

TCVN

TIÊU CHUẨN QUỐC GIA

TCVN 9298:2014

Xuất bản lần 1

**VI SINH VẬT – BẢO QUẢN DÀI HẠN VI SINH VẬT DÙNG
TRONG NÔNG NGHIỆP – PHƯƠNG PHÁP ĐÔNG KHÔ**

*Microorganisms – Long term preservation of microorganisms used in agriculture –
Lyophilization method*

HÀ NỘI – 2014

Lời nói đầu

TCVN 9298:2014 do Viện Thổ nhưỡng Nông hóa biên soạn , Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn đề nghị , Tổng cục Tiêu chuẩn Đo lường Chất lượng thẩm định, Bộ Khoa học và Công nghệ công bố.

Vi sinh vật – Bảo quản dài hạn vi sinh vật dùng trong nông nghiệp – Phương pháp đông khô

Microorganisms – Long term preservation of microorganisms used in agriculture – Lyophilization method

1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này áp dụng cho việc bảo quản dài hạn vi sinh vật (vi khuẩn, xạ khuẩn, nấm men, nấm sợi) dị dưỡng hiếu khí và vi hiếu khí sử dụng trong nông nghiệp (trừ vi sinh vật dùng trong lĩnh vực thú y) dưới dạng sinh dưỡng và bào tử trong điều kiện vô trùng bằng phương pháp đông khô.

2 Thuật ngữ, định nghĩa

Trong tiêu chuẩn này sử dụng các thuật ngữ và định nghĩa sau:

2.1

Mẫu giống (sample of culture)

Giống đã được chọn lọc, lai tạo, có tính di truyền ổn định và không bị tạp nhiễm.

2.2

Bảo quản dài hạn vi sinh vật (long term preservation of microorganisms)

Việc duy trì các chủng vi sinh vật thuần khiết, trong điều kiện phù hợp, bảo đảm mật độ tế bào vi sinh vật không nhỏ hơn 10^3 CFU/ml, không bị tạp nhiễm, bảo tồn hoạt tính sinh học ban đầu và thời gian bảo quản không nhỏ hơn 10 năm.

2.3

Tỷ lệ sống của vi sinh vật (survival rate of microorganisms)

Phần trăm giữa lượng tế bào hoặc bào tử tại thời điểm kiểm tra mẫu bảo quản và lượng tế bào hoặc bào tử ngay trước khi bảo quản.

2.4

Vi sinh vật tạp (contaminating microorganisms)

Vi sinh vật không đồng nhất về hình thái tế bào và khuẩn lạc so với giống vi sinh vật ban đầu.

2.5

Hoạt tính sinh học của vi sinh vật (bioactivity of microorganisms)

Khả năng của vi sinh vật thông qua hoạt động sống của chúng có tác dụng đến quá trình sinh trưởng, phát triển của cây trồng, vật nuôi, kiểm soát sinh học và sinh thái môi trường.

2.6

Môi trường nuôi cấy (cultural medium)

Môi trường thích hợp cho sự phát triển của một loài hay một nhóm vi sinh vật nào đó.

3 Môi trường nuôi cấy và thuốc thử

3.1 Môi trường nuôi cấy

3.1.1 Thành phần

Có thể sử dụng môi trường có bán sẵn trên thị trường hoặc môi trường dưới đây:

3.1.1.1 Môi trường để nuôi cấy vi khuẩn

- Môi trường YM (Yeast Mannitol)

Xem A.1 của Phụ lục A.

- Môi trường Ashby

Xem A.2 của Phụ lục A.

- Môi trường DAC

Xem A.3 của Phụ lục A.

- Môi trường Pikovskaya

Xem A.4 của Phụ lục A.

- Môi trường King B

Xem A.5 của Phụ lục A.

- Môi trường SP (Sucrose Peptone)

Xem A.6 của Phụ lục A.

- Môi trường Thối – Pepton

Xem A.7 của Phụ lục A.

3.1.1.2 Môi trường để nuôi cấy xạ khuẩn

- Môi trường Gauze

Xem A.8 của Phụ lục A.

- Môi trường ISP – 4 (Inorganic Salts Starch – 4)

Xem A.9 của Phụ lục A.

3.1.1.3 Môi trường để nuôi cấy nấm men

- Môi trường Hansen

Xem A.10 của Phụ lục A.

3.1.1.4 Môi trường để nuôi cấy nấm sợi

- Môi trường Czapeck

Xem A.11 của Phụ lục A.

- Môi trường Czapeck – Dox

Xem A.12 của Phụ lục A.

- Môi trường PD (Potato Dextrose)

Xem A.13 của Phụ lục A.

3.1.2 Cách chuẩn bị

Cân và hòa tan các thành phần môi trường trong nước cất theo thứ tự đã cho.

3.1.2.1 Môi trường thạch nghiêng

Phân phối từ 4 ml đến 6 ml môi trường (3.1.1) vào các ống nghiệm (4.2.3), đậy nút, khử trùng 30 min ở 121 °C trong nồi hấp áp lực (4.1.3), làm nguội đến 50 °C, đặt ống nghiệm nghiêng khoảng 45°, để yên cho đông đặc, đợi bề mặt thạch khô tiến hành cấy giống.

3.1.2.2 Môi trường dịch thể

Phân phối môi trường (3.1.1) vào bình tam giác (4.2.2), đậy nút bông, khử trùng 30 min ở 121 °C trong nồi hấp áp lực (4.1.3).

3.1.2.3 Môi trường thạch đĩa

Phân phối môi trường (3.1.1) vào bình tam giác (4.2.2), đậy nút bông, khử trùng 30 min ở 121 °C trong nồi hấp áp lực (4.1.3), làm nguội đến 50 °C, phân phối các lượng từ 15 ml đến 20 ml môi trường vào các đĩa Petri (4.2.4) đã chuẩn bị sẵn (4.3); tiến hành trong tủ cấy vô trùng (4.1.2).

3.2 Môi trường bảo vệ

3.2.1 Thành phần

Sữa gầy (Skim milk)	20,0 g
Meso – inositol (C ₆ H ₁₂ O ₆)	5,0 g
Nước cất vừa đủ	100 ml

3.2.2 Cách chuẩn bị

Cân và hòa tan các thành phần môi trường bảo vệ trong nước cất theo thứ tự đã cho (3.2.1). Sau đó cho vào bình tam giác (4.2.2), khử trùng ở 115 °C không quá 15 min trong nồi hấp áp lực (4.1.3).

3.3 Dung dịch pha loãng

Dung dịch pha loãng là nước muối sinh lý (NaCl 0,85 %), pH = 7, không chứa các hợp chất nitơ;

Lấy 9 ml dịch pha loãng cho vào các ống nghiệm (4.2.3) hoặc 90 ml dịch pha loãng cho vào các bình tam giác (4.2.2), đậy nút bông và khử trùng ở 121 °C không ít hơn 20 min trong nồi hấp áp lực (4.1.3).

4 Thiết bị, dụng cụ

Sử dụng các thiết bị, dụng cụ thông thường trong phòng thí nghiệm và cụ thể như sau:

4.1 Thiết bị

4.1.1 Máy đông khô, nhiệt độ đông lạnh $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$, yêu cầu bơm chân không 144 L/min, có hệ thống hàn ống tự động

4.1.2 Tủ cấy vô trùng, vận tốc dòng khí trung bình 0,79 m/s, lưu lượng khí 1204 m³/h, màng lọc ULPA với kích thước lỗ từ 0,1 μm đến 0,3 μm.

4.1.3 Nồi hấp áp lực, áp suất tối thiểu 101,3 kPa, nhiệt độ 121 °C.

4.1.4 Tủ sấy, nhiệt độ từ 40 °C đến 260 °C.

4.1.5 Tủ ẩm, nhiệt độ từ 20 °C đến 60 °C.

4.1.6 Cân kỹ thuật, có độ chính xác đến 0,01 g.

4.1.7 Máy đo pH, có dải đo pH từ 0 đến 14.

4.1.8 Máy trộn (Vortex), tốc độ 1000 r/min.

4.2 Dụng cụ

4.2.1 Ống đông khô (ampul), bằng thủy tinh trung tính.

4.2.2 Bình tam giác, dung tích 250 ml.

4.2.3 Ống nghiệm, 18 mm x 180 mm.

4.2.4 Đĩa Petri, đường kính 90 mm.

4.2.5 Que cấy.

4.2.6 Que gạt mẫu (bàn trang).

4.2.7 Pipet (Micropipet), có thể lấy các thể tích 0,1 ml và 1 ml.

4.2.8 Đèn đo chân không, có đèn UV.

4.3 Chuẩn bị dụng cụ

Dụng cụ sử dụng trong nuôi cấy, bảo quản vi sinh vật phải được rửa sạch, tiệt trùng bằng một trong các phương pháp dưới đây:

- + Khử trùng khô: Giữ ở nhiệt độ 180 °C không ít hơn 1 h trong tủ sấy (4.1.4) hoặc;
- + Khử trùng ướt: Giữ ở nhiệt độ 121 °C không ít hơn 30 min trong nồi hấp áp lực (4.1.3).

Rửa sạch ống đông khô (ampul) (4.2.1); sau đó ngâm trong dung dịch HCl 2 % trong 12 h, rửa lại bằng nước máy từ 3 lần đến 4 lần, tráng lại bằng nước cất, làm khô và chuẩn bị nút bông, khử trùng bằng cách giữ ở nhiệt độ 121 °C không ít hơn 30 min trong nồi hấp áp lực (4.1.3).

5 Cách tiến hành

5.1 Tạo sinh khối vi sinh vật

Mẫu giống (2.1) được nuôi cấy trên môi trường thạch nghiêng đã chuẩn bị sẵn (3.1.2.1), ở nhiệt độ và thời gian thích hợp (từ 28 °C đến 30 °C không ít hơn 2 ngày đối với vi khuẩn, nấm men, từ 28 °C đến 30 °C không ít hơn 3 ngày đối với nấm sợi và từ 35 °C đến 37 °C không ít hơn 5 ngày đối với xạ khuẩn) để vi sinh vật phát triển đồng đều trên vết cấy, thu sinh khối vi sinh vật để tiến hành bảo quản; tiến hành trong tủ cấy vô trùng (4.1.2).

5.2 Tạo dịch huyền phù vi sinh vật

Dịch huyền phù vi sinh vật được chuẩn bị bằng cách cho 2 ml dịch môi trường bảo vệ đã chuẩn bị sẵn (3.2.2) vào ống thạch nghiêng đã nuôi cấy vi sinh vật (5.1), sau đó dùng pipet Pasteur khuấy nhẹ tạo dịch huyền phù đồng nhất, đảm bảo mật độ tế bào vi sinh vật không nhỏ hơn 10^8 tế bào/ml.

Dùng pipet vô trùng lấy 1 ml dịch huyền phù vi sinh vật nhỏ vào đáy ống đông khô (ampul), không để dính vi sinh vật lên mép hoặc thành ống đông khô (ampul).

Tiến hành trong tủ cấy vô trùng (4.1.2).

5.3 Quá trình đông khô

Ống đông khô (5.2) được giữ ở nhiệt độ từ -40 °C đến -80 °C trong thời gian không ít hơn 6 h;

Ống đông khô được lắp vào hệ thống đông khô và quá trình làm mát nước trong điều kiện lạnh được tiến hành trong thời gian từ 3 h đến 4 h;

Tạo chỗ thất trên ống đông khô, khoảng cách chỗ thất từ 1,0 cm đến 1,5 cm;

Ống đông khô sau khi được làm thất tiếp tục được làm khô trong thời gian 3 h và áp suất không lớn hơn 6.10^{-1} mBar;

Hàn kín ống đông khô được thực hiện trực tiếp trên máy đông khô.

5.4 Chất lượng của mẫu sau đông khô

TCVN 9298:2014

- Ống đông khô có độ chân không tuyệt đối;
- Tỷ lệ sống của mẫu giống sau đông khô không ít hơn 10^6 CFU/ml;
- Không chứa vi sinh vật tạp;
- Hoạt tính sinh học của mẫu giống không thay đổi so với trước bảo quản.

5.5 Bảo quản

Mẫu được bảo quản ở $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ hoặc ở nhiệt độ phòng. Thời gian bảo quản không ít hơn 10 năm.

5.6 Kiểm tra mẫu

5.6.1 Độ chân không của mẫu

Sử dụng đèn phát hiện mức độ chân không: Đối với các mẫu đạt độ chân không cần thiết thì xuất hiện màu xanh tím nhạt, đối với các mẫu không đạt tiêu chuẩn thì không có tín hiệu hoặc màu tím đậm.

5.6.2 Tỷ lệ sống của vi sinh vật

5.6.2.1 Chuẩn bị dung dịch huyền phù vi sinh vật

Lấy mẫu bảo quản cần kiểm tra ra khỏi nhiệt độ bảo quản. Khi nhiệt độ của mẫu bảo quản bằng nhiệt độ phòng thí nghiệm, tiến hành kiểm tra mẫu.

Vô trùng bên ngoài ampul bằng gạc tẩm cồn.

Mở ống đông khô bằng cách đốt nóng đầu hàn trên đèn cồn và làm lạnh đột ngột bằng cồn đốt.

Dùng pipet vô trùng thêm 1 ml môi trường nuôi cấy dịch thể (3.1.2.2) vào ống đông khô để hydrat hóa mẫu giống. Lắc kỹ trong 5 min để đảm bảo các tế bào được phân bố đều. Dung dịch được tạo ra gọi là dịch huyền phù ban đầu.

Dùng pipet vô trùng lấy toàn bộ dịch huyền phù ban đầu (1 ml) cho vào 9 ml dung dịch pha loãng đã chuẩn bị sẵn (3.3), tránh chạm đầu pipet vào dung dịch pha loãng. Trộn kỹ bằng máy trộn Vortex (4.1.8) để dung dịch pha loãng mẫu có nồng độ pha loãng là 10^{-2} . Tiếp tục pha loãng để đạt được độ pha loãng 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} .

Tiến hành trong tủ cấy vô trùng (4.1.2).

5.6.2.2 Cấy mẫu

Dùng pipet vô trùng lấy một lượng (thường là 0,1 ml) dung dịch huyền phù vi sinh vật cấy vào đĩa Petri chứa môi trường đã chuẩn bị sẵn (3.1.2.3). Mỗi nồng độ pha loãng được cấy lặp lại không ít hơn 2 đĩa Petri. Dùng que gạt vô trùng gạt đều cho đến khi dung dịch huyền phù vi sinh vật thấm đều trên bề mặt thạch. Tiến hành trong tủ cấy vô trùng (4.1.2).

Đợi khô bề mặt thạch, úp ngược đĩa Petri, nuôi trong tủ ẩm ở nhiệt độ và thời gian thích hợp (từ $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ đến $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ không ít hơn 2 ngày đối với vi khuẩn, nấm men, từ $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ đến $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ không ít hơn 3 ngày đối với nấm sợi và từ $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ đến $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ không ít hơn 5 ngày đối với xạ khuẩn).

5.6.2.3 Tính kết quả

Đếm số lượng khuẩn lạc đặc trưng trên mỗi đĩa Petri.

Số lượng vi sinh vật trong mẫu thử được tính theo công thức (1):

$$N = \frac{\sum C}{V(n_1 + 0,1n_2)d} \times 100 \quad (1)$$

trong đó:

- N là số lượng vi sinh vật trong mẫu thử, tính bằng đơn vị hình thành khuẩn lạc trên mililit (CFU/ml);
- $\sum C$ là tổng số khuẩn lạc đặc trưng đếm được trên tất cả các đĩa Petri được giữ lại;
- V là thể tích dịch cấy trên mỗi đĩa Petri, tính bằng mililit (ml);
- n_1 là số đĩa Petri được giữ lại ở độ pha loãng thứ nhất;
- n_2 là số đĩa Petri được giữ lại ở độ pha loãng thứ hai;
- d là hệ số pha loãng tương ứng với độ pha loãng thứ nhất.

CHÚ THÍCH:

- 1) Đếm ở các đĩa Petri có chứa không quá 300 khuẩn lạc ở hai độ pha loãng kế tiếp nhau và điều cơ bản là một trong các đĩa này có chứa ít nhất 15 khuẩn lạc;
- 2) Làm tròn kết quả đến hai chữ số có nghĩa;
- 3) Biểu thị kết quả bằng số từ 1,0 đến 9,9 nhân với 10^x , trong đó x là lũy thừa tương ứng của 10.

Tỷ lệ sống của mẫu giống được tính theo công thức (2):

$$R = \frac{N_1}{N_0} \times 100 \quad (2)$$

trong đó:

- R là tỷ lệ sống của mẫu giống, tính bằng phần trăm (%);
- N_1 là số lượng vi sinh vật trong thử sau bảo quản, tính bằng đơn vị hình thành khuẩn lạc trên mililit (CFU/ml);
- N_0 là số lượng vi sinh vật trong mẫu thử trước bảo quản, tính bằng đơn vị hình thành khuẩn lạc trên mililit (CFU/ml).

5.6.3 Kiểm tra vi sinh vật tạp

5.6.3.1 Chuẩn bị dung dịch huyền phù vi sinh vật

Xem 5.6.2.1

5.6.3.2 Cấy mẫu

TCVN 9298:2014

Xem 5.6.2.2

5.6.3.3 Đọc kết quả

Quan sát các khuẩn lạc vi sinh vật mọc trên đĩa Petri (5.6.2.2), nếu thấy các khuẩn lạc không đặc trưng của mẫu giống chứng tỏ mẫu thử chứa vi sinh vật tạp.

5.6.4 Hoạt tính sinh học

Tiến hành theo những phương pháp cụ thể phụ thuộc vào đặc tính sinh học của từng mẫu giống.

Phụ lục A

(Quy định)

Thành phần môi trường nuôi cấy**A.1 Môi trường YM (Yeast Mannitol)**

Mannitol ($C_6H_8(OH)_6$)	10,0 g
Dikali hydro phosphat (K_2HPO_4)	0,5 g
Magie sulphat ngậm bảy phân tử nước ($MgSO_4.7H_2O$)	0,2 g
Natri clorua ($NaCl$)	0,1 g
Chất chiết nấm men	0,5 g
Canxi cacbonat ($CaCO_3$)	0,5 g
Dung dịch công gô đở ($C_{32}H_{22}O_6H_6S_2Na_2$) 1% *	2,5 ml
Nước cất vừa đủ	1000 ml
pH	6,8 đến 7,0

CHÚ THÍCH:

- 1) * Dung dịch công gô đở 1%: Hòa tan 1 g công gô đở trong 100 ml nước cất
- 2) Nếu môi trường thạch nghiêng hoặc thạch đĩa thì bổ sung 20,0 g thạch.

A.2 Môi trường Ashby

Mannitol ($C_6H_8(OH)_6$)	20,0g
Dikali hydro phosphat (K_2HPO_4)	0,2 g
Magie sulphat ngậm bảy phân tử nước ($MgSO_4.7H_2O$)	0,2 g
Natri clorua ($NaCl$)	0,2 g
Kali sulphat (K_2SO_4)	0,1 g
Canxi cacbonat ($CaCO_3$)	5,0 g
Nước cất vừa đủ	1000 ml
pH	6,8 đến 7,0

CHÚ THÍCH: Nếu môi trường thạch nghiêng hoặc thạch đĩa thì bổ sung 20,0 g thạch.

A.3 Môi trường DAC

Axit malic ($C_4H_6O_5$)	5,0 g
Kali dihydro phosphat (KH_2PO_4)	0,5 g
Sắt sulphat ngậm bảy phân tử nước ($FeSO_4.7H_2O$)	0,05 g
Mangan sulphat ($MnSO_4$)	0,01 g
Magie sulphat ngậm bảy phân tử nước ($MgSO_4.7H_2O$)	0,1 g
Natri clorua ($NaCl$)	0,02 g
Canxi clorua ($CaCl_2$)	0,01 g
Natri molybdat (Na_2MoO_4)	0,002 g
Dung dịch Bromotymol blue ($C_{27}H_{28}Br_2O_5S$) 5 %*	2,0 ml
Hoặc dung dịch công gô đỏ ($C_{32}H_{22}O_6H_6S_2Na_2$) 1 %**	2,5 ml
Nước cất vừa đủ	1000 ml
pH	6,8 đến 7,0

CHÚ THÍCH:

- 1) * Dung dịch Bromotymol blue 5%: Hòa tan 5 g Bromotymol blue vào 100 ml Etanol (C_2H_5OH) 20%
- 2) ** Dung dịch công gô đỏ 1%: Hòa tan 1 g công gô đỏ trong 100 ml nước cất
- 3) Nếu môi trường thạch nghiêng hoặc thạch đĩa thì bổ sung 20,0 g thạch.

A.4 Môi trường Pikovskaya

Glucosa ($C_6H_{12}O_6$)	10,0 g
Canxi (III) phosphat ($Ca_3(PO_4)_2$)	5,0 g
Amoni sulphat ($(NH_4)_2SO_4$)	0,5 g
Kali clorua (KCl)	0,2 g
Magie sulphat ngậm bảy phân tử nước ($MgSO_4.7H_2O$)	0,1 g
Mangan sulphat ($MnSO_4$)	0,001 g
Sắt sulphat ngậm bảy phân tử nước ($FeSO_4.7H_2O$)	0,001 g
Chất chiết nấm men	0,5 g
Nước cất vừa đủ	1000 ml
pH	6,8 đến 7,0

CHÚ THÍCH: Nếu môi trường thạch nghiêng hoặc thạch đĩa thì bổ sung 20,0 g thạch.

A.5 Môi trường King B

Pepton	20,0 g
Glyxerin	10,0 g
Magie sulphat ngậm bảy phân tử nước ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	1,5 g
Dikali hydro phosphat (K_2HPO_4)	1,5 g
Sắt sulphat ngậm bảy phân tử nước ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$)	0,001 g
Chất chiết nấm men	0,5 g
Nước cất vừa đủ	1000 ml
pH	7,0 đến 7,2

CHÚ THÍCH: Nếu môi trường thạch nghiêng hoặc thạch đĩa thì bổ sung 20,0 g thạch.

A.6 Môi trường SP (Sucrose Peptone)

Sacaroza ($C_{12}H_{22}O_{11}$)	20,0 g
Pepton	5,0 g
Dikali hydro phosphat (K_2HPO_4)	0,5 g
Magie sulphat ngậm bảy phân tử nước ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	0,25 g
Nước cất vừa đủ	1000 ml
pH	6,8 đến 7,0

CHÚ THÍCH: Nếu môi trường thạch nghiêng hoặc thạch đĩa thì bổ sung 20,0 g thạch.

A.7 Môi trường Thịt – Pepton

Chất chiết thịt bò	5,0 g
Pepton	10,0 g
Natri clorua ($NaCl$)	5,0 g
Nước cất vừa đủ	1000 ml
pH	6,8 đến 7,0

CHÚ THÍCH: Nếu môi trường thạch nghiêng hoặc thạch đĩa thì bổ sung 20,0 g thạch.

A.8 Môi trường Gauze

Tinh bột tan ($C_6H_{10}O_5)_n$)	20,0 g
------------------------------------	--------

TCVN 9298:2014

Kali nitrat (KNO_3)	1,0 g
Kali dihydro phosphat (KH_2PO_4)	0,5 g
Magie sulphat ngậm bảy phân tử nước ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0,5 g
Natri clorua (NaCl)	0,5 g
Sắt sulphat ngậm bảy phân tử nước ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0,01 g
Nước cất vừa đủ	1000 ml
pH	7,0 đến 7,2

CHÚ THÍCH: Nếu môi trường thạch nghiêng hoặc thạch đĩa thì bổ sung 20,0 g thạch.

A.9 Môi trường ISP- 4 (Inorganic Salts Starch – 4)

Tinh bột tan ($\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5$) _n)	10,0 g
Kali dihydro phosphat (KH_2PO_4)	1,0 g
Magie sulphat ngậm bảy phân tử nước ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	1,0 g
Natri clorua (NaCl)	1,0 g
Amoni sulphat (NH_4) ₂ SO_4	2,0 g
Canxi cacbonat (CaCO_3)	1,0 g
Nước cất vừa đủ	1000 ml
pH	7,0 đến 7,2

CHÚ THÍCH: Nếu môi trường thạch nghiêng hoặc thạch đĩa thì bổ sung 20,0 g thạch.

A.10 Môi trường Hansen

Glucosa ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$)	50,0 g
Pepton	10,0 g
Kali dihydro phosphat (KH_2PO_4)	3,0 g
Magie sulphat ngậm bảy phân tử nước ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	3,0 g
Nước cất vừa đủ	1000 ml
pH	6,8 đến 7,2

CHÚ THÍCH: Nếu môi trường thạch nghiêng hoặc thạch đĩa thì bổ sung 20,0 g thạch.

A.11 Môi trường Czapek

Sacaroza ($\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$)	30,0 g
--	--------

Natri nitrat (NaNO_3)	3,0 g
Kali dihydro phosphat (KH_2PO_4)	1,0 g
Magie sulphat ngậm bảy phân tử nước ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0,5 g
Sắt sulphat ngậm bảy phân tử nước ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0,01 g
Nước cất vừa đủ	1000 ml
pH	6,0 đến 6,5

CHÚ THÍCH:

- 1) pH môi của trường được điều chỉnh bằng axit axetic 1N;
- 2) Nếu môi trường thạch nghiêng hoặc thạch đĩa thì bổ sung 20,0 g thạch.

A.12 Môi trường Czapek – Dox

Sacaroza ($\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$)	30,0 g
Natri nitrat (NaNO_3)	2,0 g
Kali clorua (KCl)	1,0 g
Kali dihydro phosphat (KH_2PO_4)	1,0 g
Magie sulphat ngậm bảy phân tử nước ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0,5 g
Sắt sulphat ngậm bảy phân tử nước ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0,01 g
Nước cất vừa đủ	1000 ml
pH	6,0 đến 6,5

CHÚ THÍCH:

- 1) pH môi của trường được điều chỉnh bằng axit axetic 1N;
- 2) Nếu môi trường thạch nghiêng hoặc thạch đĩa thì bổ sung 20,0 g thạch.

A.13 Môi trường PD (Potato Dextrose)

Dextroza ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$)	20,0 g
Khoai tây*	200,0 g
Nước cất vừa đủ	1000 ml
pH	6,0 đến 6,5

CHÚ THÍCH:

- 1) Khoai tây thái nhỏ, cho vào 1 lit nước và đun sôi trong 20 min; sau đó lọc lấy nước trong để sử dụng làm môi trường;
- 2) pH môi của trường được điều chỉnh bằng axit axetic 1N;
- 3) Nếu môi trường thạch nghiêng hoặc thạch đĩa thì bổ sung 20,0 g thạch.

Thư mục tài liệu tham khảo

- [1] 10 TCN 349:99. Bảo quản dài hạn nguồn gen vi sinh vật nông nghiệp bằng phương pháp đông khô.
-