nước khác như bông, băng, vải...; còn cao su và môi trường nuôi cấy không được dùng tủ sấy khô để tiêu độc.

Nguyên lí cấu tạo của tủ sấy khô cũng gần giống như tủ ấm, chỉ khác là nhiệt độ khi sử dụng tương đối cao, tủ sấy khô có thể dùng nguồn nhiệt là điện, than, hoặc hơi đốt.

# 1.2.2. Cách sử dụng tủ sấy khô

Các dụng cụ phải rửa sạch, để khô, bao gói cẩn thận trước khi cho vào tủ; sau khi sắp xếp xong các thứ vào trong tủ, đóng kín cửa. Đóng mạch điện hoặc đốt nhiên liệu, nhiệt độ trong tủ sẽ từ từ lên cao, chú ý theo dõi nhiệt kế cắm trên tủ, khi nhiệt độ đạt tới mức yêu cầu 170°C - 180°C thì điều chỉnh việc cung cấp nguồn nhiệt để duy trì nhiệt độ này trong 30 phút. Sau đó cắt mạch điện hay cắt nguồn nhiệt, chờ nhiệt độ hạ dần xuống 50 - 60°C (về mùa hè) và 30 - 40°C về mùa đông thì mới được mở cửa tủ để lấy đồ sấy ra. Dụng cụ sấy lấy ra phải để trên giá gỗ, trên giấy hoặc vải, không được để ở trên nền gạch men, trên sàn gạch hoặc sàn xi măng, vì dụng cụ đang nóng gặp lạnh sẽ dễ vỡ.

# 1.3. Nổi hấp hơi nước cao áp

# 1.3.1. Nguyên lí

- Nồi hấp hơi nước cao áp (autoclave) làm bằng thứ kim loại chịu được nhiệt độ cao (ít nhất là 135°C), có thể dùng điện, dùng củi hoặc dùng than đun cho nước sôi, hơi nước sẽ nén dần lại ở trong nồi và nếu tiếp tục để cho nước sôi thì áp lực trong nồi sẽ tăng dần, áp lực càng tăng thì nhiệt độ của hơi nước trong nồi càng cao, như vậy giữa nhiệt độ của hơi nước và áp lực P của nó có liên quan với nhau, nhưng không phải theo một tỉ lệ đường thẳng.

Khi áp lực kế chỉ số 0 có nghĩa là : áp lực P trong nồi hấp = áp lực P không khí.

BẢNG 1.1. SO SÁNH MỐI LIÊN QUAN GIỮA ÁP LỰC GHI TRÊN ÁP KẾ CỦA NỔI HẤP BIỂU THỊ BẰNG ATMOSPHERE VÀ NHIỆT ĐỘ TRONG NỔI ĐÃ LOẠI HẾT KHÔNG KHÍ

Áp lực (atm)	Nhiệt độ (°C)	Áp lực (atm)	Nhiệt độ (°C)	Áp lực (atm)	Nhiệt độ (°C)	Áp lực (atm)	Nhiệt độ (°C)
0,0	100,0	0,5	112,5	1,0	121,0	1,5	127,0
0,1	102,5	0,6	114,5	1,1	129,9	1,6	128,0
0,2	105,0	0,7	116,	1,2	124,0	1,7	129,0
0,3	107,5	0,8	117,0	1,3	125,0	1,8	130,0
0,4	110,0	0,9	119,0	1,4	126,0	1,9	131,0

- Để loại bỏ hết không khí trong nồi ra có 2 cách :
- + Đóng khóa thoát hơi để tăng áp lực trong nồi lên đến khoảng 0,3atm rồi xì cho thoát hết hơi ra, sau đó khóa lại và cho tăng áp lực.
- + Mở khóa thoát hơi và đun cho đến khi hơi nước bắt đầu thoát ra thành một luồng hơi trắng khá mạnh, khá đều thì đóng lại và cho tăng áp lực.

# 1.3.2. Cách sử dụng nổi hấp cao áp

- Đổ nước vào nổi hấp với lượng vừa đủ (xem ở vạch ngang ghi trên một ống thủy tinh lắp bên ngoài nổi hấp).
- Các dụng cụ đem hấp phải được bao gói kĩ, đối với các bình và ống môi trường có nút bông phải bọc bằng giấy dầu để tránh hơi nước đọng làm ướt nút.
- Khi sắp xếp dụng cụ vào nồi hấp không nên để sát nhau quá, để vật năng xuống dưới, vật nhẹ lên trên.
- Đậy nắp, khóa chặt các ốc theo từng đôi đối xứng nhau để khỏi vênh, khỏi hở, khi tháo khóa cũng phải làm như vậy.
- Mở mạch điện hoặc đốt nhiên liệu để đun sôi nước trong nồi, trong khi hấp phải luôn luôn có mặt để theo dõi kim chỉ áp lực trên đồng hồ áp lực kế. Loại hết không khí trong nồi theo 2 phương pháp đã nêu trên. Khi đạt tới mức cần thiết thì xoay núm điện hoặc điều chỉnh nguồn nhiệt để duy trì áp lực không đổi trong một khoảng thời gian cần thiết (người ta thường sử dụng áp lực latm và giữ trong khoảng 20 phút thì nha bào của một số loại vi khuẩn cũng sẽ bị tiêu diệt).
- Khi đạt tới thời gian cần thiết thì ngắt điện hoặc rút hết nhiên liệu ra và đợi cho áp lực hạ dần xuống 0, nhiệt độ trong nồi giảm hẳn rồi mới được mở nắp lấy dụng cụ đã khử trùng ra. Chú ý tránh hạ áp lực đột ngột bằng cách mở van xì hơi ra quá mạnh sẽ làm rạn nứt hoặc vỡ dụng cụ. Cũng không nên để nồi hấp nguội lạnh mới lấy dụng cụ ra, vì lúc này nắp nồi sẽ mút chặt vào miếng đệm cao su, rất khó mở.
- Các dụng cụ lấy ra không được để ở nền gạch men, nền đá, nền xi măng (vì dụng cụ đang nóng gặp lạnh sẽ vỡ, nứt).

# 1.4. Những thiết bị cần thiết khác

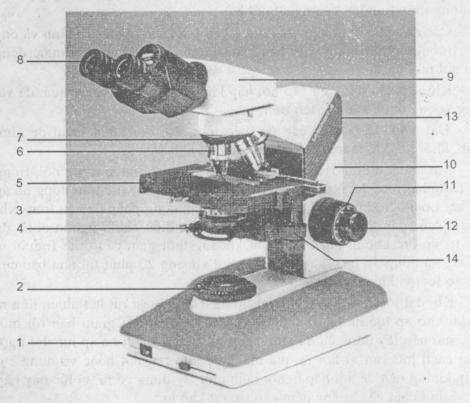
- Máy hút chân không.
- Máy đếm khuẩn lạc.
- Máy đo pH hay hộp đo pH.
- Nổi cất nước.
- Máy đánh tế bào.
- Máy đếm tế bào,

14 - GTVSVHCN 209

- Máy lắc.
- Phòng hoặc buồng vô trùng.
  - Tu lanh. The ode of the selection of the land of the
- am Máy li tâm.

# II - SỬ DỤNG KÍNH HIỂN VI ĐỂ QUAN SÁT HÌNH THÁI VSV

Kính hiển vi quang học gồm có 2 bộ phận chính sau đây:



1. Đế kính; 2. Đèn chiếu; 3. Bộ tụ quang kính; 4. Vòng bảo hiểm; 5. Khay kính; 6. Vật kính; 7. Bàn xoay; 8. Thị kính; 9. Ống kính; 10. Thân kính; 11. Ốc sơ cấp; 12. Ốc vi cấp; 13. Công tắc; 14. Bộ phận điều chỉnh khay kính

#### 2.1. Bộ phận cơ

#### 2.1.1. Chân kính hay để kính

Dùng để đỡ kính hiển vi, nó là chỗ dựa vững chắc cho kính.

#### 2.1.2. Thân kính

Nối liền với chân kính bằng một bản lề, đó là một bộ phận có hình cong đỡ thân kính, ở trụ kính có ốc điều chỉnh lớn (ốc vĩ cấp).

# 2.1.3. Őng kính

Là một ống kim khí rỗng hình trụ lắp trên trụ kính, đầu trên của ống kính lắp thị kính, phía dưới của ống kính là một bàn xoay có lỗ dùng để lắp các vật kính.

# 2.1.4. Khay kinh hay đĩa kinh

Có thể hình vuông hay hình tròn, là nơi đặt phiến kính để xem, ở giữa có lỗ hổng để ánh sáng có thể chiếu vào phiến kính, trên khay kính có hai cái kẹp phiến kính cho vững, hoặc có thêm một bộ phận gọi là xa để di chuyển tiêu bản theo hai chiều khác nhau, từ trái sang phải, từ trước ra sau và ngược lại. Ngoài ra khay kính còn có thể di chuyển theo các chiều bằng cách vặn hai ốc ở hai bên khay kính.

#### 2.1.5. Ốc điều chỉnh

Gồm có ốc điều chỉnh lớn (ốc vĩ cấp) và ốc điều chỉnh nhỏ (ốc vi cấp). Ốc vĩ cấp dùng để điều chỉnh tiêu điểm, ốc vi cấp khi vặn thì làm di chuyển cả ống kính và trụ kính làm cho ống kính di chuyển hết sức chậm, đầu ốc có khắc, mỗi khắc tương đương với sự di chuyển là 1/100mm.

# 2.2. Bộ phận quang kính

#### 2.2.1. Gương phản chiếu

Đặt ở phía dưới khay kính gồm có hai mặt, một mặt phẳng và một mặt lõm, dùng để lấy ánh sáng.

# 2.2.2. Tụ quang kính

Được lắp vào phía dưới khay kính bởi một ốc cố định, dùng để tập trung ánh sáng vào tiêu bản.

#### 2.2.3. Bộ phận chắn sáng

Có hình giống như con ngươi đặt ở phía dưới tụ quang kính, có thể mở rộng hay hẹp, dùng để điều hòa ánh sáng vào tiêu bản.

#### 2.2.4. Vật kính

Là một hệ thống quang học rất quan trọng và phức tạp, gồm một số thấu kính, nó trực tiếp phóng đại ảnh thật của tiêu bản (ảnh của vật xem), khả năng phóng đại của vật kính phụ thuộc vào tiêu cự tức là phụ thuộc vào bán kính cong của thấu kính; thấu kính càng cong, tiêu cự càng ngắn thì khả năng phóng đại càng lớn. Vật kính khi dùng được lắp vào bàn quay ở phía dưới ống kính. Có hai loại vật kính:

- Vật kính khô: là vật kính có số bội giác thấp  $\times$  8;  $\times$  20;  $\times$  40 dùng để xem tươi, xem vi khuẩn di động, xem khuẩn lạc, hay xem kí sinh trùng, hoặc xem các tiêu bản tổ chức v.v...

- Vật kính dầu : là vật kính có số bội giác cao  $\times$  90 ;  $\times$  100 ;  $\times$  120 v.v... nó có một vòng đen ở đầu vật kính để phân biệt với vật kính khô.

Vật kính khô và vật kính dầu khác nhau ở chất mà ánh sáng phải đi qua tiêu bản (phiến kính) và vật kính. Ở vật kính khô chất đi qua là không khí mà chỉ số khúc xạ (chiết suất) của không khí là n = 1 rất khác với chỉ số khúc xạ của thủy tinh n = 1,52, do đó các tìa sáng khi ra khỏi tiêu bản sẽ bị phản xạ và phần ngoài của chùm ánh sáng không lọt được vào vật kính.

#### 2.2.5. Thi kính

Thị kính có độ phóng đại càng cao thì khoảng cách giữa hai thấu kính càng ngắn (tiêu cự của thị kính càng ngắn) và ngược lại. Thị kính thường có  $4 \text{ số}: \times 5 : \times 7 : \times 10 : \times 15$ .

Muốn biết độ phóng đại của vật quan sát (độ phóng đại của kính hiển vi), người ta nhân độ phóng đại của vật kính với độ phóng đại của thị kính. Ví dụ dùng vật kính dầu  $\times$  90 và thị kính  $\times$  15 thì độ phóng đại của vật quan sát, hay độ phóng đại của kính hiển vi sẽ là :  $90 \times 15 = 1350$  lần.

# 2.3. Cách sử dụng kính hiển vi

#### 2.3.1. Kiểm tra kính hiển vi

Đặt kính vào vị trí làm việc, cắm điện, đặt kính trên bàn cho ngay ngắn, ở tư thế có lợi nhất cho người quan sát. Khi quan sát tiêu bản, cần sử dụng cả 2 mắt, mắt trái dùng quan sát, mắt phải dùng để ghi chép hoặc vẽ, không nên nheo một mắt lại để xem, vì như thế rất dễ mỏi mệt và đau đầu. Cần luyên tập để có thể xem được cả hai mắt.

# 2.3.2. Quan sát tiêu bản bằng vật kính khô

Không dùng tụ quang kính và bộ phận chắn sóng, nhất là đối với vật kính có số bội giác thấp (38), khi nguồn sáng hẹp thì dùng gương phẳng với vật kính số bội giác thấp, dùng gương lõm với vật kính có bội số giác cao (340), khi nguồn sáng rộng thì dùng gương nào cũng được. Hạ thấp tột cùng tụ quang kính và ít mở bộ phận chắn sáng.

#### 2.3.3. Quan sát tiêu bản nhuộm với vật kính dầu

Sau khi đã điều chỉnh tiêu điểm với vật kính số bội giác thấp thì quay vật kính thấp ra, nhỏ một giọt dầu bạch hương vào tiêu bản, nhỏ vào chỗ cần xem, không để lan rộng ra, xoay vật kính dầu vào, và vặn vật kính dầu sát xuống tiêu bản đè lên giọt dầu, chú ý mắt nhìn ngoài để đừng vặn sát quá sẽ đè vỡ phiến kính, đến khi thấy chớp, tức là ảnh đã trông thấy nhưng chưa thấy rỗ, lúc này sử dụng ốc vi cấp cho đến khi trông rỗ ảnh trong thị trường.

# 2.4. Cách bảo quản kính hiển vi

- Không được sờ tay vào đầu vật kính và thị kính, nếu bẩn có thể dùng vải mềm hoặc giấy lau kính để lau. Vật kính dầu dùng xong, lấy vải mềm mịn hay giấy lau sạch dầu bạch hương ở đầu vật kính, sau đó tẩm xylon vào vải mềm mịn hay giấy lau cho hết dầu (xylon có tác dụng làm tan dầu bạch hương). Cuối cùng lau lại một lần nữa bằng vải mềm, mịn hay giấy mềm.
- Khi dùng xong phải xoay các bộ phận của kính về đúng chỗ quy định, không được để vật kính nằm trong trục kính như lúc quan sát mà phải xoay vật kính ra hai bên và vặn cho áp sát xuống đĩa kính, tụ quang hạ thấp xuống, gương phản chiếu xoay dọc thân kính. Toàn bộ kính đều coi như ở trạng thái nghỉ.

# *Bài 2* PHƯƠNG PHÁP CỐ ĐỊNH TIÊU BẢN VÀ NHUỘM TẾ BÀO VI SINH VẬT

# I - MỤC ĐÍCH CỦA CỐ ĐỊNH TIÊU BẢN VÀ NHUỘM TẾ BÀO VI SINH VẬT

Tế bào VSV gần như là không màu, do đó quan sát bằng phương pháp xem trực tiếp rất khó, vì vậy cần phải làm tiêu bản rồi đem nhuộm màu. Nhuộm VSV có 4 mục đích:

- Để nghiên cứu hình thái, cấu tạo đặc biệt của VSV như giáp mô, nha bào.
- Để phân loại VSV căn cứ vào tính chất bắt màu gram, tính chất kháng cồn, kháng toan.
- Để dễ có thể phân biệt và quan sát được các vi cấu tạo trong tế bào VSV.
  - Để bảo tồn tiêu bản trong một thời gian dài, để chụp ảnh.

# II - PHƯƠNG PHÁP LÀM TIÊU BẢN VI SINH VẬT ĐỂ NHUỘM

# 2.1. Chuẩn bị phiến kính

 Chọn phiến kính trong, sạch, không mờ, không có dầu mỡ, đã được ngâm trong cồn, khi dùng lau khô bằng vải mềm và hơ qua trên ngọn lửa đèn cồn. - Dùng bút chì mỡ khoanh một vòng ở mặt dưới phiến kính.

#### 2.2. Phết mẫu vật

Nhỏ một giọt nước vô trùng lên phiến kính vào đúng vòng tròn đã khoanh, dùng que cấy lấy VSV từ ống giống hay từ bệnh phẩm, dàn đều trong giọt nước vô trùng trên phiến kính (nếu bệnh phẩm VSV dạng dịch thì không cần nhỏ giọt nước vô trùng).

#### 2.3. Sấy khô tiêu bản: Có 2 cách:

- Để tự khô ở nhiệt độ phòng thí nghiệm.
- Hơ cao trên ngọn lửa đèn cồn, không để sát tiêu bản vào ngọn lửa, nóng quá, thân VSV sẽ co quấp lại, protein trong nguyên sinh chất đông nhanh, ảnh hưởng đến hình thái.

#### 2.4. Cố định tiêu bản

- Cố định tiêu bản có 3 mục đích :
- + Giết chết VSV để việc sử dụng không gây nguy hiểm.
- + Làm cho VSV gắn chặt vào phiến kính, khi rửa nước không bị trôi đi.
- + Làm cho VSV bắt màu tốt hơn (protein chết bắt màu tốt hơn protein sống).

Có thế cố định bằng phương pháp sau đây:

- Cố định bằng nhiệt độ: hơ phiến kính trên ngọn đèn còn bằng cách đưa đi, đưa lại 3 - 4 lần, nếu hơ nóng quá sẽ làm biến dạng hình thái vi khuẩn.

# III - PHƯƠNG PHÁP NHUÔM TIÊU BẢN

# 3.1. Thuốc nhuộm đơn và các phương pháp nhuộm đơn

#### 3.1.1. Dung dich fucxin (fuchsine) trong axit phenic

- Chuẩn bị thuốc nhuộm:

Fucxin kiềm 1g

Cồn nguyên chất hay 96° 10ml

Axit phenic kết tinh 5g

Nước cất 100ml

Nghiền fucxin với 5ml còn trong cối sạch, quấy đều, đổ 2/3 lượng nước vào, đổ từ từ, quấy đều, xong cho axit phenic vào, quấy đều, cho vào lọ kín để 24 giờ, sau đó đem lọc qua giấy, tráng cốc bằng 1/3 lượng nước cất và 1/2 lượng còn còn lại, dung dịch này là dung dịch fucxin đặc.

Khi dùng nhuộm đơn hoặc nhuộm Gram thì đem pha loãng dung dịch này gấp 10 lần với dung dịch axit phenic 5%:

Dung dịch fucxin 10 ml Dung dịch axit phenic 5% 90 ml

- Phương pháp nhuôm đơn:
- + Nhỏ thuốc nhuộm lên tiêu bản đã cổ định, để 1 2 phút.
- + Rửa nước, để vòi nước từ từ chảy xuống một đầu phiến kính cầm hơi nghiêng đến khi nước trong là được.
  - + Thấm khô bằng giấy thấm hay bằng hơi nóng.
  - + Quan sát trên kính hiển vi.

#### 3.1.2. Dung dich xanh metilen trong axit phenic

- Chuẩn bi thuốc nhuôm :

Xanh metilen	1 g		
Axit phenic kết tinh	1g		
Cồn nguyên chất 96°	10ml		
Nước cất	100ml		

Cách pha giống như fucxin ở trên.

- Phương pháp nhuộm cũng giống nhuộm fucxin.

#### 3.2. Phương pháp nhuộm gram (nhuộm kép)

# 3.2.1. Phương pháp nhuộm gram

- Chuẩn bị thuốc nhuộm:
- + Dung dich tim gentian trong axit phenic:

Tím gentian 1g

Cồn 96° 10ml

Axit phenic kết tinh 5g

Nước cất 100ml

Pha dung dịch này giống như pha dung dịch fucxin nói trên.

- + Dung dịch fucxin trong axit phenic (như phần 3.1.1.)
- + Pha dung dich lugol:

Kali iðdua 1g
Iðt tinh thể 0,5g
Nước cất 150ml

Nghiền kali iô đua với một ít nước cất, sau đó cho iốt đã tán nhỏ vào lắc cho tan hết, cuối cùng cho đủ nước cất, lắc đều, để 24 giờ rồi đem lọc. Đựng vào chai màu, không nên pha nhiều vì dễ bị biến chất.

+ Pha dung dịch tẩy màu cồn axeton.

Cồn nguyên chất

5 phần

Axeton

1 phần

Nếu không có axeton thì dùng cồn nguyên chất hoặc 90° cũng được.

- Phương pháp nhuộm gram:
- 1) Nhỏ dung dịch tím genxian lên tiêu bản 1-2 phút.
- 2) Rửa nước nhanh, thấm khô nước.
- 3) Nhỏ dung dịch lugol để 1 phút (tiêu bản có màu nâu đen).
- 4) Rửa nước nhanh, thấm khô nước.
- 5) Nhỏ cồn axeton từ đầu phiến kính, nghiêng phiến kính cho cồn chảy qua chỗ phết VSV.
  - 6) Rửa nước nhanh.
  - 7) Nhỏ dung dịch fucxin loãng, để 1 phút.
  - 8) Rửa nước.
  - 9) Thấm khô Hơ khô Xem kính.

Vi khuẩn gram dương bắt màu tím, vi khuẩn gram âm bắt màu hồng.

Cần chú ý: bước tẩy màu bằng cồn axeton rất quan trọng. Nếu tẩy không kĩ thì dễ nhẩm lẫn vi khuẩn gram âm với vi khuẩn gram dương và ngược lại, nếu tẩy lâu quá thì vi khuẩn gram dương mất màu tím cho nên khi nhuộm màu đỏ fucxin thì nó bắt màu đỏ.

Quan sát trên kính hiển vi nhận thấy : hồng cầu nhuộm màu nâu hồng, nhân bạch cầu nhuộm màu tím.

IV - QUAN SÁT HÌNH THÁI CỦA VI SINH VẬT (xem tiêu bản tự làm và đã chuẩn bị sẵn)

# Bài 3 ĐẾM SỐ LƯỢNG TẾ BÀO VI SINH VẬT

# I - PHƯƠNG PHÁP ĐẾM BẰNG BUÔNG ĐẾM HỒNG CẦU

Dùng phương pháp này cho biết cả số VSV sống và số VSV chết trong một canh trùng.

#### 1.1. Chuẩn bị

- Pha loãng mẫu VSV: tùy theo số lượng VSV nhiều hay ít mà pha loãng thành các hệ số 10, 100, 1000, 10.000, 100.000, 1000.000, 10.000.000.
  - Dùng buồng đếm hồng cầu (Gô-ri-a-ep) có khắc : 0,1mm × 1/400 mm<sup>2</sup>.
  - Đậy lá kính mỏng lên chỗ có khắc ở giữa buồng đếm.
- Đưa buồng đếm đặt lên khay kính hiển vi, rồi tìm những ô vuông nhỏ trong buồng đếm bằng vật kính số 8.
- Để yên buồng đếm, xoay vật kính ra, dùng ống hút Pasteur hút canh trùng đã pha loãng và nhỏ vào khoảng giữa lá kính với buồng đếm. Để yên vài phút nếu không thấy có bọt khí ở khu vực buồng đếm, thì có thể bắt đầu đếm.
- Xoay vật kính vào, tùy theo VSV loại nhỏ hay to mà dùng các vật kính số ×40; ×20 hay ×8.
- VSV hiện lên trong buồng đếm như những chấm đen hoặc trong sáng, có chuyển động phân tử, đếm lần lượt số VSV trong 16 ô vuông nhỏ của một ô vuông to và đếm tất cả 5 ô vuông to tức là đếm  $(16 \times 5) = 80$  ô vuông nhỏ.
- Nguyên tắc đếm từ trái qua phải và từ trên xuống dưới mới không bị nhầm lẫn vì số lượng tế bào trong 1 ô vuông có thể rất nhiều.

# 1.2. Phương pháp tính số lượng vi sinh vật

Lấy tổng số VSV đếm được trong 80 ô vuông nhỏ, chia cho 80 để tính số bình quân tế bào VSV đếm được trong 1 ô vuông nhỏ. Diện tích phần kính có khắc là  $1 \text{mm}^2$ , trong đó có tất cả 25 ô vuông to, mỗi ô vuông to có 16 ô vuông nhỏ, như vậy có tất cả 400 ô vuông nhỏ (25 × 16). Vậy diện tích một ô vuông nhỏ ta đếm là  $1/400 \text{mm}^2$ . Khoảng cách từ chỗ có khắc của kính đến lá kính mỏng là 0.1 mm. Như vậy số tế bào VSV đếm được trong một ô vuông nhỏ chính là số tế bào VSV có trong  $1/4000 \text{mm}^3$  canh trùng. Do đó muốn tính số lượng tế bào VSV trong 1 ml canh trùng ( $1 \text{cm}^3 = 1000 \text{mm}^3$ ) thì nhân số lượng tế bào vi sinh vật trong một ô nhỏ với 1000. Nếu canh trùng pha loãng với hệ số bao nhiều thì lại nhân với hệ số pha loãng đó.

Có thể tóm tắt công thức tính như sau:

Số lượng tế bào Số tế bào VSV Hệ số pha VSV trong 1ml = bình quân của × 4000 × 1000 × loãng dịch một ô nhỏ