



Các phương pháp thực nghiệm dùng để định tên nấm men

Bởi:

Nguyễn Lâm Dũng

CÁC PHƯƠNG PHÁP THỰC NGHIỆM DÙNG ĐỂ ĐỊNH TÊN NẤM MEN

Quan sát hình thái tế bào nấm men và đo kích thước

Khi xác định hình thái và kích thước tế bào nấm men người ta thường nuôi cấy nấm men trong môi trường thạch - mạch nha và môi trường mạch nha dịch thể. Nếu sử dụng các môi trường khác thì hình thái và kích thước tế bào nấm men có thể thay đổi, không phù hợp với hình thái và kích thước tiêu chuẩn đã được ghi trong bảng phân loại.

- *Môi trường mạch nha*: Lấy lúa đại mạch đã ủ cho nảy mầm (loại nhập khẩu dùng để làm bia), đem phơi khô rồi xay nhỏ thành bột. Cân 1kg bột này, thêm 3 lít nước, giữ ở 60⁰C để đường hoá cho đến khi hết tinh bột (thử với dịch Lugol không thấy có màu xanh lam). Lọc lấy dịch trong có thể thêm 3 lòng trắng trứng rồi trộn đều, đun sôi rồi lọc lấy dịch trong. Điều chỉnh bằng nước để có nồng độ đường đạt 6⁰ Baume.

Phân vào các dụng cụ thuỷ tinh đã khử trùng. Nếu làm môi trường đặc thì thêm 2% thạch. Tốt nhất là dùng mầm đại mạch, nếu không thì có thể dùng mầm lúa. Nồng độ thích hợp để nuôi cấy nấm men dùng khi phân loại là 5,7⁰ Baume. Có tài liệu lại sử dụng nồng độ 5-8⁰ Baume. Nấm men được nuôi cấy trong các ống nghiệm thạch nghiêng hoặc các ống nghiệm đựng 3 ml môi trường dịch thể. Nuôi cấy ở 25-30⁰C trong 3 ngày, sau đó lấy ra làm tiêu bản và quan sát. Muốn đo kích thước tế bào nấm men người ta thường sử dụng trực vi thị kính). Số tế bào nấm men được đo không ít hơn 20. Chú ý là phải đo các tế bào trưởng thành chứ không đo các chồi mới nảy sinh. Tế bào nấm men có hình thái và kích thước khác nhau tùy loài, tùy chi. Chúng có thể có hình cầu, hình bầu

Các phương pháp thực nghiệm dùng để định tên nấm men

dục, hình trứng, hình quả chanh châu Âu, hình ống v.v... Khi quan sát tế bào nấm men dưới kính hiển vi có thể phân biệt được thành tế bào, tế bào chất, không bào (vacuole) và các hạt dị nhiễm (metachromatic granules). Thành tế bào nấm men thẫm hơn so với nguyên sinh chất, còn không bào thường có hình tròn, màu nhạt hơn. Các hạt dị nhiễm thường bắt ánh sáng mạnh hơn, chúng lắng lư trong nguyên sinh chất theo chuyển động Brown. Kích thước của tế bào nấm men khác nhau rất nhiều tùy loài thủy chi, tùy điều kiện sinh trưởng và có thể thay đổi trong khoảng 1-5 x 5-30µm hay có khi dài hơn nữa. Kích thước tế bào của các loại nấm men thông thường vào khoảng 4-5µm.

Nhuộm màu tế bào nấm men:

Muốn quan sát tế bào nấm men một cách tỷ mỉ hơn người ta thường sử dụng các loại thuốc nhuộm để nhuộm cả tế bào hoặc một số phần tế bào nấm men. Có thể dùng một trong những loại dung dịch thuốc nhuộm sau đây:

- Dung dịch Lugol:

Iot	2g
Iodua Kali	4g
Nước cất	100ml

(Nghiền nhỏ I và KI trong cối sứ rồi sau đó dùng nước hoà tan dần).

- Dung dịch xanh methylen (methylene blue)

Xanh methylen	1g
Nước cất	1000ml

(Có thể pha thành dung dịch 1% sau đó lọc rồi dùng nước cất pha loãng thêm 10 lần nữa).

- Dung dịch fuchsin cacbolic:

Fuchsin kiềm (basic fuchsin)	0,1g
Cồn 90 ⁰	10ml
Dung dịch phenol 3%	90ml

Các phương pháp thực nghiệm dùng để định tên nấm men

(Hoà tan fuchsin trong cồn, sau đó trộn đều vào dung dịch phenol).

Có thể dùng que cấy, phết dịch nuôi cấy nấm men thành một lớp mỏng trên phiến kính sau đó làm khô, cố định và nhuộm đơn bằng xanh methylen hay fuchsin cacbolic như khi nhuộm tiêu bản vi khuẩn. Thường người ta dùng lamelle (lá kính mỏng) để quan sát tế bào nấm men. Lấy một phiến kính sạch nhỏ lên đó một giọt thuốc nhuộm (xanh methylen chẳng hạn). Giọt thuốc nhuộm không nên to quá (về sau sẽ tràn khỏi lamelle), cũng không nên nhỏ quá (tạo thành nhiều bọt khí khi đẩy lamelle). Lấy một ít nấm men đã nuôi cấy 2-3 ngày hoà vào giọt thuốc nhuộm. Đặt một cạnh của lamelle sát vào phía ngoài giọt mẫu rồi hạ từ từ lamelle xuống cho giọt mẫu tràn đều khắp lamelle. Nếu tràn ra ngoài thì dùng giấy lọc thấm bớt. Soi ở vật kính nhỏ trước, sau đó chuyển sang vật kính lớn. Có thể căn cứ vào mức độ bắt màu đậm nhạt để phân biệt được tế bào sống và tế bào chết. Muốn quan sát các hạt glycogen trong tế bào nấm men thì nhuộm bằng dung dịch Lugol. Tế bào sẽ có màu vàng nhạt còn các hạt glicogen có màu đỏ nâu. Muốn quan sát các giọt mỡ trong tế bào nấm men có thể làm tiêu bản như sau:

Rỏ một giọt formalin lên phiến kính, dùng que cấy lấy một ít nấm men đã nuôi cấy 48-72 giờ hoà vào giọt formalin. Để yên 5 phút sau đó thêm một giọt dung dịch thuốc nhuộm xanh methylen, lại thêm một giọt thuốc nhuộm soudan III. Đặt lamelle dưới kính hiển vi rồi quan sát ta sẽ thấy nguyên sinh chất của tế bào nấm men bắt màu lam nhạt, không bào không bắt màu còn các giọt mỡ có màu đỏ hồng.

- Thuốc nhuộm soudan III:

Soudan III	0,05g
Cồn 90%	100ml

Cũng có thể nhuộm các giọt mỡ bằng phương pháp sau đây: Lấy thuốc nhuộm đen Soudan B (Soudan black B) cho vào ống nghiệm. Dùng que cấy lấy một ít nấm men hoà vào dịch thuốc nhuộm này. Giữ 20 phút. Lấy khoảng 2 vòng que cấy dịch thuốc nhuộm có nấm men phết lên phiến kính. Làm khô tự nhiên. Nhuộm tiêu bản trong 30 giây bằng dịch thuốc nhuộm safranin. Rửa nước, đợi khô rồi soi kính. Nguyên sinh chất của tế bào nấm men sẽ có màu đỏ nhạt còn các giọt mỡ có màu đen lam.

- Thuốc nhuộm đen Soudan B (theo Burdon):

Soudan black B	0,3g
Cồn 70%	100ml

(Trộn đều, để 24 giờ rồi mới sử dụng. Dùng trong vòng một tháng).

Các phương pháp thực nghiệm dùng để định tên nấm men

- Thuốc nhuộm safranin:

Dịch safranin 2,5% (trong cồn 95%) 10ml

Nước cất 100ml

Muốn nhuộm nhân của tế bào nấm men có thể sử dụng phương pháp sau đây:

Lấy một giọt nước đặt lên 1 phiến kính. Dùng que cấy lấy một ít nấm men hoà vào giọt nước đó rồi dàn thành vết mỏng. Làm khô tự nhiên. Thêm vài giọt dung dịch picroformol, giữ vài phút sau đó rửa bằng cồn 70%. Ngâm tiêu bản vào trong dung dịch $\text{FeNH}_4(\text{SO}_4) \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 3% trong 4-7 giờ. Lấy tiêu bản ra dùng nước rửa sạch sau đó lại ngâm vào dịch thuốc nhuộm hematoxin 10% trong 24 giờ. Lấy ra rửa nước rồi lại ngâm vào dịch $\text{FeNH}_4(\text{SO}_4) \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ cho đến khi vừa mất màu thì lấy ra rửa sạch bằng nước, làm khô rồi soi kính. Nguyên sinh chất của tế bào nấm men có màu tro còn nhân tế bào có màu đen.

- Dung dịch nhuộm nhân tế bào:

+ Dung dịch picroformol:

Dung dịch acid picric bão hoà 75 phần

Axetit acetic glacial 5 phần

Dung dịch fomol loãng 20 phần

+ Dung dịch ngâm $\text{FeNH}_4(\text{SO}_4) \cdot 12\text{H}_2\text{O}$

$\text{FeNH}_4(\text{SO}_4) \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 3g

Nước 100ml

+ Dung dịch thuốc nhuộm hematoxin

Hematoxin 1g

Cồn 10ml

Nước 90ml

Hoà tan hematoxin trong cồn, sau đó thêm nước, đậy nút bông rồi để 1 tháng sau mới sử dụng.

Các phương pháp thực nghiệm dùng để định tên nấm men

Để quan sát tế bào nấm men có thể dùng dung dịch nigrozin 5%. Khi đó tế bào sẽ không bắt màu, có thể phân biệt rõ trên một nền màu lam đen.

Để quan sát bào tử túi (tránh nhầm với các không bào) có thể sử dụng một số các phương pháp nhuộm bào tử đã được giới thiệu trong chương IV (phương pháp nghiên cứu vi sinh vật học tập 1 NXB KHKT 1971). Cũng có thể nhuộm bào tử túi bằng phương pháp sau đây: Rỏ 1 giọt nước lên phiến kính. Dùng que cấy lấy một ít nấm men trộn vào giọt nước, dàn thành vết mỏng, để khô tự nhiên.

Cố định trên ngọn lửa bằng đèn cồn, nhuộm bằng dung dịch lục malachit. Nhuộm 2 phút, thường xuyên hơ trên ngọn lửa cho bốc hơi (không được đun sôi). Rửa nước nhẹ, nhuộm thêm 30 giây bằng dung dịch safranin 0,5% trong nước. Nang bào tử sẽ bắt màu xanh lục còn tế bào dinh dưỡng có màu hồng.

- Dung dịch lục malachit:

Lục malachit (malachite green)	1g
Nước	100ml (không đun nóng)

Quan sát quá trình nảy chồi của tế bào nấm men

(sử dụng cho tế bào nấm men dinh dưỡng không có dạng sợi - non filamentous vegetative cells).

Cấy một vòng que cấy tế bào nấm men một ngày tuổi vào bình nón loại 100ml chứa 30ml môi trường dịch thể (môi trường nước chiết mạch nha, môi trường cao nấm men-pepton-glucoza hay môi trường mạch nha - cao nấm men - glucoza - pepton).

- Môi trường mạch nha - cao nấm men - glucoza - pepton:

Cao mạch nha (malt extract)	3g
Cao nấm men (yeast extract)	3g
Glucoza	10g
Pepton	5g
Nước	1000ml

Các phương pháp thực nghiệm dùng để định tên nấm men

Nuôi cấy trong bình nón ở 25-28⁰C sau hai đến ba ngày tiến hành lấy mẫu quan sát. Khi quan sát dưới kính hiển vi cần phân biệt được là nấm men sinh sản theo cách nảy chồi hay phân cắt hoặc cả hai.

- Nếu nảy chồi thì chồi xuất hiện ở đâu? ở cả hai đầu (hai cực) hay ở vị trí bất kỳ nào trên tế bào? Số lượng chồi trên tế bào mẹ?

- Chồi con sau khi phát triển có rời khỏi tế bào mẹ hay không?

- Dạng và kích thước của tế bào? Chú ý: phương pháp này phải dùng với các môi trường xác định và ở pha sinh trưởng logarit của tế bào.

Quan sát khuẩn ty giả:

Có một số nấm men khi phát triển trong những môi trường nuôi cấy lâu hay trong những điều kiện thiếu oxy có thể tạo thành những tế bào dài, xếp nối tiếp nhau, được gọi là khuẩn ty (mycelium). Người ta phân biệt hai loại khuẩn ty: khuẩn ty giả và khuẩn ty thật. Khuẩn ty thật là các tế bào dạng sợi có vách ngăn, khuẩn ty giả là các tế bào dạng sợi không có vách ngăn. Việc tạo thành khuẩn ty là một đặc điểm quan trọng trong phân loại nấm men. Cũng có một ít loại nấm men khi phát triển bình thường cũng tạo thành khuẩn ty giả (pseudomycelium).

Muốn kiểm tra việc tạo thành khuẩn ty người ta thường nuôi cấy nấm men trên môi trường pepton - glucoza, môi trường khoai tây - glucoza hay môi trường ngô.

- Môi trường thạch - pepton - glucoza:

Pepton	10g
Glucoza	20g
Thạch	20g
Nước	1000ml

- Môi trường khoai tây - glucoza:

Nước chiết khoai tây 10%	1000ml
Glucoza	20g
Thạch	20g

Các phương pháp thực nghiệm dùng để định tên nấm men

Cách làm nước chiết khoai tây: cân 100g khoai tây đã gọt vỏ, rửa sạch và thái nhỏ, thêm 300ml nước, hấp ở áp lực 1at trong 1 giờ sau đó bổ sung nước cho đủ 1000ml.

- Môi trường ngô:

cân 12,5g ngô, thêm 300ml nước đun cách thủy 60°C trong 1 giờ, lọc lấy nước trong. Thêm nước cho đủ 300ml. Sau đó thêm 3,8g thạch. Hấp ở áp lực 1at trong 15 phút. Lọc nóng qua bông thấm nước rồi phân vào các ống nghiệm và khử trùng ở áp lực 1at trong 15 phút.

Đổ môi trường vào hộp Petri. Dùng que cấy, cấy nấm men thành 3 cặp đường song song ngắn, ở 3 chỗ. Dùng panh lấy lá kính mỏng (thường xuyên ngâm trong cồn 70%) đốt nhẹ hết cồn, để nguội một chút rồi cẩn thận đặt nhẹ nhàng lên vết cấy. Phải cấy thế nào để hai đường cấy song song ở mỗi chỗ có chiều ngang nằm gọn giữa lá kính mỏng, hai đầu dài hơn lá kính mỏng một chút (để sau này dễ quan sát). Cần chú ý là bề mặt thạch phải thật khô, khi đập lá kính mỏng, phải tránh bọt khí, đập xong phải tránh di chuyển làm xô lệch lá kính mỏng.

Cũng có thể tiến hành theo phương pháp sau đây: đổ môi trường vào một hộp Petri, đợi nguội 60°C , dùng panh lấy các phiến kính (lamelle) đặt nhẹ vào để sao cho có một lớp môi trường bám vào tạo thành lớp mỏng trên một mặt của phiến kính. Lấp ba phiến kính đã phủ môi trường như vậy đặt vào hộp Petri khác. Trong hộp Petri này có đựng một ít nước vô trùng và một giá thủy tinh hình chữ U (các phiến kính đặt thẳng góc so với giá thủy tinh). Cấy nấm men thành ba vết trên mỗi phiến kính. Phải cấy ba vết này cách nhau như thế nào để trên mỗi vết có thể đặt vừa một lá kính mỏng (các vết cấy song song với chiều rộng của phiến kính). Sau khi đặt lá kính một cách nhẹ nhàng và cẩn thận ta đập hộp Petri lại và nuôi cấy ở $25-30^{\circ}\text{C}$ trong 4-5 ngày. Lấy ra và quan sát các vết cấy dưới kính hiển vi.

Một vài phòng thí nghiệm làm theo cách sau: nhỏ một ít môi trường thạch nóng lên trên bề mặt phiến kính, láng đều để tạo thành một lớp thật mỏng. Sau khi khô bề mặt, cấy một hoặc 2 đường dọc theo lam. Lấy lá kính mỏng đặt lên trên mỗi đường cấy. Đặt phiến kính vào đĩa Petri và cho một ít nước vô trùng để tránh khô môi trường. Quan sát trên kính hiển vi trong vài ngày.

Với các phương pháp trên rất dễ dàng quan sát thấy việc tạo thành khuẩn ty ở một số loại nấm men.

Quan sát bào tử bắn (Ballistoconidium, Ballistospore):

Lấy 10-15ml môi trường nước chiết mạch nha, môi trường khoai tây - glucoza hay môi trường bột ngô đưa vào một đĩa Petri khi thạch đông (nhớ làm khô vô trùng mặt thạch) lấy que cấy để cấy nấm men theo hai đường vuông góc ở giữa sau đó úp ngược lên một

Các phương pháp thực nghiệm dùng để định tên nấm men

đĩa Petri khác chứa cùng môi trường nhưng không cấy nấm men. Trong đĩa Petri này chứa 1 lamelle vô trùng, để ở 20⁰C sau 3 tuần bào tử bắn sẽ tạo thành các khuẩn lạc trên đĩa Petri chứa môi trường ở phía dưới và lấy phần lamelle mang các bào tử bắn để đưa đi quan sát dưới kính hiển vi.

- Môi trường bột ngô:

Cân 60 gam bột ngô hoà vào trong 500ml nước sôi. Đun sôi tiếp 1 giờ. Lọc qua vải màn. Thêm nước cho đủ 1000ml, thêm 20g thạch. Đun cho tan thạch rồi phân vào các dụng cụ thủy tinh. Khử trùng ở nồi áp lực 120 phút trong 30 phút.

Cũng có thể phát hiện bào tử bắn theo các cách khác như sau:

Cấy các loại nấm men nghi ngờ có hình thành bào tử bắn lên môi trường thạch - mạch nha (trên đĩa Petri hay ống nghiệm thạch nghiêng). Sau mấy ngày nuôi cấy trên mặt thủy tinh đối diện với vết cấy sẽ có một hình ảnh mờ giống hệt với hình dáng vết cấy. Đó là các bào tử bắn đã bắn ra lưu lại trên phía đối diện vết cấy.

Hoặc cấy nấm men theo đường thẳng hoặc zích zắc vào đĩa Petri chứa môi trường bột ngô, để ở 20⁰C sau từng thời điểm 3, 5,7,10, 15 ngày. Úp ngược đĩa Petri lên một phiến kính sạch, để qua đêm. Quan sát bào tử bắn trên phiến kính trên kính hiển vi.

Quan sát bào tử túi (ascospore):

Một số nấm men có khả năng hình thành bào tử hữu tính gọi là bào tử túi (*ascospore* hay *asconidium*). Bào tử túi có khả năng bảo vệ nấm men chống lại với nhiều ảnh hưởng có hại của điều kiện ngoại cảnh. Thường quan sát thấy bào tử túi của nấm men trong những môi trường nuôi cấy lâu. Có thể là do việc tích lũy một số sản phẩm trao đổi chất đã kích thích quá trình tạo thành bào tử túi. Trong tế bào của mỗi loại nấm men sinh bào tử túi thường tạo thành một số lượng bào tử túi nhất định. Khi chứa bào tử túi thì tế bào được gọi là túi (asci, số ít - ascus).

Thường mỗi túi có 4 bào tử, một số loài chỉ có 1-2 bào tử, một số rất ít loài lại có tới 8 bào tử. Bào tử túi ở nấm men có hình dạng rất khác nhau, đây cũng là một đặc điểm thường dùng khi phân loại nấm men. *Saccharomyces cerevisiae* và rất nhiều loài nấm men khác có bào tử túi hình cầu hay hình trứng. *Hansenula anomala*, *Hanseniaspora* có bào tử túi hình bán cầu, phía dưới có mép như vành mũ, *Pichia membranaefaciens* có bào tử túi vô quy tắc (có thể có hình trứng, dài, tam giác, bầu dục, bán cầu...), *Hansenula saturnus* có hình bào tử túi hình quả xoài, ở giữa có một vành đai nhỏ. Bào tử túi *Schawanniomyces occidentalis* cũng có hình dạng tương tự như vậy nhưng bề mặt có gai. Một số loại nấm men lại có bào tử túi dài, có khi hình xoắn. Thường thường nấm

Các phương pháp thực nghiệm dùng để định tên nấm men

men tạo thành bào tử túi sau 5-10 ngày nuôi cấy trên môi trường thạch mạch nha. Muốn quan sát chỉ việc lấy một ít nấm men làm tiêu bản soi tươi không cần nhuộm màu. Mục đích việc quan sát bào tử túi phải trả lời ba câu hỏi sau đây:

1. Nấm men có hình thành bào tử túi hay không.
2. Bào tử túi hình thành từ các tế bào dinh dưỡng không xảy ra sự tiếp hợp trước đó hay là sau khi có sự tiếp hợp giữa hai tế bào dinh dưỡng; cũng có thể là xảy ra sau khi có sự tiếp hợp giữa tế bào mẹ và tế bào con (tế bào nảy chồi) của nó.
3. Nghiên cứu hình dạng bào tử và số lượng của bào tử túi

Cách tiến hành:

Nấm men ‘trẻ’ sau khi nuôi cấy qua đêm được đưa vào môi trường malt - cao nấm men - glucoza - pepton và để 2-3 ngày sau đó đưa chuyển vào môi trường sinh bào tử. Giữ ở 25⁰C trong 3 ngày và quan sát dưới kính hiển vi. Nếu không quan sát thấy bào tử thì lại tiếp tục giữ và quan sát từng tuần cho đến 6 tuần liền. Các môi trường hình thành bào tử có thể được sử dụng là môi trường: V-8-agar, Gorodkowa-aga, acetat-agar, malt-yeast-glucoza, pepton-agar, malt-acetat-agar. Tuy nhiên thường sử dụng các môi trường sau:

Môi trường miếng thạch cao:

Lấy hai phần bột thạch cao trộn với một phần nước làm thành bột nhão sau đó đổ vào những cái khuôn làm bằng giấy da bò hay giấy thiếc (đường kính 1-1,5cm, cao 1,5-2cm). Dùng dao làm cho nhẵn bề mặt. Sau khi thạch cao đông ta loại bỏ khuôn giấy rồi cho vào những hộp thủy tinh đặc biệt gọi là hộp Koch. Cũng có thể làm những miếng thạch cao hình tròn sau đó cho vào hộp Petri. Đổ nước ngập 2/3 chiều dày của miếng thạch cao sau đó đưa đi khử trùng (120⁰C trong 30 phút). Cấy nấm men tươi (từ thạch nghiêng mới nuôi cấy 48 giờ tuổi). Giữ 25⁰C trong vài ngày, lấy ra làm tiêu bản quan sát bào tử túi. Tsetlin (1913) đề nghị trước khi cấy nấm men sang môi trường miếng thạch cao nên chuẩn bị nấm men tươi trên môi trường có thành phần sau:

Nước cất:	100 ml
Glucoza:	5 g
KH ₂ PO ₄ :	0,2g
CaCl ₂ :	0,05g
MgSO ₄ :	0,05g

Các phương pháp thực nghiệm dùng để định tên nấm men

FeSO₄: 0,001g

(NH₄)₂SO₄: 0,5g

Môi trường miếng thạch cao cải tiến:

Cách tiến hành như trên nhưng bề mặt miếng thạch cao được làm ẩm bằng nước mạch nha loãng hoặc dung dịch có chứa 2% manitol và 0,5% KH₂PO₄.

Môi trường Gorodkova (1908)

Nước thịt: 1 g

Pepton: 1 g

NaCl: 0,5 g

Glucoza: 0,25 g

Thạch: 2 g

Nước: 100ml

Xử lý với tia tử ngoại:

Cấy nấm men lên môi trường Gorodkova (môi trường c) rồi chiếu tia tử ngoại theo thời gian khác nhau: 5, 10, 15 phút. Sau đó tiếp tục nuôi cấy và quan sát bào tử túi.

Môi trường thạch nước:

Môi trường này là môi trường nghèo chỉ có nước và thạch, không bổ sung thêm các chất dinh dưỡng khác.

Môi trường Amano (1950)

Amano đề nghị dùng phương pháp sau: Cấy truyền hai lần nấm men trên môi trường thạch thịt pepton, lấy nấm men đã nuôi cấy 24 giờ cấy sang môi trường sau đây:

Glucoza: 0,4 g

Axetat Na không ngậm nước: 1,4 g

Thạch: 20 g

Các phương pháp thực nghiệm dùng để định tên nấm men

Nước: 1000 ml

Môi trường dịch tinh bột khoai tây 0,5% (Almeida và Lacaza)

Cấy nấm men lên môi trường trên rồi nuôi cấy ở 37⁰C, sau đó quan sát bào tử túi theo từng thời điểm thích hợp.

Môi trường Kleyn:

Natri glutamat (hay asparagin, pepton, glixin): 0,25g

Glucoza: 0,062g

NaCl: 0,062g

Natri axeta: 0,5g

KH₂PO₄: 0,012 g

K₂HPO₄: 0,02g

Biotin (có thể không cần): 2±

Dịch hỗn hợp I: 1 ml

Thạch: 2 g

Nước: 100 ml

Cách pha dịch hỗn hợp I: MgSO₄ - 0,4g; CuSO₄ - 0,002g; FeSO₄ - 0,2g; MnSO₄ - 0,2g; NaCl - 0,4g; nước cất - 100ml).

Chú ý: Quan sát bào tử túi là đặc điểm quan trọng trong phân loại, tuy nhiên trong một số trường hợp khó có thể phát hiện thấy bào tử túi. Điều này có thể do các nguyên nhân sau:

- Môi trường sinh bào tử túi là không thích hợp.
- Chúng nghiên cứu là dị tản (heterothalic) hay đồng tản (homothalic).
- Bào tử túi khó phát hiện và do người làm phân loại còn thiếu kinh nghiệm.
- Nấm men nghiên cứu thuộc loại không sinh bào tử túi (anascoporogenous).

Quan sát đặc tính nuôi cấy

Để quan sát các đặc tính nuôi cấy của nấm men người ta thường cấy nấm men lên môi trường dịch thể, môi trường thạch nghiêng và môi trường thạch đĩa (hoặc dùng chai Roux). Cấy nấm men vào các ống nghiệm đựng 3ml môi trường mạch nha 10-15⁰ Baling (xem phần “Quan sát hình thái tế bào nấm men và đo kích thước”). Nuôi cấy ở 25⁰C rồi sau 24 giờ, 48 giờ, 72 giờ và 198 giờ lấy ra quan sát. Cần quan sát xem nấm men có phát triển ở bề mặt dịch thể hay không. Nếu có thì chúng tạo thành vầng phủ kín, vầng phủ không kín hay tạo thành một vòng quanh thành ống nghiệm. Nấm men có lắng xuống thì quan sát xem cặn có dạng xốp, dạng nhày hay dạng rắn chắc. Quan sát xem chất dịch vẫn trong hay đã trở nên đục. Dùng tay đập khẽ vào đáy ống xem cặn có nổi lên hay không (nếu cặn xốp thì dễ nổi lên, nếu cặn rắn chắc thì khó nổi lên). Dùng que cấy khều cặn, nếu cặn nhày thì dễ khều lên cả tầng, nếu không thì khó khều. Nếu có vầng thì cần quan sát xem bề mặt vầng như thế nào, khô hay ướt, phẳng mịn hay nhăn nheo và cũng cần quan sát xem vầng dày hay mỏng. Để quan sát sự phát triển của nấm men trên môi trường thạch nghiêng ta cấy nấm men lên trường thạch - mạch nha 12-15⁰ Baling sau đó để ở tủ ấm 25-30⁰C. Quan sát ở ngày nuôi cấy thứ 3 và thứ 14. Chú ý quan sát xem bề mặt của vết cấy là trơn nhẵn hay xù xì, ướt bóng hay khô, có nếp nhăn hay không, màu sắc thế nào, mép thẳng hay mép răng cưa v.v... Để quan sát khuẩn lạc ta đem môi trường thạch - mạch nha hoặc môi trường gelatin - mạch nha phân vào các hộp Petri hay bình Roux, bình Kolle. Dùng que cấy có đầu nhọn cấy nấm men thành một chấm ở chính giữa. Trước khi cấy cần làm khô bề mặt (lớp thạch nên đổ dày khoảng 5mm). Nuôi cấy ở 25⁰C trong 14 đến 30 ngày. Lấy ra quan sát khuẩn lạc lớn. Cần chú ý miêu tả:

- Kích thước khuẩn lạc (vẽ hình).
- Chiều dày khuẩn lạc (phải vẽ hình cắt ngang khuẩn lạc).
- Có tạo thành những vòng đồng tâm hay không?
- Có những hình tia phóng xạ hay không? (từ tâm đến giữa hay từ giữa đến mép?)
- Giữa khuẩn lạc lồi lên, lõm xuống hay phẳng?
- Bề mặt trơn, nhẵn, bóng, ướt hay xù xì, ráp, có cấu tạo nhung hay gai, có nếp nhăn hay không?
- Màu sắc khuẩn lạc.

Thí nghiệm xác định khả năng lên men các loại đường

Khả năng lên men các loại đường là một trong những chỉ tiêu quan trọng được sử dụng để phân loại nấm men. Trong thí nghiệm này người ta thường sử dụng môi trường nước chiết giá đậu hay môi trường chiết nấm men 0,5%.

- Cách làm môi trường nước chiết giá đậu: cân 200g giá đậu thêm 1000ml nước. Đun sôi 30 phút. Lọc lấy dịch trong rồi thêm nước cho đủ 1000ml.

- Cách làm môi trường nước chiết nấm men: cân 200g men bia ép (hay 100g men bia khô) thêm 1000ml nước. Hấp bằng nồi hấp áp lực trong 15 phút ở nhiệt độ 120⁰C. Lọc nóng qua nhiều lớp giấy lọc. Lại lọc nguội tới trong. Thêm nước cho đủ 1000ml. Cũng có thể dùng cao nấm men với nồng độ sử dụng là 0,5%.

Cách tiến hành:

- Sử dụng ống nghiệm có kích thước 180 x16 mm. Đặt ngược một ống Durham (50x6mm) (miệng của ống Durham chạm đáy ống nghiệm).

- Phân 10-15ml môi trường cơ sở (0,5% cao nấm men) và chứa từng nguồn đường khác nhau, ở nồng độ 50mM (tương đương 1%) riêng với rafinoza 100mM (tương đương 2%). Riêng ống kiểm tra là không có một nguồn đường nào. ống đối chứng là D-glucoza. Các ống nghiệm chứa môi trường được khử trùng sau đó cấy vào 100 μ l (khoảng 2 giọt) dung dịch huyền phù nấm men có mật độ 10⁷ tế bào/ml, để 25⁰C sau một tuần.

- Quan sát việc tạo CO₂ ở đáy ống Durham để biết nấm men có hay không có khả năng lên men từng nguồn đường. Có nấm men chỉ có thể phát triển ở bề mặt dịch huyền phù và chúng có khả năng đồng hoá các nguồn đường này.

- Chú ý: Theo phương pháp này một số trường hợp CO₂ tạo ra thấp phải xác định bằng điện cực CO₂ hay dùng áp kế Warburg. Trong điều kiện có quá ít lượng đường dùng làm thí nghiệm còn có thể hút môi trường chứa đường (và cấy nấm men) vào những micropipet (hút đến 1/10ml). Đầu pipet sau đó được gắn bằng vaselin (đã trộn thêm với một ít parafin). Nuôi cấy ở 25-30⁰C và hằng ngày quan sát xem có bọt khí sinh ra hay không, mức môi trường bị đẩy ra xa nhiều hay ít. Các thí nghiệm được tiến hành đầu tiên bằng glucoza. Nếu nấm men có khả năng lên men glucoza thì hãy làm tiếp thí nghiệm với các loại đường khác. Mỗi ngày quan sát kết quả lên men một lần, quan sát trong 10 ngày liền.

Các phương pháp thực nghiệm dùng để định tên nấm men

Thí nghiệm xác định khả năng đồng hoá các hợp chất carbon khác nhau:

Đây là đặc điểm sinh lý quan trọng dùng trong phân loại. Có 2 phương pháp chủ yếu được dùng là phương pháp đánh giá khả năng sinh trưởng trên môi trường dịch thể và môi trường đặc. Tuy nhiên còn có thể sử dụng phương pháp dùng con dấu trên môi trường đặc.

Phương pháp đánh giá khả năng sinh trưởng trên môi trường dịch thể:

- Sử dụng ống nghiệm có kích thước 100x15mm. Các ống nghiệm chứa 1,8 ml môi trường nitơ cơ sở (Nitrogen base) không có carbon và 0,2 ml nguồn carbon 10X. Các ống thí nghiệm chứa 1% nguồn carbon nghiên cứu khác nhau (tương đương 50mM), đồng thời làm một ống nghiệm kiểm tra âm (không có nguồn carbon nào) và một ống kiểm tra dương dùng nguồn carbon là D-glucoza.

- 46 nguồn carbon gồm: glucoza, galactoza, L-sorboza, sucroza, maltoza, xenlobioza, trelaloza, lactoza, melibioza, raffinosa, meleziotoza, inulin, tinh bột tan, D-xyloza, L-arabinoza, D-arabinoza, D-riboza, L-rhamnoza, D-glucosamin, N-acetyl-D-glucosamin, methanol, ethanol, glycerol, erythritol, ribitol, galactitol, D-mannitol, D-glucitol, α -metyl-D-glucosid, salicin, glucono-d-lacton, D-gluconat, 2-ketogluconat, 5-ketogluconat, DL-lactat, succinat, citrat, inositol, hexandecan, saccharat, xylitol, L-arabinitol, propan 1,2 diol, butan 2,3 diol, D-glucuronic acid, D-galacturonic acid.

- Giống gốc được chuẩn bị trên môi trường thạch - pepton - glucoza - cao men - malt để qua đêm. Sau đó tế bào được lấy ra và pha trong môi trường nitơ cơ sở đạt tới mật độ tế bào là 25×10^6 /ml (hay mật độ $A_{640} = 1,0$).

- Sau đó lấy ra 100 μ l

cấy vào các ống môi trường đã chuẩn bị sẵn, sau đó để tĩnh hay lắc tay từng lúc (hàng ngày). Cũng có thể lắc nghiêng bằng máy lắc ngang (góc lệch 15-40⁰) hay lắc tròn với các nấm men có độ lắng cao.

Đánh giá sự sinh trưởng thường là dùng mắt so với hai ống dương và âm bằng cách đặt một miếng bìa trắng vạch một đường đen và đặt đằng sau các ống nghiệm để so sánh. Tuy nhiên có thể dùng phương pháp so màu để so sánh với các đường chuẩn được vẽ từ sinh khối khô (cách này thường ít được dùng với các tế bào nấm men có các tế bào kết dính với nhau). Thí nghiệm có thể kéo dài trong một tuần hoặc có thể đến 4 tuần.

Sinh trưởng trên môi trường thạch

ống nghiệm có chứa 15ml môi trường thạch nitơ cơ sở ở 45⁰C sau đó thêm 0,5 ml dịch huyền phù tế bào nấm men được chuẩn bị như đã mô tả ở trên và lắc cho đều (tránh

Các phương pháp thực nghiệm dùng để định tên nấm men

tạo bọt). Các bước phải thao tác nhanh để thạch không bị đông và nấm men không bị chết. Sau đó đổ toàn bộ ra đĩa Petri vô trùng để 37°C sau 30 phút cho đông thạch. Có thể sau đó úp ngược để 37°C trong 90 phút để khô mặt thạch. Sau đó đặt từ 2-5mg từng loại đường (nguồn carbon) nghiên cứu lên trên bề mặt thạch gần mép đĩa Petri. Thông thường trong một đĩa dùng 3 loại đường khác nhau như: Đĩa thạch được chia làm 4 góc, 1 góc không cho nguồn carbon nào (tuy nhiên phải làm thí nghiệm kiểm tra cả với D-glucoza). Theo dõi kết quả sau 48 giờ đến 1 tuần.

Phương pháp dùng con dấu

Đĩa Petri gốc chứa môi trường malt - cao men - glucoza - pepton - thạch chứa khoảng 25 khuẩn lạc nấm men nghiên cứu khác nhau. Sau đó dùng con dấu nhôm vô trùng in lên các đĩa thạch có nguồn carbon khác nhau (0,5% = 25 mM) (chú ý đánh dấu vị trí của các đĩa để khỏi bị nhầm lẫn). Một lần in từ đĩa gốc có thể in lên 10 đĩa khác nhau bắt đầu là đĩa đối chứng âm (không chứa nguồn carbon nào) và cuối cùng là đĩa đối chứng dương (chứa D-glucoza).

Chú ý thạch sử dụng phải là loại thạch tốt không chứa một thành phần carbon dễ bị đồng hoá nào. Theo dõi thí nghiệm từ 48 giờ đến 1 tuần.

Thí nghiệm xác định khả năng đồng hoá các nguồn nitơ

Có khoảng 1/4 các chủng nấm men có khả năng sử dụng nitrat vì vậy đây là đặc điểm cần cho phân loại. Tuy nhiên các thành phần khác nhau như nitrite, ethylamine, L-lysine, sunfat amôn, cadaverine cũng cần cho các thí nghiệm phân loại. Phương pháp tiến hành thí nghiệm ở đây tương tự như các nghiên cứu với việc sử dụng các hợp chất carbon ở trên với cả môi trường dịch thể và môi trường đặc nhưng ở đây dùng môi trường carbon cơ sở (carbon base) và phải nuôi nấm men trên môi trường carbon cơ sở trong 2 ngày trước khi cấy vào các nguồn nitơ.

Do nitrit độc cho nấm men và nó dễ được hình thành trong môi trường acid do đó pH môi trường phải được điều chỉnh đến 6,5. Dùng phương pháp đánh giá sự sinh trưởng là phù hợp cho việc nghiên cứu khả năng sử dụng nitrit và ethylamin. Trong đó lượng nitrogen được dùng nên là 2-5mM (0,05-0,1%). Tuy nhiên có thể quan sát thấy sự sinh trưởng ở mức độ thấp ở các ống kiểm tra (không có nitơ) do lượng NH_3 ở khí quyển hoà tan vào môi trường.

Các phương pháp thực nghiệm dùng để định tên nấm men

Thí nghiệm xác định khả năng hình thành hợp chất loại tinh bột:

- Chuẩn bị dịch Lugol như sau:

5g I₂ và 10g KI được pha trong 100ml nước cất. Pha loãng 5 lần trước khi dùng.

Lodder và Kreger - van Rij đã sử dụng thí nghiệm này để phân biệt hai giống nấm men *Torulopsis* (không hình thành hợp chất loại tinh bột) và *Cryptococcus* (hình thành hợp chất loại tinh bột).

Môi trường :

(NH ₄) ₂ SO ₄ :	1 g
KH ₂ PO ₄ :	1 g
MgSO ₄ .7H ₂ O:	0,5 g
Glucosa:	10 g
Thạch:	25 g
Nước cất:	1000 ml
pH :	4,5

Khử trùng môi trường ở nhiệt độ 110⁰C (trong 15 phút) sau đó phân phối vào các hộp Petri. Trong mỗi hộp Petri đã cho sẵn một giọt hỗn dịch vitamin hoặc dịch tự phân nấm men vô trùng. Cây nấm men và nuôi cấy 25⁰C trong 1-2 tuần. Sau đó dùng thuốc thử Lugol để kiểm tra xem có hình thành hợp chất loại tinh bột hay không. Nếu có thì vết cấy sẽ xuất hiện màu xanh.

Phương Tâm Phương (Trung Quốc) đề nghị sử dụng môi trường dịch thể sau đây:

(NH ₄) ₂ SO ₄ :	5 g
KH ₂ PO ₄ :	1 g
MgSO ₄ .7H ₂ O:	0,5 g
CaCl ₂ .2H ₂ O:	0,1 g
NaCl:	0,1 g

Các phương pháp thực nghiệm dùng để định tên nấm men

Cao nấm men:	1 g
Glucosa:	30 g
Nước:	1000 g

Phân vào các bình tam giác một lớp môi trường cao khoảng 0,5cm rồi khử trùng. Cấy nấm men và nuôi cấy ở 25-30⁰C trong ba tuần, sau đó dùng thuốc thử Lugol để kiểm tra khả năng sinh tinh bột.

Thí nghiệm xác định nhu cầu vitamin cho sinh trưởng của nấm men:

Các nấm men khác nhau có nhu cầu khác nhau về vitamin để sinh trưởng. Các thí nghiệm ở đây nhằm kiểm tra sự sinh trưởng của chủng nấm men vắng mặt tất cả hay từng loại vitamin khác nhau.

Cách tiến hành như sau:

Thí nghiệm được tiến hành trên môi trường dịch thể. Môi trường có đầy đủ các thành phần dinh dưỡng trừ vitamin (môi trường không chứa nguồn vitamin nào). Toàn bộ ống nghiệm thí nghiệm được chia thành hai lô. Một lô không có mặt bất kỳ một loại vitamin nào và một lô thiếu từng vitamin lần lượt theo thứ tự dưới đây (lượng vitamin cho 1 lít môi trường).

Acid para-amino benzoic acid:	200 mg
Biotin:	20 mg
Acid folic:	2 mg
Myo - inositol:	10 mg
Acid nicotinic:	400 mg
Pantotenat (Ca):	2 mg
Pyridoxin (HCl):	400 mg
Riboflavin:	200 mg
Tiamin HCl:	400 mg

Các phương pháp thực nghiệm dùng để định tên nấm men

Myo - inositol cũng được dùng cho sinh trưởng hiếu khí như là nguồn carbon).

Đánh giá sự sinh trưởng trên môi trường có nồng độ đường cao

Một số nấm men có khả năng sinh trưởng trên môi trường có nồng độ đường cao so với các chủng khác.

Thí nghiệm được tiến hành như sau: ống thạch nghiêng được chuẩn bị với cao nấm men và thạch có lượng đường D-glucoza đạt 50% (W/W). Sau đó giống nấm men được cấy vào và kiểm tra sự sinh trưởng ở 25⁰C trong 4 tuần. Chú ý tránh cho môi trường bị khô bằng cách bọc bằng giấy nến (wax-paper).

Đánh giá sự phát triển khi có mặt Cycloheximit

Thí nghiệm tiến hành trong môi trường có cao nấm men, nguồn nitơ và D-glucoza nhằm đánh giá khả năng sử dụng D-glucoza khi bổ sung cycloheximit (đã được lọc vô trùng) với nồng độ 0,1% hay 0,01%.

Cycloheximit ức chế sự sinh trưởng của Eukaryota bằng các ức chế quá trình sinh tổng hợp protein ở ribosom loại 80S. Các nấm men có khả năng chống lại được cycloheximit có thể đã có thay đổi về loại ribosom này.

Xác định hoạt tính phân giải Urea (hay hoạt tính Ureaza)

Môi trường Christensen:

pepton : 1g

NaCl: 5g

KH₂PO₄ : 2g

glucoza : 5g

thạch: 20g

nước: 1000ml

Các phương pháp thực nghiệm dùng để định tên nấm men

Đun tan môi trường, thêm 6ml dung dịch đỏ phenol (phenol red) có nồng độ 0,2% trong cồn. Khử trùng môi trường ở nồi hấp (115⁰C/15 phút). Đợi nguội đến 50⁰C thêm 100ml dung dịch urea (dung dịch 20% khử trùng riêng qua màng lọc). Phân vào ống nghiệm thủy tinh vô trùng, làm thạch nghiêng. Sau đó cấy nấm men và giữ ở 26⁰C trong 7 ngày. Nếu nấm men có khả năng sinh ureaza để phân giải urea thì môi trường sẽ chuyển màu đỏ xẫm. Cũng có thể tiến hành thí nghiệm với môi trường dịch thể.

Thí nghiệm làm đổi màu Diazonium blue B (DBB test)

Một ống giống được cấy trên môi trường pep ton - cao men - glucoza - malt - thạch 10 ngày tuổi và giữ ở 5⁰C trong vòng vài giờ. Sau khi đổ dung dịch DBB lạnh (ice - cold) lên trên. Nếu môi trường chuyển sang màu đỏ sẫm trong 2 phút ở nhiệt độ phòng, kết quả được coi là dương tính.

Dung dịch DBB được giữ trong lạnh băng (ice - cold) và được dùng trong ít phút trước khi nó mất màu. Chuẩn bị dung dịch này bằng cách hoà tan muối DBB (Brentamine Blue B của hãng ICI Ltd., hay Hoechst AG) trong đệm Tris HCl 0,1M, trong lạnh, pH = 7,0; nồng độ 1mg/ml.

Các môi trường thí nghiệm chưa được ghi ở phần trên

Môi trường Acetat (g/l) (M.C. Clary et al., 1959)

Acetat natri:	9,80
D-Glucoza:	1,00
NaCl:	1,20
MgSO ₄ .7H ₂ O:	0,70
Cao nấm men:	2,50
Thạch:	20
Khử trùng:	120 ⁰ C/15 phút

Môi trường thạch Gorodkova (Dodder và Kreger - van Rij, 1952) (g/l)

D-glucoza:	1,0
------------	-----

Các phương pháp thực nghiệm dùng để định tên nấm men

Pepton:	10,0
NaCl:	5,0
Thạch:	20,0
Khử trùng:	120 ⁰ C/15 phút

Môi trường cao ngô (Lodder và Kreger - van Rij, 1952)

Hoà tan 12,5g cao ngô maize extract) vào 300ml nước ở 60⁰C sau 1 giờ và lọc thu lấy dịch trong. Lượng dịch thu được thêm nước đến đủ 300ml. Thêm vào 3,8g thạch và khử trùng 120⁰C/15 phút (Môi trường này được sản xuất và bán rộng rãi).

Môi trường thạch V-8 (Wicketam và cộng sự, 1946)

Đây là môi trường được chuẩn bị từ hỗn dịch chiết của một số loại rau và men bánh mì. Bình A chứa 14g thạch và 340 ml nước. Bình B chứa 350 ml dịch chứa V-8 (sản xuất từ công ty Campbeoo soup, Camden, N.J. USA) được trộn đều với 5g men ép đã được làm tan trong 10ml nước.

Bình B được đun sôi trong 10 phút và để nguội, điều chỉnh pH đến pH = 6,8 tại 20⁰C. Bình A được làm tan thạch và trộn đều với bình B và phân vào các ống nghiệm khử trùng ở 120⁰C trong 15 phút.

Môi trường pepton - cao men - glucoza (Vander Walt và Codder, 1970)

Môi trường dịch thể được chuẩn bị từ 5g- cao nấm men, 20g- D-glucoza, 10g- pepton trong 1000ml nước. Không cần điều chỉnh pH, thanh trùng ở 120⁰C trong 15 phút.

Thành phần môi trường tổng hợp (tinh khiết về thành phần hoá học)

(Wikerlam và Duta, 1948; Wikerlam, 1951; Barnett và Ingram, 1955; Difco manual of Dehydrated culture media and Keagents).

Nguồn nito:

(NH ₄) ₂ SO ₄ :	3,5 g
L-Asparagin:	1,5g

Nguồn carbon

Các phương pháp thực nghiệm dùng để định tên nấm men

D-glucoza:	10 g
Aminoacid	
L-Histidin:	10 mg
DL-Methionin:	20 mg
DL-Triptophan:	20 mg
Chất sinh trưởng	
Acid P-aminobenzoic:	200 mg
Biotin:	20 mg
Acid folic:	2 mg
Myo-inositol:	10 mg
Acid nicotinic:	400 mg
Pantotenat (Ca):	2 mg
Pyridoxin HCl:	400 mg
Riboflavin:	200mg
Tiamin HCl:	400 mg
Vi lượng	
H ₃ BO ₃ :	500 mg
CuSO ₄ .5H ₂ O:	40 mg
KI:	100 mg
FeCl ₃ .6H ₂ O:	200 mg
MnSO ₄ .4H ₂ O:	400 mg
Na ₂ MoO ₄ .H ₂ O:	200 mg

Các phương pháp thực nghiệm dùng để định tên nấm men

ZnSO₄.7H₂O: 400 mg

Muối khoáng

KH₂PO₄: 850 mg

K₂HPO₄: 150 mg

MgSO₄.7H₂O: 500 mg

NaCl: 100 mg

CaCl₂.6H₂O: 100mg

Môi trường quan sát hình thái tế bào nấm men:

Cũng có thể dùng môi trường 6 nhưng thêm 2% thạch (W/W)

Môi trường nitơ cơ sở:

Như trên nhưng không có nguồn nitơ (5g (NH₄)₂SO₄), không có L-asparagin và D-glucoza.

Môi trường carbon cơ sở:

Như trên nhưng không có nguồn nitơ, thêm 1mg L-Histidin, 2mg DL-metionin, 2mg DL-tryptophan.

Môi trường không có vitamin

Như trên nhưng không có 5g (NH₂)₂SO₄, L-asparagin và các chất sinh trưởng.