịch lactophenol.

Ngoài ra, để giữ nguyên cấu trúc hệ sợi của nấm mốc và xạ khuẩn, nhất là cơ quan sinh sản (cuống sinh bào tử, cách đính bào tử ...). có thể chuẩn bị tiêu bản bằng phương pháp nuôi cấy phòng ẩm. Các bước tiến hành như sau:

- Cho vào đĩa petri một tờ giấy thấm, rồi đặt vào một phiến kính. Đậy lại, gói giấy và đem hấp khử trùng.
 - Đun chảy môi trường dinh dưỡng đã khử trùng trong ống nghiệm (môi trường PGA cho nấm mốc và Gause cho xạ khuẩn)
 - Mở hé nắp petri ở gần ngọn lửa đèn cồn, đổ thạch trong ống nghiệm lên phiến kính và chờ đông lại.
 - Lấy nước cất đã vô trùng đổ vào phần giấy thấm, để nước thấm đều tờ giấy (không tràn lên phiến kính).
 - Dùng que cấy móc, khều nhẹ vào khuẩn lạc nấm mốc (hoặc xạ khuẩn) rồi chấm lên phần thạch của phiến kính trong phòng ẩm.
 - Gói cả hộp lại và nuôi ủ ở nhiệt độ thường 2 – 3 ngày (nấm mốc), 5 - 7 ngày (xạ khuẩn)
 - Mở hộp petri và lấy phiến kính bên trong ra.
 - Dùng giấy thấm lau mặt đáy phiến kính.
- Đậy lá kính lên chỗ có khuẩn lạc mọc và đặt dưới kính hiển vi để quan sát mẫu (ở trạng thái sống với vật kính có độ phóng đại 10x và 40x).

1.2 Phương pháp làm tiêu bản giọt treo

Loại tiêu bản này có thể theo dõi sự sinh sản, sự hình thành bào tử, khả năng di động ... của vi sinh vật. Cách tiến hành như sau:

- + Dùng phiến kính đặc biệt có phần lõm hình tròn ở giữa
- + Bôi vazolin quanh phần lõm của phiến kính
- + Cho một giọt canh trường lên giữa lá kính
- + Cẩn thận úp ngược lá kính lên trên chỗ lõm của phiến kính.
- + Được quan sát dưới kính hiển vi.

Chú ý: không để giọt canh trường lan rộng hay chạm vào đáy của phần lõm.

1.3 Cách làm tiêu bản tạm thời có nhuộm màu

Nguyên tắc: phương pháp này sử dụng thuốc nhuộm không hoặc ít độc với vi sinh vật và được pha loãng ở nồng độ đảm bảo cho tế bào vẫn sống và hoạt động sau khi nhuộm.

Cách nhuộm:

- + Nhỏ một giọt thuốc nhuộm xanh metylen 0,001% lên phiến kính
- + Nhỏ một giọt canh trường lên giọt thuốc nhuộm
- + Đậy lá kính lên giọt dịch
- + Quan sát tiêu bản ở vật kính 10x rồi 40x

2. Quan sát vi sinh vật ở trạng thái chết – làm tiêu bản cố định (tiêu bản vi sinh vật chết nhuộm màu)

2.1 Cách làm tiêu bản

Quan sát tiêu bản cố định là một phương pháp phổ biến trong nghiên cứu vi sinh vật học vì nó có ưu điểm sau:

- Thao tác tuy phức tạp nhưng tiêu bản có màu sắc đẹp, giữ được lâu.
- Cho phép ta quan sát rõ ràng hình dạng và một số cấu tạo của tế bào cũng như dễ dàng đếm số lượng tế bào vi sinh vật....

- Không sợ bị lây nhiễm khi làm việc với vi sinh vật gây bệnh

Quá trình làm tiêu bản cố định thường qua các bước sau:

a. Làm vết bôi

- Chọn phiến kính sạch và khô. Nếu chưa sạch phải rửa lại.
- Lấy bút chì màu khoan 1 vòng tròn ($1 - 2 \text{ cm}^2$) lên một phía của phiến kính, quay ngược phiến kính lại và để lên giá (nếu đã làm quen thì không cần làm bước này)
 - Dùng que cấy vòng lấy một giọt canh trường để vào vòng đã khoan. Nếu canh trường đặc thì dùng que cấy lấy một giọt nước vô trùng để lên vòng đã khoan, sau đó lấy 1 ít khuẩn lạc vi sinh vật hòa đều với nước.
 - Nghiêng que cấy $10 - 15$ độ, nhẹ nhàng dàn giọt canh trường ra khắp diện tích đã khoan, không sát mạnh.
 - Khử trùng que cấy và để vào giá.
 - Để vết bôi khô tự nhiên.

Chú ý:

- + Lượng vi sinh vật lấy vừa phải
- + Vết bôi tròn, gọn và thật mỏng, vi sinh vật không tập trung vào một chỗ hoặc chòng chát thành nhiều lớp, mà phải phân phối đều trên vết bôi.
- + Kích thước vết bôi vừa phải khoảng $1 - 2 \text{ cm}^2$, bé quá khó quan sát, lớn quá mất thời gian, tốn thuốc nhuộm.

b. Cố định vết bôi

Việc cố định vết bôi nhằm các mục đích sau:

- + Giết chết vi sinh vật để an toàn khi tiếp xúc
- + Gắn chặt vi sinh vật vào phiến kính để lúc nhuộm thì rửa không bị trôi
- + Làm cho vi sinh vật dễ bắt màu

Có nhiều phương pháp cố định, phương pháp đơn giản nhất là hơi nóng trên đèn cồn, cách làm như sau: kẹp phiến kính giữa 2 ngón tay cái và ngón trỏ, đưa

qua lại 4 – 5 lần trên phần không nóng lắm của đèn cồn, tránh không để tiêu bản nóng quá.

Khi nghiên cứu cấu tạo tế bào thì việc cố định bằng cách hơi nóng không có lợi, mà phải cố định bằng hóa chất, thường dùng các chất là rượu và axêton. Các cách cố định như sau:

- + Nhúng vết bôi vào rượu. Với rượu 95⁰ ngâm vết bôi từ 5 – 15 phút. Với rượu metylic ngâm khoảng 2 – 5 phút.
- + Ngâm vết bôi vào dung dịch axêton trong 5 phút.
- + Nhỏ vài giọt rượu 90 – 95⁰ lên vết bôi. Đốt cháy và dập tắt ngay. Làm như vậy vài lần rồi để khô.

c. Nhuộm màu tiêu bản

Nguyên tắc: Sử dụng thuốc nhuộm có khả năng thẩm thấu qua màng tế bào và kết hợp với thành phần khác nhau của tế bào thành những hợp chất màu đặc trưng bền vững.

- Tùy theo mục đích nghiên cứu và khả năng bắt màu khác nhau của các thành phần tế bào mà chọn loại thuốc nhuộm cho phù hợp.
- Có hai cách nhuộm chính:
 - + Nhuộm đơn giản: chỉ dùng một loại thuốc nhuộm trên 1 tiêu bản
 - + Nhuộm phức tạp (nhuộm kép): dùng đồng thời 2 hay nhiều loại thuốc nhuộm trên 1 tiêu bản. Ví dụ: nhuộm gram, nhuộm bào tử, nhuộm tiêm mao...

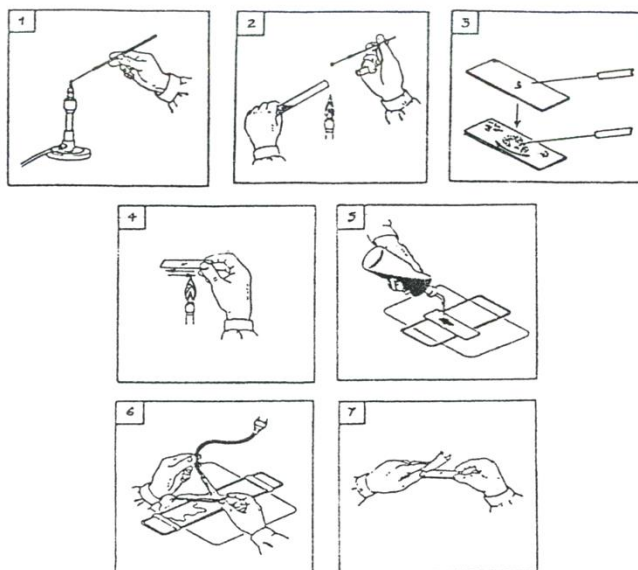
Như vậy, tùy mục đích nghiên cứu mà ta áp dụng phương pháp nhuộm thích hợp.

Cách nhuộm:

Vết bôi đã cố định phải để khô mới đem nhuộm

- Đặt tiêu bản có vết bôi lên cầu thủy tinh (được đặt nằm ngang miệng một bôcan)
 - Đặt miếng giấy lọc phủ lên toàn bộ vết bôi
 - Dùng ống nhỏ giọt nhỏ thuốc nhuộm phủ đều vết bôi. Chú ý không cho thuốc nhuộm nhiều quá và trong thời gian nhuộm trên vết bôi luôn luôn có phủ đều một lớp thuốc nhuộm.
 - Thời gian nhuộm tùy tính chất tiêu bản và thuốc nhuộm
 - Thường nhuộm ở nhiệt độ phòng. Để tăng cường tác dụng của thuốc nhuộm hoặc rút ngắn thời gian ta hơi nóng trên đèn cồn
 - Khi nhuộm xong, rửa vết bôi bằng cách nghiêng phiến kính, dùng bình xịt cho dòng nước chảy nhẹ qua vết bôi đến khi nước chảy ra không còn màu nữa

- Dùng giấy thấm khô tiêu bản hoặc hơi nhẹ tiêu bản trên đèn cồn.
- Quan sát tiêu bản ở vật kính 40x rồi chuyển sang vật kính 100x có dầu.



Hình 11: Trình tự các bước làm tiêu bản cố định

2.2 Các phương pháp nhuộm tế bào vi sinh vật

a. Nhuộm đơn giản

Là phương pháp hay dùng trong phòng thí nghiệm, nó cho phép ta nhận định nhanh chóng về hình dạng của vi sinh vật.

Tiến hành nhuộm tế bào vi khuẩn *E. coli*, *Bac.subtilis*, tế bào nấm men theo trình tự như sau:

- Làm vết bôi, để khô tự nhiên
- Cố định bằng cách hơi nhẹ trên ngọn đèn cồn
- Đặt giấy lọc lên vết bôi đã cố định
- Nhỏ vài giọt thuốc nhuộm Fuchsin loãng trong 2 – 3 phút hoặc xanh metylen trong 3 – 5 phút
- Dùng nước rửa sạch
- Thấm khô bằng giấy thấm
- Quan sát dưới vật kính 100x (có dầu).

b. Nhuộm phức tạp (nhuộm kép)

Phương pháp này dựa trên đặc tính cấu tạo hóa học của tế bào, nó được dùng để nghiên cứu cấu tạo và đặc tính của tế bào cũng như sự khác nhau giữa các loài vi sinh vật.

❖ NHUỘM GRAM

Nguyên tắc: Dựa trên khả năng bắt màu của vôi thuốc nhuộm tím kết tinh và iod mà chia thành 2 nhóm lớn.

+ Nhóm giữ được phức chất tạo thành giữa tím kết tinh và iod khi xử lý bằng cồn. Nhóm vi khuẩn có tính chất này gọi là vi khuẩn gram dương.

+ Nhóm không giữ được phức chất tạo thành giữa tím kết tinh và iod khi xử lý bằng cồn. Nhóm vi khuẩn có tính chất này gọi là vi khuẩn gram âm.

Tiến hành nhuộm tế bào *E. coli* và *Bac.subtilis*

• Chuẩn bị tiêu bản

- Làm vết bôi, để khô
- Có định nhẹ trên ngọn lửa đèn cồn (tránh làm nóng quá)

• Nhuộm tiêu bản

- Đặt giấy lọc lên vết bôi
- Nhuộm tiêu bản bằng tím kết tinh trong 1 – 2 phút
- Đổ hết thuốc đi, nhỏ dung dịch lugol lên để trong 1 phút
- Rửa nước, thấm khô
- Nhúng vào cồn 95⁰ trong 30 giây. Cần làm cẩn thận vì kết quả phụ thuộc nhiều vào động tác này.

- Rửa nước, thấm khô
- Nhuộm bổ sung bằng Funshin loãng 1 phút
- Rửa nước, thấm khô
- Xem tiêu bản dưới vật kính dầu

Kết quả: *Bac.subtilis* bắt màu tím, *E. coli* bắt màu hồng.

❖ NHUỘM BÀO TỬ (NHA BÀO)

Nguyên tắc: Dựa trên cấu trúc đặc biệt của màng bào tử dày, chắc, khó bắt màu nên khi nhuộm cần phải dùng thuốc nhuộm đặc, xử lý tế bào chất bào tử để bắt màu bằng nhiệt và axit.

Có nhiều phương pháp nhuộm bào tử, nhưng tất cả các phương pháp đều dựa trên nguyên tắc:

- Đầu tiên nhuộm toàn bộ (cả tế bào chất của bào tử và tế bào) bằng một loại thuốc nhuộm có hoạt tính mạnh
- Làm mất màu tế bào (nhưng bào tử vẫn còn màu)
- Nhuộm lại tế bào bằng một loại thuốc nhuộm khác

Nhờ vậy mà tế bào chất của bào tử và tế bào chất của tế bào bắt màu khác nhau.

Làm tiêu bản và nhuộm (Theo phương pháp Ogietska)

- Làm vết bôi với *Bac.subtilis* đã nuôi cấy 2 tuần tuổi trên ống thạch nghiêng, và để khô tự nhiên
- Nhỏ vài giọt HCl 0,5% lên vết bôi, hơi nóng trên ngọn đèn cồn cho bốc hơi, giữ 2 phút rồi rửa nước
- Đặt giấy lọc lên vết bôi
- Nhỏ Fuchsin Ziehl 3 – 5 phút. Trong khi nhuộm hơi nóng cho đến bốc hơi nhẹ. Nếu thuốc nhuộm cạn phải thêm vào, không để bị khô.
- Rửa vết bôi, để khô
- Tẩy màu bằng cách nhúng phiến kính vào dung dịch H₂SO₄ 1% trong 1 – 2 phút
- Rửa nước
- Nhuộm vết bôi bằng xanh metylen Loeffler trong 1 – 2 phút
- Rửa sạch, để khô
- Quan sát tiêu bản dưới vật kính dầu

Kết quả: bào tử màu đỏ, tế bào chất màu xanh.

IV. THỰC HÀNH VÀ BÁO CÁO KẾT QUẢ

1. Thực hành quan sát đại thể khuẩn lạc vi khuẩn, nấm men, nấm mốc
2. Thực hành sử dụng kính hiển vi.
3. Làm tiêu bản tạm thời quan sát hình dạng tế bào vi khuẩn, nấm men.
4. Quan sát hình dạng tế bào vi khuẩn, nấm men ở vật kính dầu khi nhuộm đơn.
5. Thực hành làm tiêu bản phòng ẩm. Quan sát sợi khuẩn ty và cuống sinh bào tử của nấm mốc trên tiêu bản đã được chuẩn bị sẵn.
6. Thực hành làm tiêu bản nhuộm đơn để quan sát hình dạng tế bào vi khuẩn, nấm men.
7. Thực hành làm tiêu bản nhuộm gram và nhuộm bào tử của vi khuẩn.

Câu hỏi:

1. Cho biết ý nghĩa của việc nghiên cứu các đặc điểm sinh học của vi sinh vật?
2. Vẽ và mô tả hình dạng của các tế bào vi khuẩn, nấm men đã quan sát dưới kính hiển vi?

3. Trình bày phương pháp làm tiêu bản phòng ẩm. Mô tả và vẽ hình cấu trúc sợi nấm, cuống sinh bào tử của nấm mốc quan sát được?
4. Trình bày nguyên tắc và ý nghĩa của việc nhuộm đơn, nhuộm kép (nhuộm gram, nhuộm bào tử) trong nghiên cứu vi sinh vật?
5. Tóm tắt phương pháp nhuộm đơn. Vẽ hình các tế bào quan sát được?
6. Tóm tắt phương pháp nhuộm gram. Vẽ hình và giải thích kết quả nhuộm?
7. Tóm tắt phương pháp nhuộm bào tử. Vẽ hình và chú thích kết quả quan sát được?