

**TRƯỜNG ĐẠI HỌC NÔNG NGHIỆP
KHOA CÔNG NGHỆ THỰC PHẨM**

**Bài giảng môn học
VI SINH VẬT ĐẠI CƯƠNG**

Thời lượng : 2 Tín chỉ (1.5 LT-0.5 TH)

Giảng viên: TS. Nguyễn Thị Thanh Thủy

Hà nội, 2009

BÀI MỞ ĐẦU

Mục đích: Giới thiệu đối tượng và nhiệm vụ của môn học, những đóng góp của các nhà khoa học trong lịch sử phát triển VSVH. Làm rõ 4 vấn đề chính đã đẩy các nghiên cứu tới giai đoạn “hoàng kim của vi sinh vật học”. Mô tả các đặc điểm chung của vi sinh vật và cách phân loại chúng.

1. Đối tượng và nhiệm vụ của vi sinh vật học

Vi sinh vật (microorganisms) là tên chung để chỉ tất cả các sinh vật nhỏ bé mà muốn thấy rõ chúng người ta phải sử dụng kính hiển vi.

Vi sinh vật học (Microbiology) là khoa học nghiên cứu về hình thái, cấu tạo, đặc tính sinh lý, sinh hoá, di truyền...và phân loại của các vi sinh vật.

Giữa các nhóm vi sinh vật khác nhau hầu như chỉ thấy có sự giống nhau về tính chất nhỏ bé và sự thống nhất trong phương pháp nghiên cứu. Tuy nhiên chúng thuộc về các nhóm phân loại khác nhau và hầu như có rất ít quan hệ đối với nhau.

Các nhóm vi sinh vật chủ yếu bao gồm:

- Vi khuẩn (Bacteria): theo nghĩa rộng, nó là tên chung để chỉ nhiều loại vi sinh vật thuộc các bộ khác nhau trong ngành Bacteria như xạ khuẩn (Actinomycetes), niêm vi khuẩn (Myxobacteriales), xoắn thể (Spirochaetales), Rickettsias và Mycoplasmas. Vi khuẩn (theo nghĩa hẹp) không bao gồm các nhóm trên.
- Nấm men (Yeast, Levure) - Nấm mốc (Molds)
- Một số tảo (Algae) - Một số động vật nguyên sinh (Protozoa) - Virus

2. Lược sử nghiên cứu vi sinh vật học *(bài đọc thêm)*

Có thể chia lịch sử của vi sinh vật học làm 3 giai đoạn chính: Giai đoạn phát triển sớm (trước 1857), giai đoạn hoàng kim (1857-1907) và giai đoạn đương thời của VSVH (1907-nay) .

2.1. Giai đoạn phát triển sớm của VSVH

Giai đoạn này được tính từ 1857 trở về trước, đó là những đóng góp của Leeuwenhoek (vi khuẩn học, nguyên sinh động vật học, nấm học, ký sinh trùng học và tảo học) *(bài đọc thêm)*; Linnaeus (hệ thống phân loại) *(bài đọc thêm)*; Semmelweis (kiểm soát bệnh nhiễm trùng); Snow (dịch tễ học).

2.2. Thời kỳ hoàng kim của vi sinh vật học

Trong những năm 1857-1907, các nhà khoa học đã giải quyết được 4 vấn đề chính và đưa giai đoạn này trở thành giai đoạn hoàng kim của VSVH. Bao gồm:

- Đấu tranh và phủ nhận thuyết tự sinh (thí nghiệm của Redy, Needham, Spallanzani, Pasteur) *(bài đọc thêm)*.
- Giải thích về hiện tượng lên men (thí nghiệm của Pasteur, Buchner) *(bài đọc thêm)*.

- Nguyên nhân bệnh tật (thí nghiệm của Koch) (*bài đọc thêm*).
- Phương pháp để ngăn ngừa sự nhiễm trùng và bệnh tật (bắt đầu từ những nghiên cứu của các tiên bối như Semmelweis với biện pháp rửa tay, Lister với kỹ thuật sát trùng, Nightingale với việc chăm sóc sức khỏe, Jenner với vaccin, Gram với việc nhuộm vi khuẩn, cuối cùng Ehrlich (1854-1915) làm nổi bật giai đoạn này bởi những viên “thần dược”, có thể phá huỷ các tác nhân gây bệnh mà không gây độc với người.

2.3. Giai đoạn đương thời của vi sinh vật học (*bài đọc thêm và SV tự tham khảo*).

- Cơ sở khoa học của các phản ứng hoá sinh
- Hoạt động của gen
- Sinh học phân tử
- Kỹ thuật AND tái tổ hợp
- Liệu pháp gen

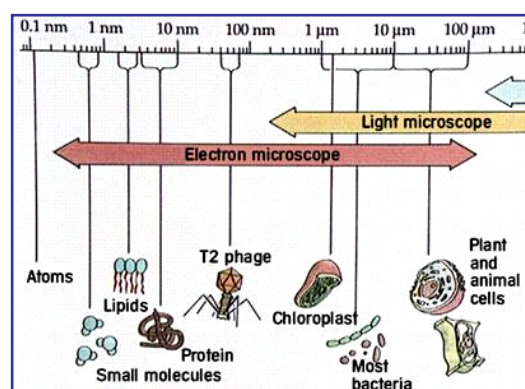
3. Đặc điểm chung của vi sinh vật

Vi sinh vật có các đặc điểm chung sau đây:

Kích thước nhỏ bé

Vi sinh vật thường được đo kích thước bằng đơn vị micromet ($1\mu\text{m} = 1/1000\text{mm}$ hay $1/1000\ 000\text{m}$). Virus được đo kích thước đơn vị bằng nanomet ($1\text{nm} = 1/1000\ 000\text{mm}$ hay $1/1000\ 000\ 000\text{m}$).

Kích thước càng bé thì diện tích bề mặt của vi sinh vật trong 1 đơn vị thể tích càng lớn. Chẳng hạn đường kính của 1 cầu khuẩn (coccus) chỉ có $1\mu\text{m}$, nhưng nếu xếp đầy chúng thành 1 khối có thể tích là 1cm^3 thì chúng có diện tích bề mặt rộng tới... $6\ \text{m}^2$!



Hấp thu nhiều, chuyển hoá nhanh

Tuy vi sinh vật có kích thước rất nhỏ bé nhưng chúng lại có năng lực hấp thu và chuyển hoá vượt xa các sinh vật khác. Chẳng hạn 1 vi khuẩn lactic (*Lactobacillus*) trong 1 giờ có thể phân giải được một lượng đường lactose lớn hơn 100-10 000 lần so với khối lượng của chúng.

Sinh trưởng nhanh, phát triển mạnh

Chẳng hạn, 1 trực khuẩn đại tràng (*Escherichia coli*) trong các điều kiện thích hợp chỉ sau 12-20 phút lại phân cắt một lần. Nếu lấy thời gian thế hệ là 20 phút thì mỗi giờ phân cắt 3 lần, sau 24 giờ phân cắt 72 lần và tạo ra $4\ 722\ 366,5 \times 10^{18}$ tế bào, tương đương với 1 khối lượng... 4722 tấn. Tất nhiên trong tự nhiên không có được các điều kiện tối ưu như vậy (vì thiếu thức ăn, thiếu oxy, dư thừa các sản phẩm trao đổi chất có hại...).

Có năng lực thích ứng mạnh và dễ dàng phát sinh biến dị

Trong quá trình tiến hoá lâu dài vi sinh vật đã tạo cho mình những cơ chế điều hoà trao đổi chất để thích ứng được với những điều kiện sống rất khác nhau, kể cả những điều kiện hết sức bất lợi mà các sinh vật khác không thể tồn tại được. Có vi sinh vật sống được ở môi trường nóng đến 130⁰C, lạnh đến 0-5⁰C, mặn đến nồng độ 32% muối ăn, ngọt đến nồng độ mật ong, pH thấp đến 0,5 hoặc cao đến 10,7, áp suất cao đến trên 1103 at. hay có độ phóng xạ cao đến 750 000 rad. Nhiều vi sinh vật có thể phát triển tốt trong điều kiện tuyệt đối kỵ khí, có loài nấm sợi có thể phát triển dày đặc trong bể ngâm tử thi với nồng độ formol rất cao...

Vi sinh vật đa số là đơn bào, sinh sản nhanh, số lượng nhiều, tiếp xúc trực tiếp với môi trường sống... do đó rất dễ dàng phát sinh biến dị. Chỉ sau một thời gian ngắn đã có thể tạo ra một số lượng rất lớn các cá thể biến dị ở các hệ hệ sau. Những biến dị có ích sẽ đưa lại hiệu quả rất lớn trong sản xuất. Nếu như khi mới phát hiện ra penicillin hoạt tính chỉ đạt 20 đơn vị/ml dịch lên men (1943) thì nay đã có thể đạt trên 100 000 đơn vị/ml. Khi mới phát hiện ra acid glutamic chỉ đạt 1-2g/l thì nay đã đạt đến 150g/ml dịch lên men (VEDAN-Việt Nam).

Phân bố rộng, chủng loại nhiều

Vi sinh vật có mặt ở khắp mọi nơi trên Trái đất, trong không khí, trong đất, trên núi cao, dưới biển sâu, trên cơ thể, người, động vật, thực vật, trong thực phẩm, trên mọi đồ vật...

Vi sinh vật tham gia tích cực vào việc thực hiện các vòng tuần hoàn sinh-địa-hoá học (biogeochemical cycles) như vòng tuần hoàn C, vòng tuần hoàn N, vòng tuần hoàn P, vòng tuần hoàn S, vòng tuần hoàn Fe...

Trong nước vi sinh vật có nhiều ở vùng duyên hải (littoral zone), vùng nước nông (limnetic zone) và ngay cả ở vùng nước sâu (profundal zone), vùng đáy ao hồ (benthic zone).

Trong không khí thì càng lên cao số lượng vi sinh vật càng ít. Số lượng vi sinh vật trong không khí ở các khu dân cư đông đúc cao hơn rất nhiều so với các vùng khác (không khí trên mặt biển, không khí ở Bắc cực, Nam cực...)

Hầu như không có hợp chất carbon nào (trừ kim cương, đá graphít...) mà không là thức ăn của những nhóm vi sinh vật nào đó (kể cả dầu mỏ, khí thiên nhiên, formol. dioxin...). Vi sinh vật có các kiểu dinh dưỡng khác nhau: tự dưỡng quang năng (photoautotrophy), dị dưỡng quang năng (photoheterotrophy), tự dưỡng hoá năng (chemoautotrophy), dị dưỡng hoá năng (chemoheterotrophy), tự dưỡng chất sinh trưởng (auxoautotroph), dị dưỡng chất sinh trưởng (auxoheterotroph)...

4. Phân loại vi sinh vật

Từ trước đến nay có rất nhiều hệ thống phân loại sinh vật. Các đơn vị phân loại sinh vật nói chung và vi sinh vật nói riêng đi từ **thấp lên cao**. Đơn vị cơ bản trong phân loại là **Loài** (Species). Trên LOÀI có **Chi** (Genus), **Họ** (Family), **Bộ** (Order), **Lớp** (Class), **Ngành**

(Phylum), và **Giới** (Kingdom). Hiện nay trên giới còn có một mức phân loại nữa gọi là **lĩnh giới** (Domain). Đây là chưa kể đến các mức phân loại trung gian như **Loài phụ** (Subspecies), **Chi phụ** (Subgenus), **Họ phụ** (Subfamily), **Bộ phụ** (Suborder), **Lớp phụ** (Subclass), **Ngành phụ** (Subphylum). Dưới LOÀI gồm có **Thứ** (Variety), **Dạng** (Type), **Nòi hay Chủng** (Strain) *(bài đọc thêm)*.

Mỗi loài vi khuẩn cũng như các sinh vật khác đều được mang một tên khoa học riêng. Tên này được đặt theo danh pháp kép của Lineaus. Trong tên này từ thứ nhất để chỉ Giống, từ thứ hai chỉ tên loài. Ví dụ: *Staphylococcus aureus*. Để tiện theo dõi, đôi khi sau tên loài người ta còn ghi thêm tên tác giả và năm xác định, ví dụ *Staphylococcus aureus* Bergey, 1939.

Thứ (đơn vị sát sau loài), dùng để chỉ một nhóm nhất định trong một loài nào đó, ví dụ *Mycobacterium tuberculosis var. bovis* (vi khuẩn lao ở bò).

Dạng: chỉ một nhóm nhỏ hơn dưới thứ, ví dụ căn cứ vào phản ứng huyết thanh mà người ta chia phé cầu khuẩn *Diplococcus pneumoniae* thành 80 dạng khác nhau, trong đó các dạng I, II, III là các dạng có độc tính mạnh nhất.

Chủng: là thuật ngữ riêng để chỉ một loài vi sinh vật mới phân lập thuần khiết từ một cơ chất nào đó. Lưu ý các cá thể trong cùng một loài phân lập ở những nơi khác nhau cũng không bao giờ hoàn toàn giống nhau, chúng có thể được coi là những nòi khác nhau. Các nòi thường được ký hiệu bằng những con số, những chữ viết tắt theo quy ước riêng của người nghiên cứu, ví dụ *Bacillus subtilis* B.F 7687...

Người ta ước tính trong số 1,5 triệu loài sinh vật có khoảng 200 000 loài vi sinh vật (100 000 loài động vật nguyên sinh và tảo, 90 000 loài nấm, 2500 loài vi khuẩn lam và 1500 loài vi khuẩn). Tuy nhiên hàng năm, có thêm hàng nghìn loài sinh vật mới được phát hiện, trong đó có không ít loài vi sinh vật.

Virus là một dạng đặc biệt chưa có cấu trúc cơ thể cho nên chưa được kể đến trong số 200 000 loài vi sinh vật nói trên. Số virus đã được đặt tên là khoảng 4000 loài.

BÀI ĐỌC THÊM CỦA CHƯƠNG MỞ ĐẦU

LỊCH SỬ PHÁT TRIỂN CỦA VSVH

Từ cổ xưa, mặc dù chưa nhận thức được sự tồn tại của vi sinh vật, nhưng loài người đã biết khá nhiều về các tác dụng của vi sinh vật gây nên. Trong sản xuất và trong đời sống, con người đã tích lũy được nhiều kinh nghiệm và các biện pháp lợi dụng các vi sinh vật có ích và phòng tránh các vi sinh vật có hại.

Trên những vật giữ lại từ thời cổ Hy Lạp người ta đã thấy minh họa cả quá trình nấu rượu. Những tài liệu khảo cổ cho biết cách đây trên 6000 năm người dân Ai Cập ở dọc sông Nile đã có tập quán nấu rượu. Các hình vẽ trên Kim Tự Tháp cũng cho thấy nghề nấu rượu và làm bia ở Ai Cập cũng rất phổ biến. Trong Kinh thánh cũng có đoạn miêu tả cảnh say rượu của Noé sau khi sống sót qua cơn đại hồng thủy (cách đây trên 5000 năm). Ở Trung Quốc rượu đã được sản xuất từ thời đại văn hóa Long Sơn (cách đây trên 4000 năm). Trong các chữ khắc trên xương, trên mai rùa (cốt giáp văn tự) từ thời Ân Thương (thế kỉ 17-11 TCN) người ta đã thấy chữ “tửu”. Việc lên men lactic (muối dưa) được thực hiện vào khoảng năm 3500 TCN.

Muối dưa, làm giấm, làm tương, làm mắm, làm mứt, làm sữa chua, ướp thịt, ướp cá... đều là những biện pháp hữu hiệu để hoặc sử dụng, hoặc khống chế vi sinh vật phục vụ cho việc chế biến và bảo quản thực phẩm. Theo sách “Lĩnh nam chích quái” thì nhân dân ta từ thời Hùng Vương dụng nước đã biết “làm mắm bằng cầm thú, làm rượu bằng cốt gạo”.

Việc sáng tạo ra các hình thức ủ phân, ngâm phân, ngâm đay, ngâm gai, xếp ải, trồng luân canh các cây họ đậu... đều là những biện pháp tài tình mà tổ tiên ta từ lâu đã biết phát huy tác dụng của vi sinh vật trong nông nghiệp

Về phương diện phòng trừ bệnh tật loài người cũng sớm tích lũy được nhiều kinh nghiệm phong phú. Ngay từ trước Công nguyên những tài liệu của Hippocrate (460 – 373 TCN), của Veron (116 – 27 TCN) của Lucrece (98 – 55 TCN)... đã đề cập đến bản chất sống của các tác nhân gây ra bệnh truyền nhiễm.

Người có công phát hiện ra thế giới vi sinh vật và cũng là người đầu tiên miêu tả hình thái nhiều loại vi sinh vật là một người Hà Lan vốn là người học nghề trong một hiệu buôn vải. Đó là **Antonie van Leeuwenhoek (1632 – 1723)**. Ông đã tự chế tạo ra trên 400 kính hiển vi, trong đó có cái phóng đại được đến 270 lần. Với những chiếc kính hiển vi cầm tay, có gương hội tụ ánh sáng, có ốc điều chỉnh để cho vật định quan sát rơi đúng vào tiêu điểm và bằng cách ghé mắt vào khe nhỏ có gắn thấu kính mài lấy nhỏ xíu, Leeuwenhoek đã lần lượt quan sát mọi thứ có xung quanh mình. Năm 1674 ông nhìn thấy các vi khuẩn và động vật nguyên sinh, ông gọi là các “động vật vô cùng nhỏ bé”. Ông thấy các “động vật” này có rất nhiều trogn bựa răng và ông viết rằng trong miệng của ông số lượng của chúng còn đông hơn cả dân số của nước Hà Lan. Nhờ sự giới thiệu của regnier de Graaf ông đã gửi đến Học hội Hoàng gia Anh 200 bức thư, qua đó ông đã miêu tả hình thái và dạng chuyển động của nhiều loại vi sinh vật. Nhiều bài báo của ông đã được đăng trên tạp chí Triết học của Học hội Hoàng gia Anh và năm 1680 ông đã được bầu làm thành viên của Học hội này. Tất cả các quan sát và miêu tả của ông đã được in thành một bộ sách gồm 4 tập có nhan đề “Những bí mật của giới tự nhiên nhìn qua kính hiển vi”.

Chỉ tới đầu thế kỉ 19 những chiếc kính hiển vi quang học hoàn chỉnh mới ra đời với các ống hiển to lớn của G. Battista Amici (1784 – 1860) Ernes Abbe (1840 – 1905), Karl Zeiss (1816 – 1888)... năm **1934 chiếc kính hiển vi điện tử đầu tiên ra đời**. Đó là loại kính hiển vi không dùng ánh sáng khuếch đại nhờ các thấu kính mà dùng 1 chùm điện tử khuếch đại lên nhờ các điện từ trường.

Từ thập kỉ 60 của thế kỉ 19 bắt đầu thời kì nghiên cứu về sinh lí học của các loại vi sinh vật. Người có công to lớn trong việc này, người về sau được coi là ông tổ của vi sinh vật học là nhà khoa học người Pháp Louis Pasteur (1822 – 1895). Khó mà tóm tắt được khối lượng các phát hiện đồ sộ mà L. Pasteur đã cống hiến cho nhân loại.

Viết về **L. Pasteur**, nhà khoa học người Nga K.A.Timiriazev đã phân tích như sau: “Công trình của ông đã đem lại **những biến đổi quan trọng trong cả 3 bộ môn khoa học** ứng dụng kinh điển của nhân loại. *Về công nghiệp*, ông đã đề ra các cơ sở hợp lí, vững chắc cho hết thảy các quá trình lên men. *Về nông nghiệp*, lí luận của ông cùng với sự phát triển của T.Schloesing, H. Hellriegel, S.N. Vinogradskii... đã vạch ra cho các nhà nông học những ánh sáng mới về các nhiệm vụ và phương pháp cơ bản. *Về y học*... từ sau khi loài người nuyên thủy thoát được ra khỏi sự uy

hiệp của các dã thú trong rừng sâu thì trong lịch sử chưa từng thấy có sự tiến bộ nào có ý nghĩa quyết định như các công trình nghiên cứu của L. Pasteur.”

“Nhà bác học Đức **Robert Koch (1843- 1910)** là người đã cộng sự mật thiết với Pasteur. Ngoài công lao to lớn phát hiện ra *vi khuẩn lao, vi khuẩn tả, ông còn tìm ra phương pháp phân lập thuần khiết vi sinh vật* trên các môi trường đặc. Học trò của ông là **J.R. Petri (1852 – 1921)** đã phát kiến ra *loại hộp lồng làm bằng thủy tinh*. R. Koch đã phát hiện ra phương pháp *nhuộm màu tế bào vi sinh vật*. Về sau các kĩ thuật nhuộm tiêu bản đã được cải tiến bởi **Ehrlich (1881), Ziehl và Neelsen (1883). Loeffler (1884), Gram (1884)...** R.Koch được nhận giải Nobel năm 1905. Người có công đầu tiên trong việc chứng minh có sự tồn tại của loại vi khuẩn nhỏ bé hơn vi khuẩn nhiều lần là nhà sinh lí học người Nga **D.I. Ivanovskii (1864 – 1920)**. Ông chứng minh có sự tồn tại của loại vi sinh vật siêu hiển vi gây ra bệnh khảm (mosaic) ở lá thuốc lá năm 1892. Đến năm 1897 nhà khoa học Hà Lan M.W. Beijerinck (1851 - 1931) gọi loại vi sinh vật này là *virut (virus)* theo tiếng La tinh có nghĩa là “nọc độc”. Đến năm 1917 thì F.H. d’ Hérèlle (1873 – 1949) phát hiện ra các virut của vi khuẩn và đặt tên là thể thực khuẩn (Bacteriophage). Mặc dầu L.Pasteur là người đầu tiên chứng minh cơ sở khoa học của việc chế tạo vaccin (Vaccin, từ gốc La Tinh Vaccinae có nghĩa là bệnh đậu mùa bò) lại do bác sĩ nông thôn người Anh Edward Jenner (1749-1823) đặt ra. Ông là người đầu tiên nghĩ ra phương pháp chủng mù đầu bò cho người lành để đề phòng bệnh đậu mùa hết sức nguy hiểm cho tính mạng con người.

Người đặt nền móng cho khoa *Miễn dịch học* (Immunology) là nhà khoa học Nga **Ilya Ilitch Metchnikov (1845-1916)**. Ông đã đến Paris năm 1887 để gặp L.Pasteur từ những ngày đầu xây dựng Viện Pasteur Paris. Với lý thuyết “thực bào” nổi tiếng ông đã nhận được giải thưởng Nobel năm 1908 (cùng với P.Ehrlich).

Cần phải nói lên công lao của nhà khoa học người Anh J.Lister (1827-1912), người đã đề xuất ra việc sử dụng các hóa chất diệt khuẩn và việc sử dụng phương pháp vô trùng trong phẫu thuật.

Nhà khoa học Pháp gốc Nga S.N.Vinogradskii (1856-1953) là người đầu tiên phát hiện ra vi khuẩn sắt (1880), vi khuẩn lưu huỳnh (1887), vi khuẩn nitrat hóa (1890). Nhà khoa học Hà Lan M.W.Beijerinck (1851-1931) là người đầu tiên phân lập được vi khuẩn nốt sần Rhizobium (18880, vi khuẩn cố định đạm hiếu khí Azotobacter (1901), vi khuẩn lên men butylic, vi khuẩn phân giải pectin và nhiều nhóm vi khuẩn khác.

Người đầu tiên phát hiện ra *chất kháng sinh* là bác sĩ người Anh **Alexander Fleming (1881-1955)**. Năm 1928 ông là người đầu tiên tách được chủng nấm sinh chất kháng sinh penixilin, mở ra một kỉ nguyên mới cho khả năng đẩy lùi nhanh chóng các bệnh nhiễm khuẩn . Ông được nhận giải thưởng Nobel năm 1945 (cùng với B.E.chain và H.W.Florey). Năm 1944 nhà khoa học Mỹ gốc Nga S.A.Waksman phát hiện ra Streptomixin và được nhận giải thưởng Nobel vào năm 1952. Hàng loạt các chất kháng sinh quan trọng khác đã được liên tiếp phát hiện và ứng dụng vào các năm tiếp sau: baxitraxin (1945), cloramphenicol (1947), polimixin (1947), clotetraxiclin (1948), xephalosporin (1948), neomixin (1949), eritromixin (1952), grizeofulvin (1959), gentamixin (1963), kasugamixin (1964), bleomixin (1965), validaxin (1970)...

Năm 1897 **Eduard Buchner (1860 – 1917)** lần đầu tiên chứng minh được *vai trò của enzyme* trong quá trình lên men rượu. Ông đã nghiên cứu tế bào nấm men bằng cát thạch anh và lấy chất dịch vô bào chiết rút từ men đưa vào một dung dịch chứa 37% đường, sau nửa giờ đã thấy sản sinh CO₂ và rượu etylic. Khoa học về enzyme hình thành và phát triển nhờ hàng loạt thành công tiếp theo: Năm 1897 B. Bertrand phát hiện ra và đặt tên cho nhóm coenzyme; A. Haeden và Young cô đặc được một nhóm coenzyme gọi là cozimaza (sau này được xác định là NAD – nicotinamid adenin dinucleotid) vào năm 1905; Sorensen chứng minh ảnh hưởng của pH đến hoạt động của enzyme (1909); Neuberg đề xuất con đường hóa học của quá trình lên men (1912); Betalli và Stern khám phá ra dehidrogenaza (1912) ; Warburg nghiên cứu về enzyme tham gia vào quá trình hô hấp; Michaelis và Mentan đề xuất ra động học của hoạt động của enzyme (1913) ; J.B. Sumner (1887 – 1955) đoạt giải Nobel năm 1946, lần đầu tiên kết tinh được một enzyme và chứng minh bản chất protein của enzyme ureaza này (1929), tripsin (1931), chimohipsin (1933) ; Kelin phân lập được xitocrom c (1933) ; H.A.Krebs và Henselei khám phá ra chu trình ure (1933) ; Embden và Meyerhof chứng minh quá trình phân giải đường (1933), Kuhn xác định vitamin B₂ là 1 thành phần của enzyme vàng (1935) ; H.A.Krebs tìm ra chu trình axit citric (1937), giải Nobel 1953 cùng với F.A. lipmann; Lipmann xác định vai trò trung tâm của ATP trong quá trình vận chuyển năng lượng (1939 – 1941) ; G.W.

Beadle và E.L. Tatum chứng minh lý thuyết “1gen – 1 enzyme” (1940, giải Nobel 1958 cùng với J. lederberg) ; A. Kornberg khám phá ra ADN polimeraza (giải Nobel 1959 cùng với S.Ochoa).

Tính đến năm 1984 người ta đã biết đến 2477 loại enzyme khác nhau và enzyme đã có mặt trong rất nhiều hoạt động sản xuất và đời sống của con người. Cùng với việc sử dụng enzyme bất động, công nghệ enzyme đã trở thành một trong các mũi nhọn của Công nghệ sinh học...

Năm 1970 một số nhà bác học (H.O. Smith, K.W.Wilcox, T.J. Kelly lần đầu tiên tách được loại emzyme có khả năng cắt ADN ở những vị trí xác định. Năm 1972 nhóm bác học Mỹ H. Boyer, P. berg, S.N. Cohen lần đầu tiên tổng hợp ra được một ADN theo ý muốn, người ta gọi là ADN tái tổ hợp. Trong khoảng 1975 – 1977 nhóm bác học Mỹ F. Sanger, và W. Gilbert (giải Nobel 1980) và A. Maxam phát hiện ra một kỹ thuật cho phép xác định nhanh chóng trật tự các nucleotit trong AND.

Năm 1978 lần đầu tiên sản xuất ra *insulin* (chữa bệnh tiểu đường) bằng công nghệ gen (dùng vi khuẩn đã được ghép gen mã hóa việc sinh tổng hợp ra insulin. Năm 1982 thuốc insulin tái tổ hợp được Mỹ và Anh cho phép ứng dụng rộng rãi. Cũng vào năm này người ta đã chế tạo thành công kích tố sinh trưởng người . Năm 1988 J.D. Watson nhận chủ trì Dự án hệ gen người với kinh phí được Chính phủ Mỹ đầu tư là 3 tỉ USD. Năm 1996 hoàn thành việc khám phá hệ gen của men rượu (*Saccharomyces cerevisiae*). Năm 1997 *Jan Wilmot và các cộng sự* ở Viện nghiên cứu Roslin, gần Edinburg (Scotland) lần đầu tiên cho ra đời *cừ Dolly bằng kỹ thuật sinh sản vô tính* không cần tới quá trình thụ tinh.

Ngày 26/6/2000 cùng một lúc các nhà khoa học thuộc hai nhóm nghiên cứu độc lập là nhóm Consortium của F. Collins và nhóm Celera Genomics của Vainter đã công bố việc khám phá ra hầu như toàn bộ gen của người. ""(Theo sách Vi sinh vật học của Nguyễn Lâm Dũng)

Vi sinh vật học là một ngành khoa học có tốc độ phát triển mạnh mẽ, nhiều giải thưởng Nobel đã được trao cho các nhà vi sinh vật học hoặc những công trình nghiên cứu trên đối tượng vi sinh vật.

Ngày nay, vi sinh vật học đã phát triển rất sâu với hàng trăm nhà bác học có tên tuổi và hàng chục ngàn người tham gia nghiên cứu. Các nghiên cứu đã đi sâu vào bản chất của sự sống ở mức phân tử và dưới phân tử, đi sâu vào kỹ thuật cấy mô và tháo lắp gene ở vi sinh vật và ứng dụng kỹ thuật tháo lắp này để chữa bệnh cho người, gia súc, cây trồng và đang đi sâu vào để giải quyết dần bệnh ung thư ở loài người.

Một số các mốc quan trọng

1546- Girolamo Fracastoro (1478, 1553). cho rằng các cơ thể nhỏ bé là tác nhân gây ra bệnh tật. Ông viết bài thơ Syphilis sive de morbo gallico (1530) và từ tựa đề của bài thơ đó, người ta dùng để đặt tên bệnh

1590-1608- Zacharias Janssen lần đầu tiên lắp ghép kính hiển vi.

1676- Antony van Leeuwenhoek (1632-1723) hoàn thiện kính hiển vi và khám phá ra thế giới vi sinh vật (mà ông gọi là animalcules).

1688- Nhà vật học người Ý Francisco Redi công bố nghiên cứu về sự phát sinh tự nhiên của giòi.

1765-1776- Spallanzani (1729-1799) công kích thuyết Phát sinh tự nhiên

1786- Müller đưa ra sự phân loại đầu tiên về vi khuẩn

1798- Edward Jenner nghĩ ra phương pháp chủng mù đậu bò để phòng ngừa bệnh đậu mùa

1838-1839- Schwann và Schleiden công bố Học thuyết tế bào.

1835-1844- Basi công bố bệnh của tằm do nấm gây nên và nhiều bệnh tật khác do vi sinh vật gây nên.

1847-1850- Semmelweis cho rằng bệnh sốt hậu sản lây truyền qua thầy thuốc và kiến nghị dùng phương pháp vô khuẩn để phòng bệnh.

1849- Snow nghiên cứu dịch tễ của bệnh tả ở vùng London.

1857- Louis Pasteur (1822-1895) chứng minh quá trình lên men lactic là gây nên bởi vi sinh vật.

1858- Virchow tuyên bố tế bào được sinh ra từ tế bào.

- 1861-** Pasteur chứng minh vi sinh vật không tự phát sinh như theo thuyết tự sinh.
- 1867-** Lister công bố công trình nghiên cứu về phẫu thuật vô khuẩn.
- 1869-** Miescher khám phá ra acid nucleic.
- 1876-1877-** Robert Koch (1843-1910) chứng minh bệnh than do vi khuẩn *Bacillus anthracis* gây nên.
- 1880-** Alphonse Laveran phát hiện ký sinh trùng *Plasmodium* gây ra bệnh sốt rét.
- 1881-** Robert Koch nuôi cấy thuần khiết được vi khuẩn trên môi trường đặc chứa gelatin.
Pasteur tìm ra vaccin chống bệnh than.
- 1882-** Koch phát hiện ra vi khuẩn lao - *Mycobacterium tuberculosis*.
- 1884-** Lần đầu tiên công bố Nguyên lý Koch.
- Elie Metchnikoff (1845-1916) miêu tả hiện tượng thực bào (phagocytosis)
- Triển khai nồi khử trùng cao áp (autoclave)
 - Triển khai phương pháp nhuộm Gram.
- 1885-** Pasteur tìm ra vaccin chống bệnh dại.
- Escherich tìm ra vi khuẩn *Escherichia coli* gây ra bệnh tiêu chảy.
- 1886-** Fraenkel phát hiện thấy *Streptococcus pneumoniae* gây ra bệnh viêm phổi.
- 1887-** Richard Petri phát hiện ra cách dùng hộp lồng (đĩa Petri) để nuôi cấy vi sinh vật.
- 1887-1890-** Winogradsky nghiên cứu về vi khuẩn lưu huỳnh và vi khuẩn nitrat hoá.
- 1889-** Beijerinck phân lập được vi khuẩn nốt sần từ rễ đậu.
- 1890-** Von Behring làm ra kháng độc tố chống bệnh uốn ván và bệnh bạch hầu.
- 1892-** Ivanowsky phát hiện ra mầm bệnh nhỏ hơn vi khuẩn (virus) gây ra bệnh khảm ở cây thuốc lá.
- 1894-** Kitasato và Yersin khám phá ra vi khuẩn gây bệnh dịch hạch (*Yersinia pestis*).
- 1895-** Bordet khám phá ra Bổ thể (complement)
- 1896-** Van Ermengem tìm ra mầm bệnh ngộ độc thịt (vi khuẩn *Clostridium botulinum*).
- 1897-** Buchner tách ra được các men (ferments) từ nấm men (yeast).
- Ross chứng minh ký sinh trùng sốt rét lây truyền bệnh qua muỗi.
- 1899-** Beijerinck chứng minh những hạt virus đã gây nên bệnh khảm ở lá thuốc lá.
- 1900-** Reed chứng minh bệnh sốt vàng lây truyền do muỗi.
- 1902-** Landsteiner khám phá ra các nhóm máu
- 1903-** Wright và cộng sự khám phá ra Kháng thể (antibody) trong máu của các động vật đã miễn dịch.
- 1905-** Schaudinn và Hoffmann tìm ra mầm bệnh giang mai (*Treponema pallidum*).
- 1906-** Wassermann phát hiện ra xét nghiệm cố định bổ thể để chẩn đoán giang mai.
- 1909-** Ricketts chứng minh bệnh Sốt ban núi đá lan truyền qua ve là do mầm bệnh vi khuẩn (*Rickettsia rickettsii*).
- 1910-** Rous phát hiện ra ung thư ở gia cầm.
- 1915-1917-** D'Herelle và Twort phát hiện ra virus của vi khuẩn (thực khuẩn thể)
- 1921-** Fleming khám phá ra lizôzim (lysozyme).
- 1923-** Xuất bản lần đầu cuốn phân loại Vi khuẩn (Bergey's Manual)
- 1928-** Griffith khám phá ra việc biến nạp (transformation) ở vi khuẩn.
- 1929-** Fleming phát hiện ra penicillin.
- 1931-** Van Niel chứng minh vi khuẩn quang hợp sử dụng chất khử như nguồn cung cấp electron và không sản sinh oxy.
- 1933-** Ruska làm ra chiếc kính hiển vi điện tử đầu tiên.
- 1935-** Stanley kết tinh được virus khảm thuốc lá (TMV).
- Domag** tìm ra thuốc sulfamide.

1937- Chatton phân chia sinh vật thành hai nhóm: Nhân sơ (Procarvates) và Nhân thật (Eucaryotes).

1941- Beadle và Tatum đưa ra giả thuyết *một gen- một enzym*.

1944- Avery chứng minh ADN chuyên thông tin di truyền trong quá trình biến nạp.

1946- Lederberg và Tatum khám phá ra quá trình tiếp hợp (conjugation) ở vi khuẩn.

1949- Enders, Weller và Robbins nuôi được virus Polio (Poliovirus) trên mô người nuôi cấy.

1950- Lwoff xác định được các thực khuẩn thể tiềm tan (lysogenic bacteriophages).

1952- Hershey và Chase chứng minh thực khuẩn thể tiêm ADN của mình vào tế bào vật chủ (host). Zinder và Lederberg khám phá ra quá trình tải nạp (transduction) ở vi khuẩn.

1953- Frits Zernike Làm ra kính hiển vi tương phản pha (phase-contrast microscope). Medawar khám phá ra hiện tượng nhờn miễn dịch (immune tolerance). Watson và Crick khám phá ra chuỗi xoắn kép của ADN

1955- Jacob và Monod khám phá ra yếu tố F là một plasmid. Jerne và Burnet chứng minh lý thuyết chọn lọc clone (clonal selection).

1959- Yalow triển khai kỹ thuật Miễn dịch phóng xạ.

1961- Jacob và Monod giới thiệu mô hình điều hoà hoạt động gen nhờ operon.

1961-1966- Nirenberg, Khorana và cộng sự giải thích mã di truyền.

1962- Porter chứng minh cấu trúc cơ bản của Globulin miễn dịch G. Tổng hợp được quinolone đầu tiên có tác dụng diệt khuẩn (acid nalidixic).

1970- Arber và Smith khám phá ra enzym giới hạn (restriction endonuclease) Temin và Baltimore khám phá ra enzym phiên mã ngược (reverse transcriptase)

1973- Ames triển khai phương pháp vi sinh vật học để khám phá ra các yếu tố gây đột biến (mutagens). Cohen, Boyer, Chang và Helling sử dụng vector plasmid để tách dòng gen ở vi khuẩn.

1975- Kohler và Milstein phát triển kỹ thuật sản xuất các kháng thể đơn dòng (monoclonal antibodies).

1977- Woese và Fox thừa nhận Vi khuẩn cổ (Archaea) là một nhóm vi sinh vật riêng biệt. Gilbert và Sanger triển khai kỹ thuật giải trình tự ADN (DNA sequencing)

1979- Tổng hợp Insulin bằng kỹ thuật tái tổ hợp ADN. Chính thức ngăn chặn được bệnh đậu mùa.

1980- Phát triển kính hiển vi điện tử quét

1982- Phát triển vaccin tái tổ hợp chống viêm gan B.

1982-1983- Cech và Altman phát minh ra ARN xúc tác.

1983-1984- Gallo và Montagnier phân lập và định loại virus gây suy giảm miễn dịch ở người. Mulli triển khai kỹ thuật PCR (polymerase chain reaction).

1986- Lần đầu tiên ứng dụng trên người vaccin được sản xuất bằng kỹ thuật di truyền (vaccin viêm gan B).

1990- Bắt đầu thử nghiệm lần đầu tiên liệu pháp gen (gene-therapy) trên người.

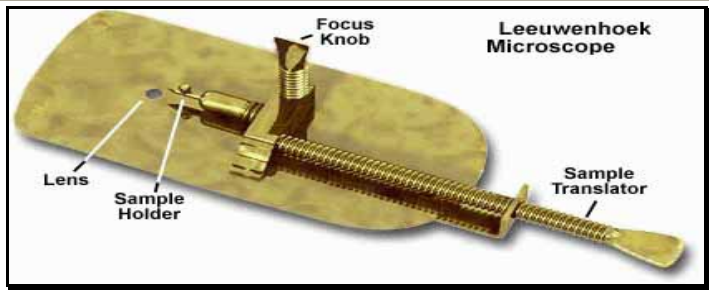
1992- Thử nghiệm đầu tiên trên người liệu pháp đối nghĩa (antisense therapy).

1995- Hoa Kỳ chấp thuận sử dụng vaccin đậu gà. Giải trình tự hệ gen của vi khuẩn *Haemophilus influenzae*.

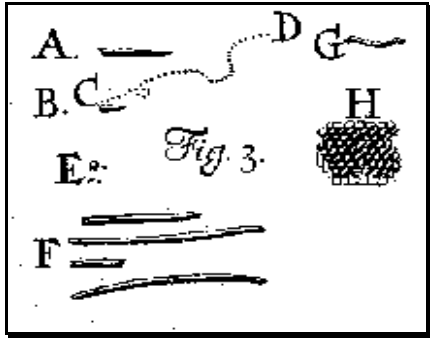
1996- Giải trình tự hệ gen của vi khuẩn *Methanococcus jannaschii*. Giải trình tự hệ gen nấm men.

1997- Phát hiện ra loại vi khuẩn lớn nhất *Thiomargarita namibiensis*; Giải trình tự hệ gen vi khuẩn *Escherichia coli*.

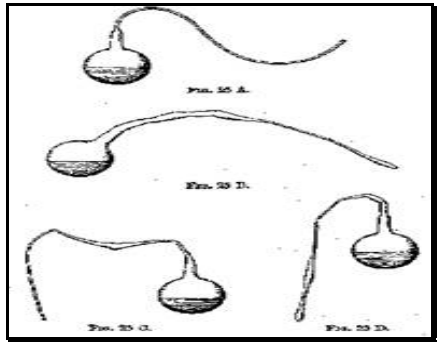
2000- Phát hiện ra vi khuẩn tả *Vibrio cholerae* có 2 nhiễm sắc thể riêng biệt.



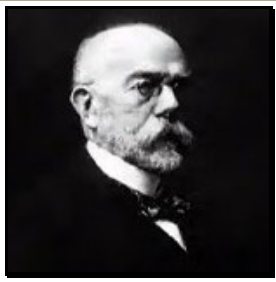
Kính hiển vi của Leeuwenhoek



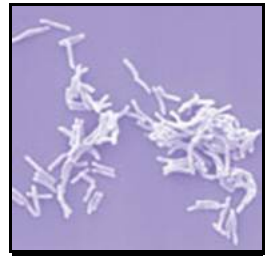
Bút tích miêu tả vi sinh vật của Leeuwenhoek



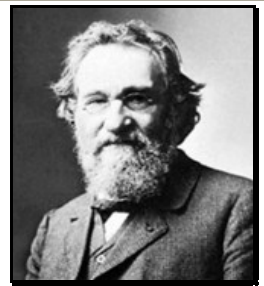
Thí nghiệm bình cổ cong để phân đối thuyết tự sinh (Pasteur)



Robert Koch (1843-1910)



Vi khuẩn lao chụp qua kính hiển vi



Elie Metchnikoff (1845-1916)



Alexander Fleming (1881-1955)



Nấm Penicillium sản sinh penicillin

SỰ XUẤT HIỆN CỦA KÍNH HIỂN VI

Vào năm 1609, Galileo -- người đầu tiên dùng viễn kính và những dụng cụ quang học để quan sát thiên văn; việc đó đã cổ vũ mọi người lao vào nghiên cứu.

- **Nhà tự nhiên học Hà lan, Jean Swammerdam** (1637- 1680) được coi là nhà giải phẫu vi thể lỗi lạc. Ông rất nổi tiếng nhờ những nghiên cứu giải phẫu về côn trùng và những bức vẽ chi tiết xuất sắc của mình. Sự phát hiện ra các tế bào cực nhỏ lơ lửng trong máu, làm cho máu có màu đỏ thuộc về Swammerdam (ngày nay ta gọi là hồng cầu hay eritroxit).

- **Nhà thực vật học Anh Griu** (1641-1712) nghiên cứu cấu tạo của thực vật dưới kính hiển vi và đặc biệt chú ý tới các cơ quan sinh sản. Ông đã mô tả cấu tạo của từng hạt phấn.

- **Nhà giải phẫu học Hà lan, Regnier de Graaf** (1641-1673) đã tiến hành nghiên cứu trên động vật. Ông đã nghiên cứu cấu tạo tinh vi của tinh hoàn và buồng trứng, nhất là mô tả dạng túi ở trong buồng trứng mà đến nay được gọi là nang Graf (bao trứng).

- Song những phát hiện của **nhà sinh lý học Ý, Maxrcello Malpighi** (1628 - 1694) là có giá trị xuất sắc nhất. Khi nghiên cứu phổi ếch, ông đã phát hiện ra mạng lưới phức tạp của những mạch máu nhỏ bé nhất (vi huyết quản). Sau khi theo dõi những mạch máu nhỏ ghép thành những mạch máu lớn, Malpighi đã khẳng định rằng những mạch máu lớn trong trường hợp này là tĩnh mạch, còn trường hợp khác là động mạch.

Giả thiết của Harvey là đúng: Động mạch và tĩnh mạch thật sự nối với nhau thành mạng lưới mạch máu cực kỳ nhỏ đến nỗi mắt thường không nom thấy được. Những mạch máu nhỏ bé đó gọi là mao mạch. Sự phát hiện vĩ đại đó khẳng định hoàn toàn học thuyết tuần hoàn máu của Harvey vào năm 1661 (bốn năm sau khi nhà bác học Anh vĩ đại đó từ trần).

Nhưng đem lại tiếng tăm cho kính hiển vi lại không phải là Malpighi mà là một nhà buôn Hà lan, **Anthony van Leeuwenhuck** (1632 - 1723) vì kính hiển vi là vật giải trí của ông.

Leeuwenhuck dùng những thấu kính bình thường có kích thước rất nhỏ được chế tạo bằng thứ thủy tinh tốt nhất. Ông hết sức thận trọng mài nhẵn thấu kính cho đến khi đạt đến độ phóng đại chính xác 200 lần. Nhờ thấu kính Leeuwenhuck đã quan sát được tất cả những gì mà ông có trong tay. Ông theo dõi dễ dàng sự chuyển động của máu trong mao mạch của nòng nọc và có thể mô tả những hạt máu đỏ và mao mạch một cách tỉ mỉ và chính xác hơn người đầu tiên phát hiện ra máu và mao mạch là Swammerdam và Malpighi. Lần đầu tiên một người giúp việc của Leeuwenhuck đã thấy trong tinh dịch có tinh trùng - vật thể nhỏ bé, giống như con nòng nọc.

Nhưng khi quan sát một giọt nước cống, Leeuwenhuck đã khám phá ra một điều kỳ lạ nhất trong đó có chứa những vật cực kỳ nhỏ nhưng tuy thế vẫn có đầy đủ dấu hiệu của sự sống. Đó là những tiểu động vật (theo Leeuwenhuck) mà ngày nay chúng ta biết đó là nguyên sinh vật. Một thế giới bí ẩn vô cùng phong phú đã hiện ra trước mắt ngạc nhiên của các nhà nghiên cứu. Như thế là đã đặt cơ sở cho môn vi sinh vật học (nghiên cứu những cơ thể sống không nom thấy được bằng mắt thường).

Năm 1683, Leeuwenhuck đã phát hiện ra những vật còn nhỏ hơn cả nguyên sinh động vật. Song sự mô tả những vật còn mơ hồ, vì thế không đủ bằng chứng để hoàn toàn tin tưởng rằng lần đầu tiên trong lịch sử loài người, Leeuwenhuck là người đã thấy những sinh vật mà sau này người ta gọi là vi khuẩn.

Việc cải tiến kính hiển vi của **R. Huc - nhà bác học Anh**, Robok Huc (1635 - 1703) đã cho phép hoàn thành nhiều thí nghiệm khoa học tinh vi. Năm 1665, ông đã xuất bản cuốn sách "Hiển vi học", trong đó có thể tìm thấy những bức vẽ phác họa những vật có kích thước hiển vi. Lý thú nhất là việc nghiên cứu cấu tạo của bác bản vì đã nêu rõ bác bản kết cấu bằng một khối những ô hình chữ nhật nhỏ bé, mà Huc gọi là các tế bào. Phát hiện này có những tiếng vang lớn.

Trong thế kỷ 17, kỹ thuật soi kính hiển vi nằm trong thời kỳ suy thoái: hiệu quả của kính hiển vi đạt tới giới hạn thấp. Chỉ vào năm 1773, gần 100 năm sau những quan sát đầu tiên của Leeuwenhuck, nhà động vật học Đanmạch, Otle Frederic Mule (1730 - 1784) mới thấy vi khuẩn rõ đến nỗi ông có thể mô tả đường nét và hình dạng của một số vi khuẩn.

HIỆN TƯỢNG TỰ SINH

Cách đó không lâu, người ta thấy những sinh vật giống như giun hoặc sâu sinh ra từ thịt thối hoặc trong chất cặn bã. Ở những chỗ dơ bẩn, hôi thối thường có nhiều ruồi muỗi. Ở chỗ tối tăm, góc ngách thường có nhiều chuột. Ở chỗ lá xanh non thường có nhiều sâu bọ. Sự "xuất hiện" vật sống từ vật chất không sống như vậy được gọi là hiện tượng tự sinh. Từ nhận xét đó, do trình độ có hạn, cho đến thế kỷ 16, người ta vẫn nghĩ rằng có hai cách sinh sản: Sinh sản từ bố mẹ và sinh sản từ môi trường, tức là tự nhiên sinh ra- hiện tượng tự sinh. Mà dòi của ruồi xuất hiện trong thịt thối là một ví dụ kinh điển.

Francesco Redi (1626 - 1698) thầy thuốc người Ý, thẩm nhuần quan điểm của Harvey bác bỏ cái thuyết "Thịt ôi sinh ra dòi" đã tiến hành thí nghiệm sau đây vào năm 1668: Lấy một tấm vải màn mỏng bọc kín thịt lại, không cho ruồi đến đậu vào thịt =>Thịt có ôi nhưng không thấy dòi xuất hiện trên thịt.

Nếu lấy trứng ruồi để lên vải màn đó rồi bỏ vào thịt => trứng đó lại sinh ra dòi. Như vậy theo Redi, mọi việc đã rõ ràng: Dòi chính là ấu trùng của ruồi. Thịt chẳng qua là cái tổ để dòi sống và phát triển mà thôi.

Cũng như vậy, vách đá là cái tổ ẩm ướt để cóc dễ dàng sinh sống vì ở đó có nhiều sâu bọ, môi trường ẩm ướt mát mẻ và kín đáo. Con bọ que sống được dễ dàng trên cây xanh vì ở đó có nhiều lá non và thức ăn tốt cho nó. Thế thôi! Làm gì có chuyện tự nhiên sinh ra! Muốn có chuột con phải có chuột cha mẹ. Chuột cha mẹ do chuột ông bà sinh ra. Cứ như thế chuột sinh sôi nảy nở từ thế hệ này đến thế hệ khác. Thuyết tự nhiên sinh ra rõ ràng là hoang đường và phản khoa học, phản thực tế.

Vấn đề tự sinh trở thành một bộ phận tranh luận tương đối rộng rãi, đặc biệt gay go trong cuối thế kỷ 18.

Đối với người duy vật cho rằng giới vô sinh và giới hữu sinh chỉ tuân theo một số quy luật nhất định thì vi sinh vật đặc biệt là lý thú vì chúng là cầu nối độc đáo giữa vật chất sống và vật chất không sống. Người sinh lực luận kể sau đó đã phủ nhận hoàn toàn khả năng tự sinh theo họ giữa những dạng sống đơn giản nhất và giới vô tri có một khoảng cách không thể vượt xa được. Nếu chứng minh được vi sinh vật được tạo thành từ vật chất không sống thì người ta đã xây xong nhíp cầu đó.

Nhưng trong suốt thế kỷ 17 chỗ đứng về vấn đề tự sinh của những người sinh lực luận và những người duy vật vẫn chưa được phân biệt rõ ràng, bởi vì đóng vai trò nhất định ở đây có cả những nguyên nhân tôn giáo. Đôi khi những người sinh lực luận, thường khá bảo thủ trong các vấn đề tôn giáo, đã buộc phải ủng hộ quan niệm vật chất sống phát triển từ vật chất không sống mà trong thánh kinh đã ghi chép.

Linh mục John Abbe Needham (1713 - 1781) Nhà tự nhiên học Anh, đã đi đến kết luận tương tự vào năm 1748. Ông đã làm thực nghiệm rất đơn giản bằng cách nấu sôi canh thịt cừ => rót canh vào ống nghiệm và đậy nắp lại => qua vài ngày vi sinh vật xuất hiện đầy trong canh thịt.

Nhà sinh học người Ý- Lazzaro Spallanzani (1729 - 1799) tỏ ra hoài nghi đối với thí nghiệm đó; ông giả thiết rằng trong thí nghiệm của Needham, thời gian đun sôi chưa đủ để khử trùng. Spallanzani đun sôi canh thịt trong bình hẹp cổ trong thời gian 30 - 40 phút và hàn miệng lại thì không thấy vi sinh vật xuất hiện nữa. Nhiều người cho rằng nguyên nhân chủ yếu không phải do cách ly với thế giới vi sinh vật bên ngoài mà là do cách ly với oxy không khí, một chất rất cần thiết cho quá trình tự sinh của vi sinh vật.

Để chấm dứt cuộc tranh luận gay gắt này, viện Hàn lâm khoa học Pháp đã treo giải thưởng lớn cho ai hoặc chứng minh, hoặc phủ nhận được thuyết tự sinh. Đến năm 1862 giải thưởng đã được trao cho Louis Pasteur về những thí nghiệm sắc xảo của ông. Pasteur đã đun dịch hữu cơ trong bình thủy tinh, sau đó kéo dài ống thành hình chữ S, không khí có thể đi từ ngoài vào nhưng tất cả bụi bặm mang theo vi sinh vật đều bị bám lại trên cổ hình chữ S. Chỉ khi nào đập vỡ cổ bình mới thấy có vi sinh vật phát triển trong dịch hữu cơ. Pasteur còn chứng minh được nếu lấy máu một cách vô trùng thì có thể giữ cho máu không bị thối ngay cả khi không đun nóng.

LOUIS PASTEUR (1822-1895) VÀ CÁC NGHIÊN CỨU CỦA ÔNG

Louis Pasteur sinh ngày 27/12/1822 ở Dole, một vùng của Jura, Pháp. Khám phá của ông cho rằng hầu hết các bệnh nhiễm trùng là do những mầm bệnh, mang tên "**Lý thuyết về mầm bệnh**", là một trong những khám phá quan trọng nhất trong lịch sử y học. Sự nghiệp của ông trở thành nền móng cho ngành vi sinh, và là cột mốc đánh dấu bước ngoặt của y học hiện đại.

Sự nghiệp của Pasteur

Mỗi khám phá trong sự nghiệp của Pasteur đều là những mắt xích của một chuỗi không tách rời bắt đầu bằng tính bất đối xứng phân tử và kết thúc bằng phòng bệnh dại, theo con đường nghiên cứu trên men, tằm, bệnh của rượu và bia, vô trùng và vaccin.

Từ tính thể học tới phân tử bất đối xứng

Năm 1847 ở tuổi 26, Pasteur tiến hành công trình đầu tiên về tính bất đối xứng phân tử, nêu lên cùng một lúc các nguyên lý của tính thể học, hóa học và quang học. Ông đã đề ra định luật cơ bản: tính bất đối xứng phân tử chia thế giới hữu cơ với thế giới vô cơ. Nói một cách khác, các phân tử bất đối xứng luôn là sản phẩm của sinh thể sống. Công trình của ông trở thành cơ sở cho một ngành khoa học mới - ngành hóa học lập thể.

Nghiên cứu sự lên men và sự tự sinh

Theo yêu cầu của một nhà sản xuất rượu tên là Bigo ở miền bắc nước Pháp, Pasteur bắt đầu nghiên cứu xem tại sao rượu lại bị nhiễm những chất ngoài ý muốn trong quá trình lên men. Ông đã sớm chứng minh được rằng mỗi giai đoạn của quá trình lên men đều liên quan với sự tồn tại của một loại vi sinh vật đặc thù hay con men - một sinh vật mà người ta có thể nghiên cứu bằng cách nuôi cấy trong một môi trường vô trùng thích hợp. Nhận định sáng suốt này là cơ sở của ngành vi sinh.

Pasteur đã giáng một đòn quyết định vào thuyết tự sinh, học thuyết đã từng tồn tại trong 20 thế kỷ cho rằng cuộc sống có thể tự nảy sinh từ những chất liệu hữu cơ. Ông cũng phát triển lý thuyết mầm bệnh. Cùng thời gian này, ông khám phá ra sự tồn tại của sự sống trong điều kiện không có oxy: "Lên men là hậu quả của sự sống không có không khí". Khám phá về sự sống yếm khí đã mở ra con đường nghiên cứu những mầm bệnh gây nhiễm trùng huyết và bệnh hoại thư, cùng với nhiều bệnh nhiễm trùng khác. Nhờ Pasteur, người ta có thể phát minh ra những kỹ thuật tiêu diệt vi khuẩn và kiểm soát ô nhiễm.

Kỹ thuật "tiệt trùng kiểu Pasteur"

Hoàng đế Napoleon III đã đề nghị Pasteur nghiên cứu những bệnh ảnh hưởng đến rượu đang gây thiệt hại cho ngành sản xuất rượu. Năm 1864, Pasteur tới khu vườn nho ở Arbois để nghiên cứu vấn đề này. Ông đã chứng minh rằng bệnh của rượu là do vi sinh vật gây ra, những vi sinh vật này có thể bị tiêu diệt bằng cách đun nóng rượu đến nhiệt độ 55°C trong vài phút. áp dụng cho bia và sữa, cách xử lý này, được đặt tên là "tiệt trùng kiểu Pasteur" đã nhanh chóng thông dụng trên khắp thế giới.

Nghiên cứu bệnh nhiễm trùng ở người và động vật

Năm 1865, Pasteur bắt đầu nghiên cứu những bệnh của tằm đang làm lụn bại ngành tằm tơ ở Pháp. Ông đã tìm ra tác nhân gây bệnh và cách lan truyền những tác nhân này - theo qui luật lây và di truyền - và cách ngăn ngừa bệnh. Bổ sung thêm nghiên cứu về sự lên men, giờ đây ông có thể khẳng định mỗi bệnh là do một vi khuẩn đặc trưng gây ra và những vi khuẩn này là những yếu tố ngoại lai. Với hiểu biết này, Pasteur có thể đặt ra những qui tắc cơ bản của tiệt trùng. Ngăn ngừa được lây nhiễm, phương pháp tiệt trùng của ông đã cách mạng hóa ngành ngoại khoa và sản khoa.

Từ năm 1877-1887, Pasteur vận dụng cơ sở vi sinh học vào cuộc chiến chống các bệnh nhiễm trùng. Ông tiếp tục tìm ra ba vi khuẩn gây bệnh cho người: tụ cầu, liên cầu và phế cầu.

Điều trị và phòng ngừa bệnh dại

Louis Pasteur đã tìm ra phương pháp làm yếu các vi sinh vật độc là cơ sở cho chúng ngừa. Ông đã phát triển các vaccin chống bệnh tả ở gà, bệnh than và bệnh lợn đốm đầu. Sau khi nắm vững phương pháp chủng ngừa, ông đã áp dụng khái niệm này vào bệnh dại. Ngày 6/7/1885, lần đầu tiên Pasteur đã thử phương pháp điều trị bệnh dại của mình cho người: bé Joseph Meister đã được cứu sống.

Thành lập Viện Pasteur

Ngày 1/3/1886, Pasteur trình bày kết quả phương pháp điều trị bệnh dại của ông trước Viện Hàn lâm Khoa học Pháp và kêu gọi thành lập một trung tâm vaccin dại. Đông đảo dân chúng và cộng đồng quốc tế đã vận động tài trợ cho việc xây dựng Viện Pasteur, một viện nghiên cứu tư đầu tiên được Tổng thống pháp Jules Gresvy công nhận năm 1887 và được người kế nhiệm ông là Sadi Carnot khánh thành năm 1888. Theo mong ước của Pasteur, Viện được xây dựng thành một cơ sở điều trị bệnh dại, một trung tâm nghiên cứu các bệnh nhiễm trùng và một trung tâm giảng dạy.

Nhà khoa học 66 tuổi đã dành trọn 7 năm cuối cùng của cuộc đời cho Viện nghiên cứu vẫn mang tên ông. Trong thời gian này, Pasteur cũng được hưởng niềm vui của danh tiếng và được tôn vinh khắp thế giới bằng những huân huy chương có uy tín.

Niên biểu về một số cống hiến quan trọng của L. Pasteur về vi sinh vật học

Năm	Cống hiến
1854-1864	Chứng minh nhiều quá trình lên men (etylic, lactic, acetic...) là do VSV gây nên
1862	Nhận giải thưởng đặc biệt của Viện hàn lâm khoa học Pháp về việc phủ định học thuyết tự sinh
1863	Chứng minh vi khuẩn là nguồn gốc của bệnh than
1865	Phát hiện ra nguyên nhân của bệnh bào tử trùng ở tằm và đề xuất các biện pháp phòng tránh
1877	Phát hiện các phẩy khuẩn gây bệnh
1880	Phát hiện tụ cầu khuẩn gây bệnh
1880	Phát hiện các liên cầu khuẩn gây bệnh
1880	Tìm ra vaccine chống bệnh dịch tả gà nhờ sử dụng vi khuẩn đã chuyển sang dạng mất động lực
1880	Phát hiện não mô cầu khuẩn (cùng với Chamberland, Roux và Thuillier)
1881	Tìm ra vaccine chống bệnh than
1883	Phát hiện tụ huyết khuẩn lợn (cùng với Thuillier)
1880-1885	Nghiên cứu vaccine chống bệnh dại. Ngày 6/7/1885, em bé 9 tuổi Joseph Meister là người đầu tiên được cứu sống nhờ vaccine chống dại của Pasteur
1888	Trở thành viện trưởng đầu tiên của Viện Pasteur ở Paris (cho đến khi qua đời)

Con người của tự do và nghiêm ngặt

Sự nghiệp của Pasteur không phải đơn giản là phép cộng những khám phá của ông. Nó còn tiêu biểu cho cuộc cách mạng phương pháp luận khoa học. Pasteur đặt lên trên hết hai nguyên tắc không thể bàn cãi của nghiên cứu hiện đại: tự do sáng tạo nhất thiết phải đi với thử nghiệm nghiêm ngặt. Ông dạy các học trò của mình: "Đừng có đưa ra điều gì mà anh không thể chứng minh bằng thực nghiệm"

Louis Pasteur là người theo chủ nghĩa nhân văn, luôn luôn làm việc theo hướng cải thiện địa vị của con người. Ông là một người tự do chưa bao giờ ngập ngừng khi nhận những vấn đề mà trong thời đại của ông người ta vẫn thường cho rằng chúng sẽ thất bại.

Ông đặc biệt coi trọng việc phổ biến kiến thức và ứng dụng nghiên cứu. Trong cuộc đời của một nhà khoa học, lý thuyết và phương pháp Pasteur đã được đưa vào thực tiễn vượt xa khỏi biên giới nước Pháp.

Nhận thức đầy đủ tầm quan trọng quốc tế của sự nghiệp ông, các học trò của Pasteur đã đi khắp thế giới tới bất cứ nơi nào cần đến sự giúp đỡ của họ. Năm 1881, Viện Pasteur ngoài nước Pháp đầu tiên được thành lập ở Sài gòn (nay là Thành phố Hồ Chí Minh, Việt Nam), mở đầu cho mạng lưới các Viện Pasteur quốc tế.

Ông đã làm thay đổi vĩnh viễn thế giới, tổ quốc quê hương ông và cả thế giới luôn coi ông là một ân nhân của nhân loại.

Sự tiến bộ của nhân loại

"Tôi cầu khẩn các bạn dành sự quan tâm cho những lãnh địa thiêng liêng rất nhạy cảm có tên là các phòng thí nghiệm. Mong sao những lãnh địa này sẽ nhiều hơn và chúng sẽ được tô điểm để trở thành những ngôi đền của tương lai, của thịnh vượng và sức khỏe. Đây là nơi nhân loại sẽ lớn lên, vững mạnh và hoàn thiện. ở đây, loài người sẽ học cách đọc được sự phát triển và sự hài hòa cá nhân trong những công việc của tự nhiên, trong khi công việc của chính loài người lại thường man rợ, cuồng tín và phá hoại" - Louis Pasteur

ROBER KOCH

Heinrich Hermann Robert Koch (1843 -1910) là một bác sĩ và nhà sinh học người Đức. Ông nổi tiếng như một người đã tìm ra trực khuẩn bệnh than (1877), trực khuẩn lao (1882) và vi khuẩn bệnh tả (1883) đồng thời là người đã phát biểu nguyên tắc Koch. Ông đã được trao giải Nobel dành cho Sinh lý và Y học cho các công trình về bệnh lao vào năm 1905. Ông cũng được coi là một trong số những người đặt nền móng cho vi khuẩn học.

Tiểu sử

Robert Koch sinh vào ngày 11 tháng 12 năm 1843 tại Clausthal, trên núi Upper Harz, Đức. Là con trai của một người kĩ sư mỏ, ông làm bố mẹ phải kinh ngạc khi nói với họ rằng ông đã tự học đọc bằng một tờ báo. Đó là dấu ấn đầu tiên về sự thông minh và tính kiên trì về mặt phương pháp – những đức tính đã theo ông trong suốt cuộc đời sau này. Ông học ở một trường cấp 3 địa phương (trường Gymnasium). Ở đó ông đã thể hiện mối quan tâm tới sinh học, và cũng như bố, ham muốn mạnh mẽ đi du lịch khám phá.

Năm 1862, Koch tới Đại học Göttingen để học y khoa. Tại đây, Koch bị ảnh hưởng bởi tư tưởng của giáo sư môn giải phẫu học là Friedrich Gustav Jakob Henle về bệnh truyền nhiễm là do những loài sinh vật sống kí sinh (luận điểm này đã được xuất bản vào năm 1840).

Bệnh than vào thời đó đang xuất hiện trong các trang trại chăn nuôi ở tỉnh Wollstein và Koch, mặc dù không có công cụ nghiên cứu khoa học nào và còn bị tách biệt với thư viện và giới khoa học, đã lao vào nghiên cứu bệnh này bất chấp sức ép từ công việc bận rộn của ông. Phòng thí nghiệm của ông là căn nhà 4 phòng và cũng chính là nhà ông, còn dụng cụ nghiên cứu của ông, ngoài cái kính hiển vi vợ ông tặng, đều do ông tự trang bị. Trước đó thì trực khuẩn than đã được tìm ra bởi Pollender, Rayer và Davaine; và Koch đặt ra mục tiêu là chứng minh loài trực khuẩn này chính là tác nhân gây bệnh than.

Ông cấy vào chuột, bằng miếng gỗ tự chế, trực khuẩn than lấy từ lá lách của những động vật trong nông trại đã bị chết bởi bệnh than, và thấy rằng những con chuột này bị chết bởi trực khuẩn. Trong khi cùng lúc những con chuột được cấy bằng máu từ lách của những con vật nuôi khoẻ mạnh thì không bị mắc bệnh than. Điều này củng cố cho những nghiên cứu khác đã chứng minh rằng bệnh này có thể lây qua đường máu từ những con vật đã bị bệnh.

Nhưng điều đó chưa thoả mãn Koch. Ông còn muốn biết những con trực khuẩn than chưa bao giờ phát triển trong động vật thì có khả năng gây bệnh hay không. Để giải quyết vấn đề này, ông đã triết xuất pure culture của trực khuẩn bằng cách nuôi cấy chúng trong dịch lấy từ mắt bò. Bằng cách nghiên cứu, vẽ và chụp hình lại những môi trường nuôi cấy này, Koch đã ghi lại sự nhân lên của trực khuẩn và nhận thấy rằng điều kiện nuôi cấy không thích hợp với chúng, chúng đã tạo ra bào tử (spore) bên trong chúng để chống lại điều kiện bất lợi đặc biệt là thiếu ôxy, và khi điều kiện thuận lợi trở lại, bào tử có thể trở lại thành trực khuẩn. Koch nuôi trực khuẩn qua vài thế hệ trong pure culture và chỉ ra rằng cả khi chúng không hề lớn lên trong động vật thì chúng vẫn có khả năng gây bệnh than.

Kết quả của công việc lao khổ này đã được Koch trình bày cho Ferdinand Cohn, giáo sư thực vật học ở Đại học Breslau, người đã tổ chức một cuộc họp cùng với những đồng nghiệp của mình cùng làm chứng cho sự trình bày của Koch trong số đó có giáo sư Cohnheim, giáo sư về giải phẫu bệnh học. Cả Cohn và Cohnheim đều bị ấn tượng bởi công trình của Koch và khi Cohn, vào năm 1876, xuất bản công trình của Koch trong một tờ báo của ngành thực vật học mà ông làm biên tập viên thì Koch đã lập tức trở nên nổi tiếng. Tuy nhiên ông vẫn tiếp tục làm việc ở Wollstein 4 năm sau đó và trong thời gian đó đã tiến bộ hơn nhiều trong kĩ năng cố định, nhuộm và chụp hình vi khuẩn đồng thời nghiên cứu thêm một số công trình quan trọng nữa về bệnh gây ra bởi vi khuẩn trong các vết thương, và xuất bản công trình vào năm 1878. Trong những công trình này ông đã nêu lên, cũng như những gì ông đã làm với bệnh than, bản chất khoa học và thực nghiệm cho cách kiểm soát những bệnh truyền nhiễm đó.

Tuy nhiên Koch vẫn còn thiếu điều kiện cho công việc của ông và phải tới năm 1880, khi ông được bổ nhiệm làm thành viên của Reichs-Gesundheitsamt (Cục Y tế Hoàng gia) ở Berlin, thì ông mới được cung cấp đầu tiên là một phòng hẹp, thiếu thốn nhưng sau đó là một phòng thí nghiệm đầy đủ hơn, trong đó ông đã làm việc với các phụ tá là



R. Koch.

Loeffler, Gaffky và những người khác. Ở đây, Koch tiếp tục hoàn thiện phương pháp nghiên cứu vi khuẩn mà ông đã dùng ở Wollstein. Ông phát minh ra phương pháp mới Reinkulturen – cấy pure culture của vi khuẩn vào môi trường nuôi cấy rắn như khoai tây, hay thạch đựng trong một loại đĩa đặc biệt phát minh bởi đồng nghiệp của ông là Julius Richard Petri, mà tới nay nó vẫn được sử dụng phổ biến. Ông cũng phát minh ra một phương pháp nhuộm vi khuẩn mới làm chúng dễ nhìn hơn và giúp xác minh chúng. Kết quả của những công trình này là sự mở đầu cho phương pháp nghiên cứu vi khuẩn gây bệnh trong đó vi khuẩn có thể dễ dàng tách ra trong pure culture, không nằm trong cơ thể sinh vật và vì vậy chúng có thể được xác định.

Koch cũng đặt ra tiêu chuẩn, được biết đến như nguyên tắc Koch (Koch's postulate). Để chấp nhận một vi khuẩn nào đó là nguyên nhân gây ra một bệnh nhất định hay không thì tất cả tiêu chuẩn của "nguyên tắc Koch" cần được thoả mãn.

Hai năm sau khi tới Berlin, Koch phát hiện ra trực khuẩn lao và phương pháp nuôi cấy nó trên pure culture. Năm 1882, ông xuất bản công trình kinh điển của ông về trực khuẩn. Ông vẫn tiếp tục bận rộn nghiên cứu cho tới khi ông được cử tới Ai Cập vào năm 1883 với vai trò Chủ tịch Ủy ban về bệnh tả của Đức, để điều tra về dịch tả đang bùng phát ở đó. Ở đây ông đã phát hiện ra vi khuẩn vibrio là nguyên nhân gây bệnh tả và mang được pure culture của vi khuẩn này về Đức. Ông cũng nghiên cứu cả vi khuẩn tả ở Ấn Độ.

Trên cơ sở những kiến thức của ông về đặc điểm sinh học và sự phân bố của vi khuẩn tả, Koch đã hệ thống hoá nguyên tắc để kiểm soát dịch tả và điều đó đã được chấp thuận bởi Quyền tối cao ở Dresden vào năm 1893 và nó đã trở thành nền móng cho việc kiểm soát dịch tả ngày nay. Công trình của ông về bệnh tả đã được nhận giải thưởng 100 ngàn mark Đức đồng thời cũng có ý nghĩa quan trọng trong việc có kế hoạch bảo vệ nguồn nước sinh hoạt.

Năm 1885, Koch được phong Giáo sư về vệ sinh học của Đại học Berlin và Giám đốc của Viện vệ sinh mới được thành lập lúc đó tại trường này. Năm 1890 ông được phong thượng tướng và người có đặc quyền (Freeman) của thành phố Berlin. Năm 1891 ông trở thành Giáo sư Danh dự của khoa Y ở Berlin và Giám đốc Viện các bệnh truyền nhiễm, nơi ông đã may mắn gặp được những đồng nghiệp như Ehrlich, von Behring và Kitasato, cũng là những nhà phát minh nổi tiếng. Năm 1893, Koch cưới người vợ thứ hai là Hedwig Freiberg.

Trong thời gian này, Koch quay lại với những nghiên cứu về bệnh lao. Ông cố gắng hãm lại quá trình phát triển bệnh bằng chất mà ông gọi là tuberculin, được làm từ môi trường nuôi cấy trực khuẩn lao. Ông chuẩn bị các mẫu tuberculin, mới và cũ, và sự thông báo về mẫu tuberculin cũ đã gây rất nhiều tranh cãi. Khả năng chữa trị của chất này theo như những gì Koch tuyên bố là một sự thổi phồng, và bởi vì hi vọng từ nó không được thoả mãn, dư luận quay ra chống lại nó và chống lại Koch. Chất tuberculin mới được Koch công bố vào năm 1896 và khả năng chữa trị của nó cũng làm thất vọng mọi người; nhưng nó đã dẫn tới sự phát hiện của một chất có giá trị về mặt chẩn đoán.

Trong khi công trình về tuberculin vẫn tiếp tục, đồng nghiệp của ông ở Viện về các bệnh truyền nhiễm là von Behring, Ehrlich và Kitasato nghiên cứu và xuất bản công trình mang tính bước ngoặt của họ về sự miễn dịch của bệnh bạch hầu.

Năm 1896, Koch tới Nam Phi để nghiên cứu nguyên nhân của bệnh dịch virut Rinde (rinderpest) và mặc dù ông không tìm được nguyên nhân, ông cũng đã thành công trong việc hạn chế sự bùng phát của bệnh dịch bằng cách tiêm cho những con gia súc khoẻ mạnh mật lấy từ túi mật của những con đã bị bệnh. Rồi sau đó là các nghiên cứu ở Ấn Độ và châu Phi về sốt rét, sốt rét tiểu đen (blackwater fever), bệnh xura (surra) ở gia súc, ngựa và bệnh dịch hạch và xuất bản những quan sát của ông về các bệnh này vào năm 1898. Không lâu sau khi quay lại Đức, ông lại được cử tới Ý và vùng nhiệt đới nơi ông xác nhận công trình của Ronald Ross về sốt rét và làm được một số công việc có ích trong nghiên cứu về nguyên nhân của các dạng khác nhau của sốt rét và việc kiểm soát nó bằng thuốc kí ninh.

Trong những năm cuối của cuộc đời, Koch đi tới kết luận là trực khuẩn gây bệnh lao ở người và bò là khác nhau và tuyên bố của ông về điều này tại Hội nghị Y học quốc tế về Lao ở Luân Đôn năm 1901 đã gây ra nhiều tranh cãi, nhưng bây giờ thì quan điểm đầy của ông đã được công nhận là đúng. Công trình nghiên cứu của ông về bệnh sốt Rickettsia đã dẫn đến ý tưởng mới, rằng căn bệnh này được truyền dễ dàng từ người sang người hơn là từ nước uống, và vì thế dẫn đến phương pháp kiểm soát bệnh mới.

Tháng 12 năm 1904, Koch được cử tới vùng Đông Phi của người Đức để nghiên cứu bệnh sốt ở Bờ Biển Đông trên gia súc và ông đã tiến hành những quan sát quan trọng, không chỉ với dịch bệnh này mà còn với những loài gây bệnh Babesia và Trypanosome và bệnh xoắn khuẩn spirochaet có nguồn gốc lây truyền qua ve, bọ; và tiếp tục công việc của ông trên những sinh vật này khi ông trở về nhà.

Koch là người đã nhận rất nhiều giải thưởng và huân chương, học vị tiến sĩ danh dự của Đại học Heidelberg và Bologna, công dân danh dự của thành phố Berlin, Wollstein và quê hương ông Clausthal, thành viên danh dự của giới khoa học hàn lâm ở Berlin, Wien, Posen, Perugia, Napoli và New York. Ông cũng được huân chương danh dự Đức (German Order of the Crown), Bắc đầu bội tinh của German Order of the Red Eagle (lần đầu tiên giải thưởng cao quý này được trao cho một người trong ngành Y) và huân chương của Nga và Thổ Nhĩ Kỳ. Rất lâu sau khi ông mất, ông còn được ghi công bằng tượng đài kỉ niệm và nhiều hình thức khác ở một số nước.

Năm 1905, ông nhận được giải thưởng Nobel dành cho Sinh lý và Y học. Năm 1906, ông quay lại Trung Phi để nghiên cứu về việc kiểm soát bệnh trùng mũi khoan (trypanosomiasis), và ở đó ông đã báo cáo rằng atoxyl có tác dụng chống lại bệnh này giống như thuốc kí ninh đối với sốt rét. Sau đó Koch tiếp tục công việc thực nghiệm về vi khuẩn học và huyết thanh học.

Bác sĩ Koch mất ngày 27 tháng 5 năm 1910 tại Baden-Baden.

PHÂN LOẠI VI SINH VẬT

Vi sinh vật thuộc giới sinh vật nào?

Vi sinh vật không phải là một nhóm phân loại trong sinh giới mà là bao gồm tất cả các sinh vật có kích thước hiển vi, không thấy rõ được bằng mắt thường, do đó phải sử dụng kính hiển vi thường hoặc kính hiển vi điện tử. Ngoài ra muốn nghiên cứu vi sinh vật người ta phải sử dụng tới phương pháp nuôi cấy vô khuẩn.

Từ trước đến nay có rất nhiều hệ thống phân loại sinh vật. Các đơn vị phân loại sinh vật nói chung và vi sinh vật nói riêng đi từ **thấp lên cao** là **Loài** (Species), **Chi** (Genus), **Họ** (Family), **Bộ** (Order), **Lớp** (Class), **Ngành** (Phylum), và **Giới** (Kingdom). Hiện nay trên giới còn có một mức phân loại nữa gọi là **lĩnh giới** (Domain). Đây là chưa kể đến các mức phân loại trung gian như **Loài phụ** (Subspecies), **Chi phụ** (Subgenus), **Họ phụ** (Subfamily), **Bộ phụ** (Suborder), **Lớp phụ** (Subclass), **Ngành phụ** (Subphylum).

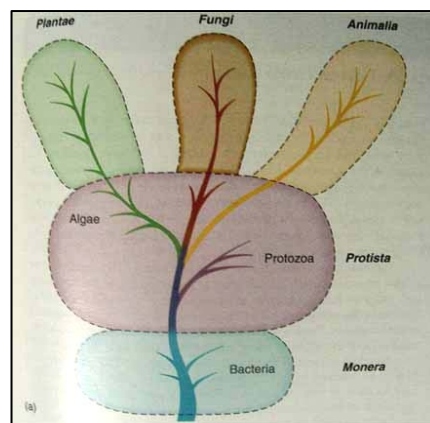
Trước đây John Ray (1627-1705) và Carl Von Linnaeus (1707-1778) chỉ chia ra 2 giới là Thực vật và Động vật. Năm 1866 E. H. Haeckel (1834-1919) bổ sung thêm giới Nguyên sinh (Protista).

Năm 1969 R. H. Whittaker (1921-1981) đề xuất hệ thống phân loại 5 giới: Khởi sinh (Monera), Nguyên sinh (Protista), Nấm (Fungi), Thực vật (Plantae) và Động vật (Animalia) (hình

Khởi sinh bao gồm Vi khuẩn (Bacteria) và Vi khuẩn lam (Cyanobacteria).

Nguyên sinh bao gồm Động vật nguyên sinh (Protozoa),

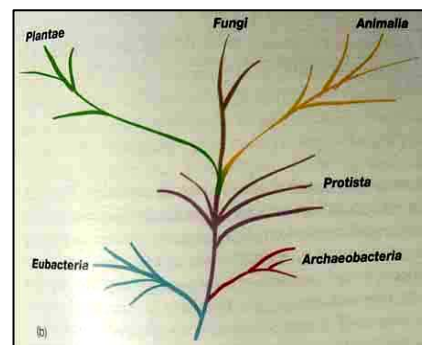
Tảo (Algae) và các Nấm sợi sống trong nước (Water molds).



Hình: Hệ thống phân loại 5 giới sinh vật

Gần đây hơn có hệ thống phân loại 6 giới- như 5 giới trên nhưng thêm giới Cổ vi khuẩn (Archaeobacteria), giới Khởi sinh đổi thành giới Vi khuẩn thật (Eubacteria) (P. H. Raven, G. B. Johnson, 2002).

Hình: Hệ thống phân loại 6 giới sinh vật



T. Cavalier-Smith (1993) thì lại đề xuất hệ thống phân loại 8 giới:

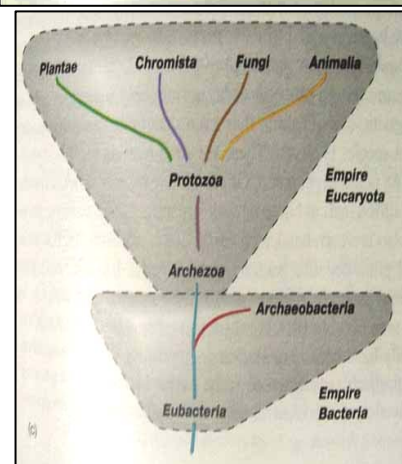
- Vi khuẩn thật (Eubacteria),
- Cổ vi khuẩn (Archaeobacteria),
- Cổ trùng (Archezoa),
- Sắc khuẩn (Chromista),
- Nấm (Fungi),
- Thực vật (Plantae) và
- Động vật (Animalia).

Theo R. Cavalier-Smith thì cổ trùng (như Giardia) bao gồm các cơ thể đơn bào nguyên thủy có nhân thật, có ribosom 70S, chưa có bộ máy golgi, chưa có ty thể (mitochondria) chưa có thể diệp lục (chloroplast), chưa có peroxisome.

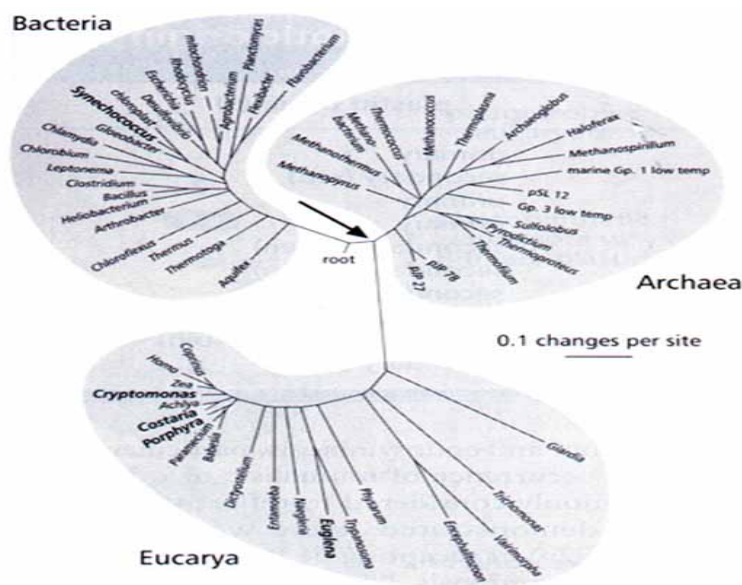
Hình: Hệ thống phân loại 8 giới sinh vật

Sắc khuẩn bao gồm phần lớn các cơ thể quang hợp chứa thể diệp lục trong các phiến (lumen) của mạng lưới nội chất nhẵn (rough endoplasmic reticulum) chứ không phải trong tế bào chất (cytoplasm), chẳng hạn như Tảo silic, Tảo nâu, Cryptomonas, Nấm mốc.

Năm 1980, Carl R. Woese dựa trên những nghiên cứu sinh học phân tử phát hiện thấy Cổ khuẩn có sự sai khác lớn trong trật tự nucleotid ở ARN của ribosom 16S và 18S. Ông đưa ra hệ thống phân loại ba lĩnh giới (Domain) bao gồm



- Cổ khuẩn (Archae),
- Vi khuẩn (Bacteria) và
- Sinh vật nhân thực (Eucarya).



Hình: Hệ thống 3 lĩnh giới (domain)

Monera hay 2 lĩnh giới Vi khuẩn và Cổ khuẩn thuộc nhóm Sinh vật nhân sơ (Prokaryote), còn các sinh vật khác đều thuộc nhóm Sinh vật nhân thật (Eukaryote). Sai khác giữa 3 lĩnh giới Bacteria, Archaea và Eucarya được trình bày trong bảng dưới đây:

Đặc điểm	Bacteria	Archaea	Eucarya
Nhân có màng nhân và hạch nhân	Không	Không	Có
Phức hợp bào quan có màng	Không	Không	Có
Thành tế bào	Hầu hết có peptidoglycan chứa acid muramic	Nhiều loại khác nhau, không chứa acid muramic	Không chứa acid muramic
Màng lipid	Chứa liên kết este, các acid béo mạch thẳng	Chứa liên kết ete, các chuỗi aliphatic phân nhánh	Chứa liên kết este, các acid béo mạch thẳng
Túi khí	Có	Có	Không
ARN vận chuyển	Thymine có trong phần lớn tARN tARN mở đầu chứa N-formylmethionine	Không có thymine trong nhánh T hoặc TyC của tARN tARN mở đầu chứa methionine	Có thymine tARN mở đầu chứa methionine
mARN đa cistron	Có	Có	Không
Intron trong mARN	Không	Không	Có
Ghép nối, gắn mũ và gắn đuôi polyA vào mARN	Không	Không	Có

Cổ khuẩn là nhóm vi sinh vật có nguồn gốc cổ xưa. Chúng bao gồm các nhóm vi khuẩn có thể phát triển được trong các môi trường cực đoan (extra), chẳng hạn như nhóm ưa mặn (Halobacteriales), nhóm ưa nhiệt (Thermococcales, Thermoproteus, Thermoplasmatales), nhóm kỵ khí sinh metan (Methanococcales, Methanobacteriales, Methanomicrobiales), nhóm vi khuẩn lưu huỳnh ưa nhiệt (Sulfobales, Desulfurococcales).

Monera trong hệ thống 5 giới tương đương với Vi khuẩn và Cổ khuẩn trong hệ thống 8 giới và trong hệ thống 3 lĩnh giới. Nguyên sinh trong hệ thống 5 giới tương đương với 3 giới Cổ trùng (Archaezoa), Nguyên sinh (Protista-Protozoa) và Sắc khuẩn (Chromista) trong hệ thống 8 giới và tương đương với 5 nhóm sau đây trong hệ thống 3 lĩnh giới (domain): Archaezoa, Euglenozoa, Alveolata, Stramenopila và Rhodophyta.

Theo hệ thống 3 lĩnh giới thì Archaezoa bao gồm Diplomonad, Trichomonad và Microsporidian. Euglenozoa ao

gồm Euglenoid và Kinetoplastid. Alveolata bao gồm Dinoflagellate, Apicomplexan, và Ciliate. Strmenopila bao gồm Tảo silic (Diatoms), Tảo vàng (Golden algae), Tảo nâu (Brown algae) và Nấm sợi sống trong nước (Water mold). Rhodophyta gồm các Tảo đỏ (Red algae). Riêng Tảo lục (Green algae) thì một phần thuộc Nguyên sinh (Protista) một phần thuộc Thực vật (Plantae)

Phần lớn vi sinh vật thuộc về ba nhóm cổ khuẩn, vi khuẩn và nguyên sinh. Trong giới nấm, thì nấm men (yeast), nấm sợi (filamentous fungi) và dạng sợi (mycelia) của mọi nấm lớn đều được coi là vi sinh vật. Như vậy là vi sinh vật không có mặt trong hai giới động vật và thực vật. Người ta ước tính trong số 1,5 triệu loài sinh vật có khoảng 200 000 loài vi sinh vật (100 000 loài động vật nguyên sinh và tảo, 90 000 loài nấm, 2500 loài vi khuẩn lam và 1500 loài vi khuẩn). Tuy nhiên hàng năm, có thêm hàng nghìn loài sinh vật mới được phát hiện, trong đó có không ít loài vi sinh vật.

Virus là một dạng đặc biệt chưa có cấu trúc cơ thể cho nên chưa được kể đến trong số 200 000 loài vi sinh vật nói trên. Số virus đã được đặt tên là khoảng 4000 loài.

PHÂN LOẠI VI SINH VẬT THEO Linnaeus

Phân loại theo nhà tự nhiên học Thụy điển Carl Linnaeus

a. Sơ lược tiểu sử của Linnaeus(1707 - 1778)

Linnaeus sinh ngày 23- 5- 1707 ở Thụy Điển. Ngay từ khi còn học tiểu học và trung học, Linnaeus đã không chăm chỉ học bài ở lớp, ở trường bằng mãi mê quan sát thu thập các mẫu vật về cây cỏ, hoa, lá, quả...ở ngoài trời, trong thiên nhiên. Lúc 8 tuổi người ta đã gọi đùa Linnaeus là " Nhà thực vật trẻ ".

Năm 20 tuổi, Linnaeus vào học ở trường Y và ba năm sau, năm 1730, được giữ lại trường làm phụ giảng. Năm năm sau, năm 1735, ông bảo vệ thành công luận án tiến sĩ Y khoa tại Hàlan. Sau đó, trong ba năm liền, ông lần lượt học thêm ở Đức, Đanmạch, Anh và Pháp, là những trung tâm văn hóa lớn thời đó.

Năm 1738 ông trở về quê để theo đuổi nghề thầy thuốc. Năm 1741, lúc 34 tuổi ông được cử làm giáo sư đại học. Từ đó tới lúc mất, ông kết hợp giảng dạy, nghiên cứu và biên soạn tài liệu khoa học.

Linnaeus mất năm 1778, thọ 71 tuổi

b. Công trình khoa học của Linnaeus:

Năm 1732, khoảng thời gian này, người ta đã biết ít nhất là 70.000 loài, sau khi đi ngang qua vùng phía Bắc bán đảo Scandinever, vùng được coi là không có điều kiện thuận lợi đối với sự phồn thịnh của khu hệ động và thực vật, trong một thời gian ngắn Linne đã phát hiện gần 100 loài cây mới. Linnaeus đã nghiên cứu các cơ quan sinh sản của thực vật, và có chú ý đến những sai khác về loài. Sau này trên cơ sở đó ông đã xây dựng hệ thống phân loại của mình. Năm 1735 Linnaeus đã xuất bản cuốn sách "Hệ thông của tự nhiên " trong đó trình bày hệ thống phân loại của giới động vật và thực vật do ông lập ra, gồm 4 nhóm từ nhỏ đến lớn là: **Loài (chi (bộ (lớp**. Hệ thống này được coi là ông tổ của hệ thống phân loại hiện đại. Chính Linnaeus là người sáng lập ra Khoa học phân loại (Taxonomy hay là Systematics) nghiên cứu sắp xếp các loài sinh vật.

Ví dụ: Linnaeus chia giới thực vật thành 24 lớp, giới động vật thành 6 lớp. Đóng góp lớn nhất của Linnaeus đối với công tác phân loại là đã nghĩ ra được một cách đặt tên sinh vật rất chặt chẽ và thuận tiện. Mỗi sinh vật được gọi bằng hai tên của tiếng Latinh, **tên đầu viết hoa, chỉ Chi (Genus), tên sau viết thường, chỉ Loài (Species)**. Chẳng hạn trong chi mèo Felis có mèo nhà: Felis domesticus, sư tử: Felis Leo, cọp: Felis Tigris.

Từ năm 1746 đến năm 1753, trong bảy năm. Linnaeus đã soạn và in thêm quyển "Thực vật chí", trình bày các chia khóa và kết quả phân loại thực vật. Việc phân loại chủ yếu dựa trên các ngoại hình, dễ thấy và dễ nhận dạng nhất giữa các sinh vật.

Chìa khóa phân loại đó có nhược điểm lớn nhất là chưa tính được các khác biệt về kích thước, hình dáng ngoài xuất hiện do các giai đoạn phát triển khác nhau (trứng, sâu, nhộng, ngài...), hoặc chế độ dinh dưỡng khác nhau (nhất là đối với thực vật). Chẳng hạn Ốc sên thuộc Chi Cerion ở quần đảo Caribe đã được phân loại thành 600 trăm loài, nhưng xét kỹ lưỡng thì chỉ gồm có... hai Loài! Một hạn chế nữa của Linnaeus là đã phân loại sinh vật theo quan

điềm Thượng để sáng tạo muôn loài bất biến qua thời gian. Tuy nhiên, Linnaeus đã nhận ra sai lầm của mình và tự ý bác bỏ các phần liên quan đến quan điểm bất biến.

Hiện nay, thế giới vẫn chấp nhận rộng rãi và trong những nét cơ bản phương pháp phân loại của Linnaeus, như trình bày trong bản tái bản lần thứ 10 quyển hệ thống tự nhiên (1758), gồm 1384 trang. Sinh vật được chia thành các nhóm từ lớn đến nhỏ: Giới (Lớp (Bộ (Chi (Loài. Các nhóm trung gian được gọi là phụ. Nay ta thêm Ngành giữa Giới và Lớp. Chẳng hạn, trong giới động vật có Ngành động vật không xương sống và Ngành động vật có xương sống. Mỗi Ngành lại bao gồm nhiều Lớp. Chẳng hạn, Ngành động vật có xương sống gồm năm Lớp: cá, ếch nhái, bò sát, chim và thú.

Ngoài ra, người ta còn thêm Họ vào giữa Bộ và Chi. Ví dụ: cây cải bắp, su hào, su lơ, cải xanh... đều thuộc Họ cải.

Sau đó hệ thống phân loại của Linnaeus đã được R.H Whitaker cải tiến thêm một lần nữa vào năm 1969 và gồm 5 giới sinh vật: Sinh vật có nhân nguyên thủy, nguyên sinh vật, thực vật, nấm và động vật. Đó là hệ thống phân loại được thừa nhận rộng rãi nhất ngày nay.

CHƯƠNG 1-VI SINH VẬT NHÂN SƠ

Mục đích: Giới thiệu nhóm vi sinh vật nhân sơ, trong đó đề cập đến hai đại diện cơ bản của nhóm này, đó là vi khuẩn và xạ khuẩn. Giới thiệu hình thái, cấu tạo, sinh sản, phân loại của 2 đại diện chính này.

VI KHUẨN

Trong phần này sử dụng vi khuẩn theo nghĩa hẹp, nghĩa là không bao gồm xạ khuẩn (Actinomycetes), niêm vi khuẩn (Myxobacteriales), xoắn thể (Spirochaetales), Rickettsias và Mycoplasmas.

Một số đặc điểm chung của vi khuẩn:

- Vi khuẩn nhỏ và đơn giản về mặt cấu trúc khi được so sánh với sinh vật nhân chuẩn, tuy nhiên chúng thường có hình dạng và kích thước đặc trưng.
- Tế bào chất thường chứa một vài thành phần không có màng bao bọc như thể vùi, riboxom và thể nhân mang vật chất di truyền của nó.
- Thành tế bào nhân sơ hầu như luôn chứa peptidoglican - một thành phần hoá học phức tạp (dựa vào đây để phân biệt vi khuẩn gram âm và gram dương)
- Các thành phần như lớp màng nhày, tiên mao và khuẩn mao nằm phía ngoài thành tế bào và có những chức năng đặc biệt (đây cũng là những đặc điểm sử dụng để phân loại và định tên vi khuẩn).
- Một số vi khuẩn có khả năng sinh nội bào tử nếu cơ thể đến một giai đoạn sinh trưởng phát triển nào đó hoặc để chống lại một số các điều kiện bất lợi của môi trường.

1. Hình thái, kích thước của vi khuẩn

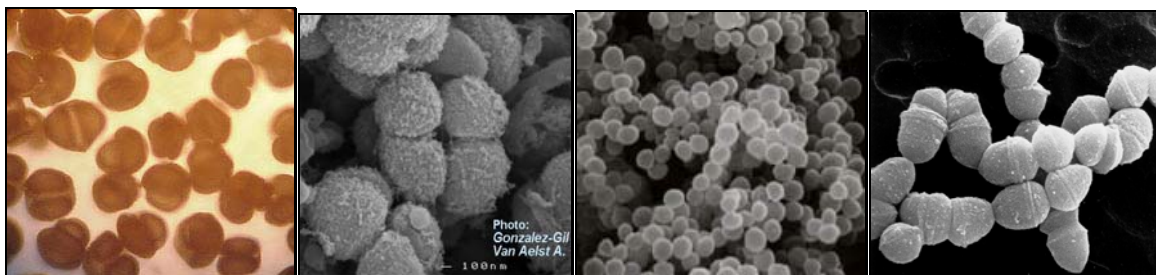
Dựa vào hình thái bên ngoài của vi khuẩn, người ta chia chúng ra làm ba loại: cầu khuẩn, trực khuẩn, xoắn khuẩn. Giữa ba loại này còn có các dạng hình thái trung gian như cầu trực khuẩn, phẩy khuẩn.

Cầu khuẩn: là loại vi khuẩn có hình cầu, tuy nhiên một số có hình ngọn nến (phế cầu khuẩn) hoặc hình hạt cà phê (lậu cầu khuẩn).

Kích thước của cầu khuẩn thay đổi từ 0.5-1 μm

Cầu khuẩn có các đặc tính như: không hình thành bào tử, không có cơ quan di động.

Dựa vào khả năng sắp xếp tế bào sau khi phân cắt mà người ta lại chia thành các loại như: đơn cầu khuẩn, song cầu khuẩn (*Diplococcus*), tứ cầu khuẩn (*Tetracoccus*), bát cầu khuẩn (*Sarcina*), liên cầu khuẩn (*Streptococcus*) và tụ cầu khuẩn (*Staphylococcus*).



Diplococcus

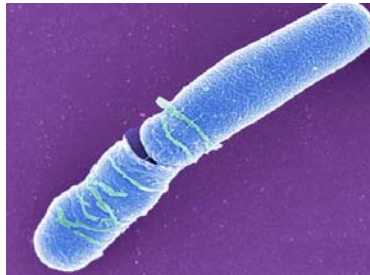
Sarcina

Staphylococcus

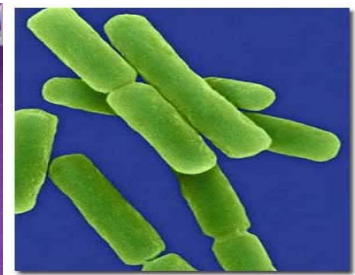
Streptococcus

Trực khuẩn: Là tên chung để chỉ tất cả các vi khuẩn có hình que. Kích thước khoảng 0.5-1 x 1-4 μm . Các loại trực khuẩn thường gặp thuộc về các giống sau:

- **Bacillus (Bac.):** trực khuẩn gram dương, sinh bào tử, chiều ngang của bào tử không vượt quá chiều ngang của tế bào nên khi có bào tử, tế bào không bị biến dạng. Thường thuộc loại hiếu khí hoặc kỵ khí không bắt buộc. Đa số gây bệnh. Ví dụ bệnh nhiệt thán (*B. anthracis*), ngộ độc thức ăn (*B. cereus*), làm hỏng thực phẩm (*B. coagulans*)



B. anthracis



B. cereus

- **Escherichia:** Các trực khuẩn gram âm, không sinh bào tử, cơ thể thường có chu mao, gồm các giống *Samonella*, *Shigella*, *Escherichia*, *Serratia*...



E. coli



Shigella spp.

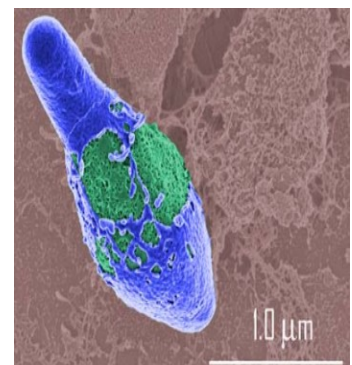
- **Pseudomonas (Ps.):** trực khuẩn gram âm, không sinh bào tử, có một tiên mao hoặc một chùm tiên mao mọc ở đỉnh, thường sinh sắc tố. Một số làm hỏng thực phẩm (*Ps. fluorescens*), một số gây bệnh ở người.

Một số giống khác cũng có hình thái tương tự giống này là *Xanthomonas*, *Photobacterium*, *Azotomonas*, *Nitrobacter*...



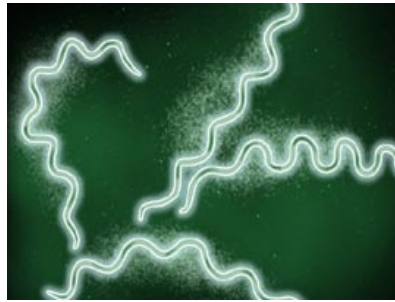
Pseudomonas

- **Clostridium (Cl.):** trực khuẩn gram dương, kích thước từ 0.5-1x3-8 μm , sinh bào tử, chiều ngang của bào tử thường lớn hơn chiều ngang tế bào do đó thường làm cho vi khuẩn có hình thoi hay hình dùi trống. Thường thuộc loại kỵ khí bắt buộc. Có những loài có ích như *Cl. pasteurianum*. Có những loài gây bệnh như trực khuẩn uốn ván *Cl. tetani*, trực khuẩn gây ngộ độc thức ăn *Cl. botulinum*.



Cl. Botulinum

Xoắn khuẩn (*Spirillum*): gồm tất cả vi khuẩn có từ hai vòng xoắn trở lên, gram dương, di động được nhờ một hay nhiều tiên mao mọc ở đỉnh. Có kích thước thay đổi từ 0.5-3x5-40µm. Đa số là các loài sống hoại sinh. Hình thái trung gian giữa xoắn khuẩn và trực khuẩn là phẩy khuẩn (vi khuẩn có 1 vòng xoắn)



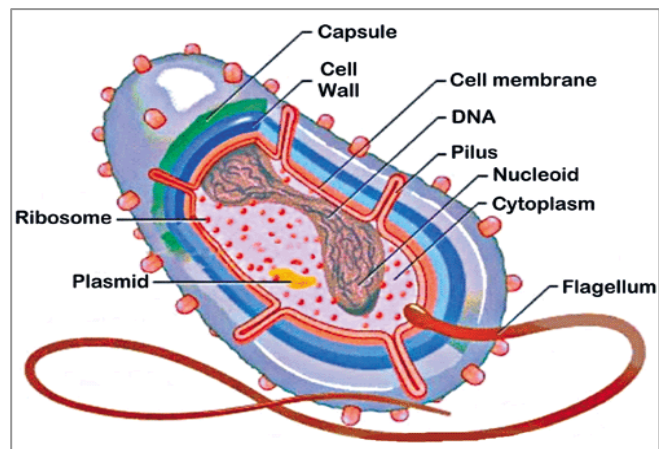
Xoắn khuẩn *Treponema pallidum* gây bệnh giang mai



Phẩy khuẩn *V. cholera* gây bệnh tả

2. Cấu tạo tế bào vi khuẩn (xem phim)

Tế bào vi khuẩn được cấu tạo bởi các phần bắt buộc như thành TB, màng TB, nguyên sinh chất, thể nhân. Ngoài ra một số loài còn được cấu tạo bởi những thành phần không bắt buộc như lớp vỏ nhày, tiên mao, khuẩn mao và nội bào tử.



2.1. Thành tế bào (cell wall)

Thành tế bào vi khuẩn có kích thước khác nhau tùy loại, nhìn chung vi khuẩn gram dương có thành tế bào dày hơn, khoảng 14-18nm.

Vai trò:

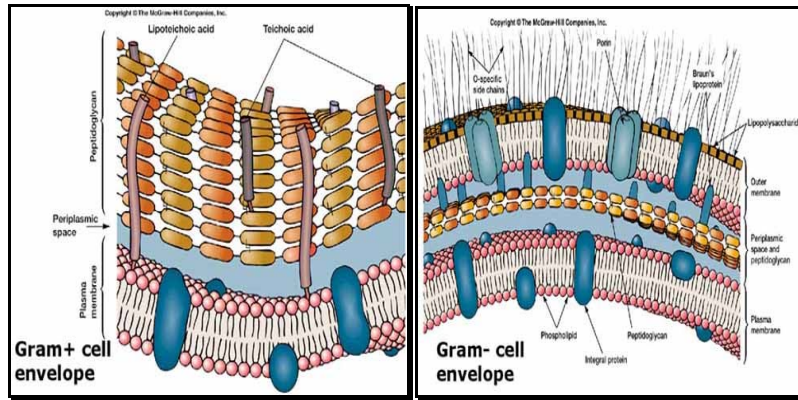
Thành tế bào giúp duy trì hình thái của tế bào, hỗ trợ sự chuyển động của tiên mao (flagellum), giúp tế bào đề kháng với áp suất thẩm thấu, hỗ trợ quá trình phân cắt tế bào, cản trở sự xâm nhập của một số chất có phân tử lớn, liên quan đến tính kháng nguyên, tính gây bệnh, tính miễn cảm với thực khuẩn thể (bacteriophage).

Cấu tạo và thành phần hoá học:

Năm 1884 H.Christian Gram đã nghĩ ra phương pháp nhuộm phân biệt để phân chia vi khuẩn thành 2 nhóm khác nhau: vi khuẩn Gram dương (G+) và vi khuẩn Gram âm (G-).

Phương pháp nhuộm Gram về sau được sử dụng rộng rãi khi định loại vi sinh vật. Thành phần hoá học của 2 nhóm này khác nhau chủ yếu như sau:

	Gram dương	Gram âm
Thành phần	Tỷ lệ % đối với khối lượng khô của thành tế bào	
Peptidoglycan	30-95	5-20
Acid teicoic (Teichoic acid)	Cao	0
Lipid	Hầu như không có	20
Protein	Không có hoặc có ít	Cao



Hình: Thành tế bào vi khuẩn (a) Gram dương (b) Gram âm

2.2. Màng nguyên sinh chất (CM-cell membrane) (protoplasmic membrane, plasma membrane):

Bên dưới lớp thành tế bào là lớp màng nguyên sinh chất, dày khoảng $50-100\text{\AA}$ và chiếm khoảng 10-15% khối lượng tế bào vi khuẩn.

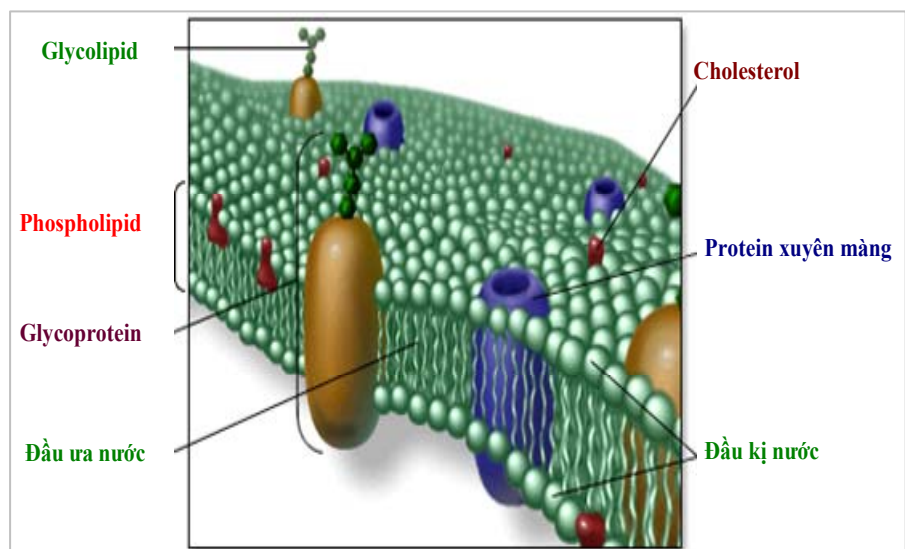
Vai trò:

- Không chế sự qua lại của các chất dinh dưỡng, các sản phẩm trao đổi chất
- Duy trì áp suất thẩm thấu bình thường trong tế bào.
- Là nơi sinh tổng hợp các thành phần của thành tế bào và các polyme của bao nhày (capsule).
- Là nơi tiến hành quá trình phosphoryl oxy hoá và quá trình phosphoryl quang hợp (ở vi khuẩn tự dưỡng quang năng)
- Là nơi tổng hợp nhiều enzym, các protein của chuỗi hô hấp.
- Cung cấp năng lượng cho sự hoạt động của tiên mao.

Cấu tạo:

Màng sinh chất hay màng tế bào chất ở vi khuẩn cũng tương tự như ở các sinh vật khác. Chúng

cấu tạo bởi 2 lớp phospholipid (PL) (chiếm 30-40% khối lượng của màng) và các protein (nằm trong, ngoài hay xen giữa màng, chiếm 60-70% khối lượng của màng). Đầu phosphat của PL tích điện, phân cực, ưa nước; đuôi hydrocarbon không tích điện, không phân cực, kỵ nước.



Hình: Màng nguyên sinh chất của tế bào vi khuẩn

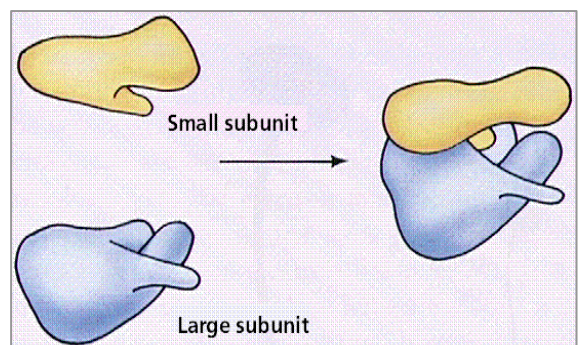
2.3. Tế bào chất (Cytoplasm)

Tế bào chất là phần chính của tế bào vi khuẩn, chứa tới 80% là nước, là khối chất keo có tính chất dị thể (gồm nhiều tương phân tán, các hạt keo có kích thước cơ bản khác nhau) nằm bên trong màng sinh chất. Trạng thái phân tán của keo luôn biến đổi vào điều kiện môi trường và hoạt động sống của tế bào.

Khi còn non, tế bào chất có cấu tạo đồng nhất và bắt màu giống nhau khi nhuộm màu. Khi già, do xuất hiện không bào và các thể ẩn nhập mà TBC trở nên lộn nhon, bắt màu không đều và có tính chiết quang khác nhau.

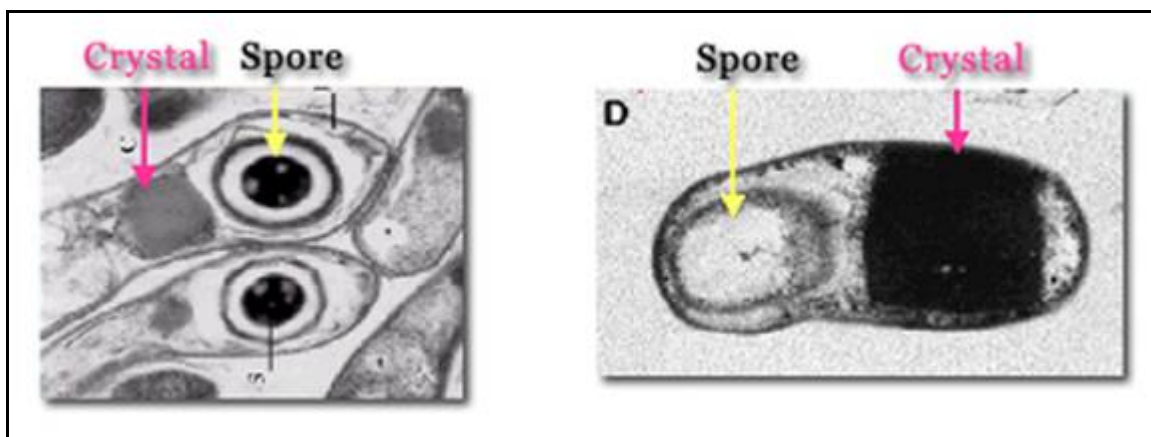
Cấu tạo:

Trong tế bào chất có protein, acid nucleic, hydrat carbon, lipid, các ion vô cơ và nhiều nhiều chất khác có khối lượng phân tử thấp. Bào quan đáng lưu ý trong TBC là riboxom (ribosome). Riboxom nằm tự do trong tế bào chất và chiếm tới 70% trọng lượng khô của TBC. Riboxom gồm 2 tiểu phần (50S và 30S), hai tiểu phần này kết hợp với nhau tạo thành ribosom 70S. S là đơn vị Svedberg- đại lượng đo tốc độ lắng khi ly tâm cao tốc.



Trong tế bào chất của vi khuẩn còn có thể gặp các chất dự trữ như các hạt glycogen, hạt PHB (Poly- β -hydroxybutyrat), cyanophycin, phycocyanin, các hạt dị nhiễm sắc (metachromatic body), các giọt lưu huỳnh...

Ở loài vi khuẩn diệt côn trùng *Bacillus thuringiensis* và *Bacillus sphaericus* còn gặp tinh thể độc (parasporal body) hình quả trám, có bản chất protein và chứa những độc tố có thể giết hại trên 100 loài sâu hại (tinh thể độc chỉ giải phóng độc tố trong môi trường kiềm do đó các vi khuẩn này hoàn toàn vô hại với người, gia súc, gia cầm, thủy hải sản-có hại đối với tằm). *Bacillus sphaericus* có thể diệt cung quăng của các loài muỗi.

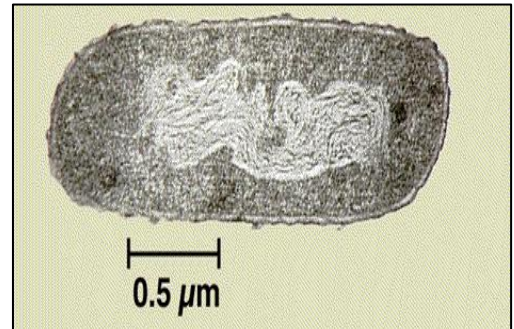


Hình: Bào tử (spore) và Tinh thể độc (Crystal) ở *Bacillus thuringiensis* (trái) và *Bacillus sphaericus* (phải).

2.4. Thể nhân (Nuclear body)

Vi khuẩn không có màng nhân, đó là một 1 nhiễm sắc thể duy nhất dạng vòng chứa 1 sợi ADN xoắn kép (ở xạ khuẩn *Streptomyces* có thể gặp nhiễm sắc thể dạng thẳng), thường không kết hợp với protein histon. Vì tế bào vi khuẩn chưa có màng nhân nên còn được gọi là tế bào nhân sơ. Ngoài ra ở một số vi khuẩn còn có AND ngoài NST với dạng vòng nhỏ khép kín, có khả năng sao chép độc lập được gọi là plasmid.

Thể nhân là bộ phận chứa đựng thông tin di truyền của vi khuẩn.



Hình: Thể nhân trong tế bào vi khuẩn *E coli*

2.5. Bao nhầy (Capsule)

Bao nhầy hay giáp mạc gặp ở phía ngoài một số loài vi khuẩn. Có nhiều mức độ khác nhau:

- Bao nhầy mỏng (vi giáp mạc, microcapsule)
- Bao nhầy (giáp mạc, capsule)
- Khối nhầy (zooglea)

Cấu tạo:

Thành phần chủ yếu của bao nhầy là polysaccharid, ngoài ra cũng có polypeptid và protein. Trong thành phần polysaccharid ngoài glucose còn có glucosamin, ramnose, acid 2-keto-3-deoxygalacturonic, acid uronic, acid pyruvic, acid acetic...

Vai trò:

-Bảo vệ vi khuẩn trong điều kiện khô hạn, bảo vệ vi khuẩn tránh bị thực bào (trường hợp phế cầu khuẩn-*Diplococcus pneumoniae*)

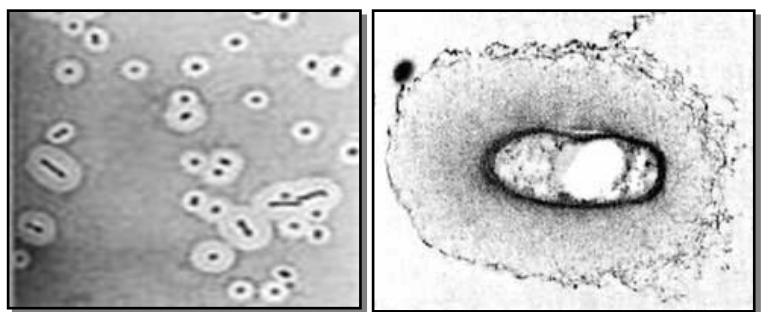
-Cung cấp chất dinh dưỡng cho vi khuẩn khi thiếu thức ăn

-Là nơi tích lũy một số sản phẩm trao đổi chất (dextran, xanthane...)

-Giúp vi khuẩn bám vào giá thể (trường hợp các vi khuẩn gây sâu răng như

Streptococcus salivarrius,
Streptococcus mutans...)

Vi khuẩn *Acetobacter xylinum* có bao nhầy cấu tạo bởi cellulose. Người ta dùng vi khuẩn này nuôi cấy trên nước dừa để chế tạo ra thạch dừa (Nata de coco).



Hình: Vi khuẩn *Acetobacter xylinum*

Vi khuẩn *Leuconostoc mesenteroides* có bao nhầy dày chứa hợp chất polyme là dextran có tác dụng thay huyết tương khi cấp cứu mà thiếu huyết tương. Sản phẩm này rất quan trọng khi có chiến tranh. Vi khuẩn này thường gặp ở các nhà máy đường và gây tổn thất đường trong các bể chứa nước ép mía. Nhờ enzym dextransucrase mà đường saccharose bị chuyển thành dextran và fructose.

Một số bao nhầy của vi khuẩn còn được dùng để sản xuất xantan (xanthane) dùng làm chất phụ gia trong công nghiệp dầu mỏ.

Muốn quan sát bao nhầy thường bôi lên tiêu bản với mực tàu, bao nhầy có màu trắng hiện lên trên nền tối.

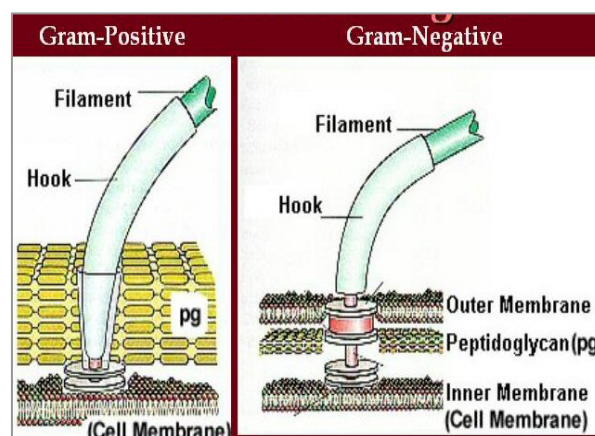
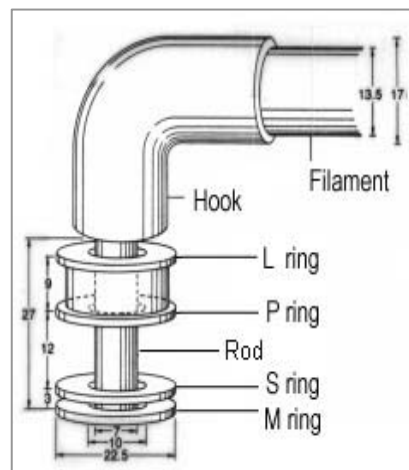
2. 6. Tiên mao (flagella)

Tiên mao (lông roi) là những sợi lông dài, không phải có mặt ở mọi vi khuẩn, chúng quyết định khả năng và phương thức di động của vi khuẩn.

Tiên mao có thể gốc (basal body), gồm 1 trụ nhỏ được gắn với 4 đĩa tròn (vi khuẩn G⁻) có dạng vòng nhẫn (ring), ký hiệu là các vòng L,P,S và M. Vòng L nằm ngoài cùng, tương ứng với lớp liposaccarid của màng ngoài; vòng P tương ứng với lớp peptidoglycan, vòng S tương ứng với lớp không gian chu chất; vòng M nằm ở trong cùng. Vi khuẩn G⁺ chỉ có 2 vòng: 1 vòng nằm ngoài tương ứng với thành tế bào và 1 vòng trong tương ứng với màng sinh chất. Xuyên giữa các vòng là 1 trụ nhỏ (rod) có đường kính 7nm. Bao bọc tiên mao ở phần phía ngoài là một bao ngắn có hình móc (hook). Sợi tiên mao (filament) dài khoảng 10-20μm và có đường kính khoảng 13-20nm. Đường kính của bao hình móc là 17nm. Khoảng cách giữa vòng S và vòng M là 3mm, giữa vòng P và vòng L là 9nm, giữa vòng P và vòng S là 12nm. Đường kính của các vòng là 22nm, đường kính các lỗ ở các vòng là 10nm.

Khoảng cách từ mặt ngoài của vòng L đến mặt trong của vòng M là 27nm. Sợi tiên mao cấu tạo bởi loại protein có tên là flagellin, có trọng lượng phân tử là 30.000-60.000. Một số vi khuẩn có bao lông (sheath) bao bọc suốt chiều dài sợi, như ở trường hợp chi *Bdellovibrio* hay vi khuẩn tả *Vibrio cholera*.

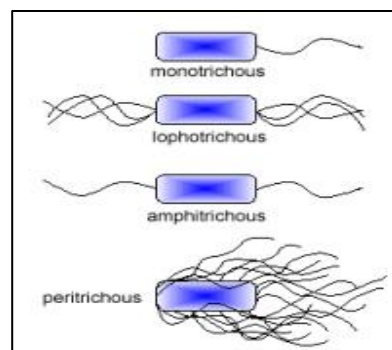
Các tiểu phần (subunit) của flagellin được tổng hợp từ các hạt riboxom nằm gần màng sinh chất và đi qua lỗ mà tạo dần thành sợi tiên mao.



Tiên mao vi khuẩn G⁺ Tiên mao vi khuẩn G⁻

Tiên mao của vi khuẩn có các loại khác nhau tùy từng loài:

- Không có tiên mao (vô mao, atrichia)
- Có 1 tiên mao mọc ở cực (đơn mao, monotricha)
- Có 1 chùm tiên mao mọc ở cực (chùm mao, lophotricha)
- Có 2 chùm tiên mao mọc ở 2 cực (song chùm mao, amphitricha)
- Có nhiều tiên mao mọc khắp quanh tế bào (chu mao, peritricha)
- Có loại tiên mao mọc ở giữa tế bào như trường hợp vi khuẩn *Selenomonas ruminantium*.



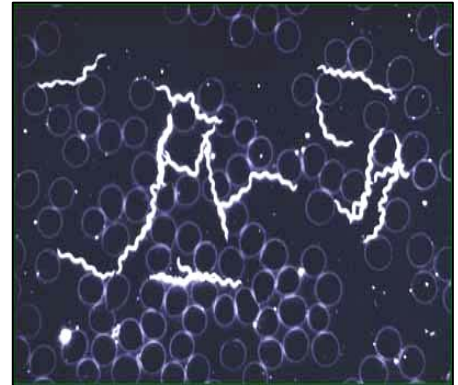
Hình: Các loại sợi tiên mao

Kiểu sắp xếp tiên mao liên quan đến hình thức di động của vi khuẩn. Tiên mao mọc ở cực giúp vi khuẩn di động theo kiểu tiến- lùi. Chúng đảo ngược hướng bằng cách đảo ngược hướng quay của tiên mao. Vi khuẩn chu mao di động theo hướng nào thì các tiên mao chuyển động theo hướng ngược lại. Khi tiên mao không tụ lại về một hướng thì vi khuẩn chuyển động theo kiểu nhào lộn. Tốc độ di chuyển của vi khuẩn có tiên mao thường vào khoảng 20-80 μm /giây, nghĩa là trong 1 giây chuyển động được một khoảng cách lớn hơn gấp 20-80 lần so với chiều dài của cơ thể chúng.

Các chi vi khuẩn thường có tiên mao là *Vibrio*, *Spirillum*, *Pseudomonas*, *Escherichia*, *Shigella*, *Salmonella*, *Proteus*... Ở các chi *Clostridium*, *Bacterium*, *Bacillus*,... có loài có tiên mao có loài không.

Xoắn thể có một dạng tiên mao đặc biệt gọi là tiên mao chu chất (periplasmic flagella), hay còn gọi là sợi trục (axial fibrils), xuất phát từ cực tế bào và quấn quanh cơ thể. Chúng giúp xoắn thể chuyển động được nhờ sự uốn vặn tế bào theo kiểu vặn nút chai.

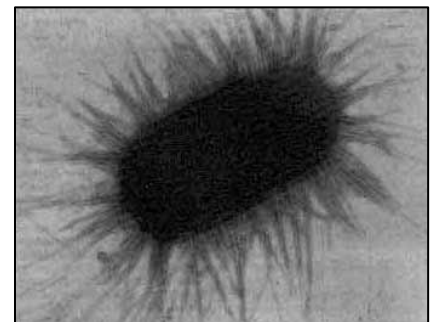
Hình: Xoắn thể (*Spirochete*) quan sát dưới kính hiển vi nền đen.



Để xác định xem vi khuẩn có tiên mao hay không còn có cách thử gián tiếp nhằm biết khả năng di động của chúng. Cây bằng que cấy nhọn đầu vào môi trường thạch đứng chứa 0.4% thạch (agar-agar), còn gọi là môi trường thạch mềm. Nếu thấy vết cấy lan nhanh ra xung quanh thì chứng tỏ là vi khuẩn có tiên mao, có khả năng di động.

2.7. Khuẩn mao và khuẩn mao giới tính (fimbriae, pili)

Khuẩn mao (hay tiêm mao, nhung mao) là những sợi lông rất mảnh, rất ngắn mọc quanh bề mặt tế bào nhiều vi khuẩn Gram âm. Chúng có đường kính khoảng 7-9nm, rỗng ruột (đường kính trong là 2-2,5nm), số lượng khoảng 250-300 sợi/vi khuẩn.



Kết cấu của khuẩn mao giản đơn hơn nhiều so với tiên mao. Chúng có tác dụng giúp vi khuẩn bám vào giá thể (nhiều vi khuẩn gây bệnh dùng khuẩn mao để bám chặt vào màng nhầy của đường hô hấp, đường tiêu hoá, đường tiết niệu của người và động vật).

Có một loại khuẩn mao đặc biệt gọi là khuẩn mao giới tính (sex pili, sex pilus-số nhiều), có thể gặp ở một số vi khuẩn với số lượng chỉ có 1-10/vi khuẩn. Nó có cấu tạo giống khuẩn mao, đường kính khoảng 9-10nm nhưng có thể rất dài. Chúng có thể nối liền giữa hai vi khuẩn và làm cầu nối để chuyển vật chất di truyền (ADN) từ thể cho (donor) sang thể nhận (recipient). Quá trình này được gọi là quá trình giao phối (mating) hay tiếp hợp (conjugation). Một số thực khuẩn thể (bacteriophage) bám vào các thụ thể (receptors) ở khuẩn mao giới tính và bắt đầu chu trình phát triển của chúng.

2.7. Bào tử (spore) và sự hình thành bào tử

Một số loài vi khuẩn, trong những giai đoạn phát triển nhất định có thể hình thành trong tế bào những thể hình tròn hay hình bầu dục gọi là bào tử. Bào tử thường gặp ở hai giống trực khuẩn gram dương là *Bacillus* và *Clostridium*. Một số rất ít các loại phẩy khuẩn (như *Desulfovibrio desulfuricans*), xoắn khuẩn (như *Spirillum volutans*, cầu khuẩn (như *Sarcina ureae*) cũng có khả năng sinh bào tử.

Khi hình thành bào tử, tế bào chất và chất nhân tập trung lại ở một vị trí nhất định trong tế bào. Tế bào chất tiếp tục được cô đặc và tạo thành tiền bào tử (prospore). Tiền bào tử được bao bọc bởi nhiều lớp màng và bắt đầu khác tế bào sinh dưỡng ở chỗ có tính chiết quang mạnh hơn. Tiền bào tử sẽ phát triển dần thành bào tử.

Bào tử lại được bao bọc bởi nhiều lớp màng. Ngoài cùng là lớp màng ngoài, tiếp đến là vỏ bào tử (gồm nhiều lớp, có tác dụng ngăn chặn sự thẩm thấu của nước và các chất hoà tan trong nước. Dưới vỏ là lớp màng trong của bào tử, trong cùng là khối tế bào chất có cấu tạo đồng nhất.

Thời gian cần thiết cho việc hình thành bào tử là khác nhau tùy từng loài vi khuẩn. Trung bình từ 4-8h, có khi kéo dài từ 18-20h.

Bào tử vi khuẩn khi đã chín rất khó bắt màu. Nó có khả năng chịu được điều kiện bất lợi của ngoại cảnh. Chịu được nhiệt độ cao, có tính ổn định cao đối với nhiệt độ thấp, các loại hoá chất cũng như các loại bức xạ.

3. Sinh sản của vi khuẩn (xem phim)

Vi khuẩn chỉ sinh sản vô tính (asexual reproduction), không sinh sản hữu tính.

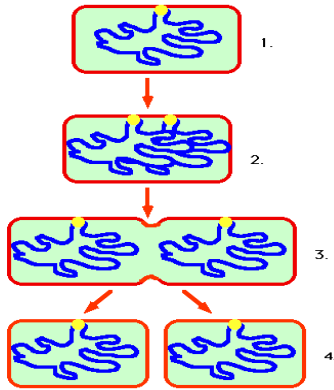
Chúng sinh sản bằng cách **phân đôi** (binary fission), hay trực phân. Trong quá trình này, một tế bào mẹ được phân thành 2 tế bào con bằng cách tạo vách ngăn đôi tế bào mẹ.

Tuy nhiên, mặc dù không có sinh sản hữu tính, những biến đổi di truyền (hay đột biến) vẫn xảy ra trong từng tế bào vi khuẩn thông qua các hoạt động tái tổ hợp di truyền. Do đó, tương tự như ở các sinh vật bậc cao, kết quả cuối cùng là vi khuẩn cũng có được một tổ hợp các tính như:

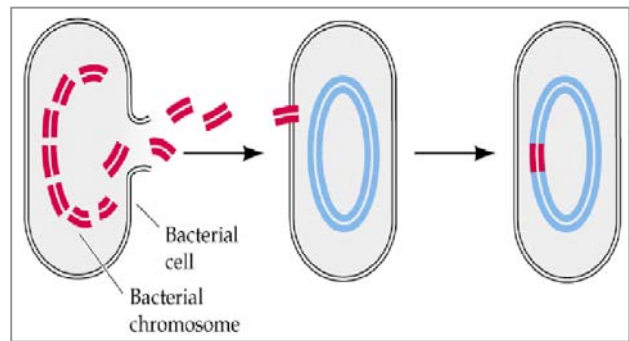
- **Biến nạp** (transformation): chuyển ADN trần từ một tế bào vi khuẩn sang tế bào khác thông qua môi trường lỏng bên ngoài, hiện tượng này gồm cả vi khuẩn chết
- **Tải nạp** (transduction): chuyển ADN của virus, vi khuẩn, hay cả virus lẫn vi khuẩn, từ một tế bào sang tế bào khác thông qua thể thực khuẩn (bacteriophage)
- **Giao nạp** (conjugation): chuyển ADN từ vi khuẩn này sang vi khuẩn khác thông qua cấu trúc protein gọi là pilus (khuẩn mao giới tính).

Vi khuẩn, sau khi nhận được ADN từ một trong những cách trên, sẽ tiến hành phân chia và truyền bộ gene tái tổ hợp cho thế hệ sau.

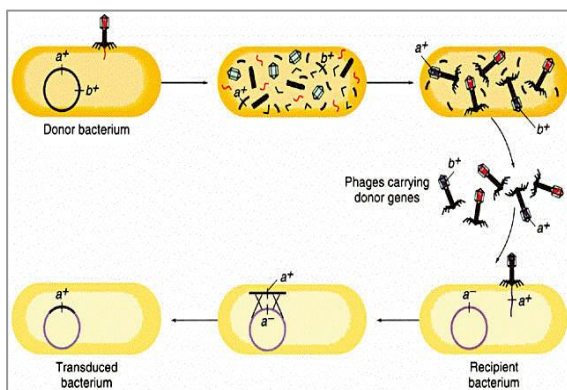
Lưu ý: Việc hình thành bào tử ở vi khuẩn không phải là hình thức sinh sản của chúng vì mỗi bào tử chỉ hình thành nên 1 vi khuẩn mà thôi.



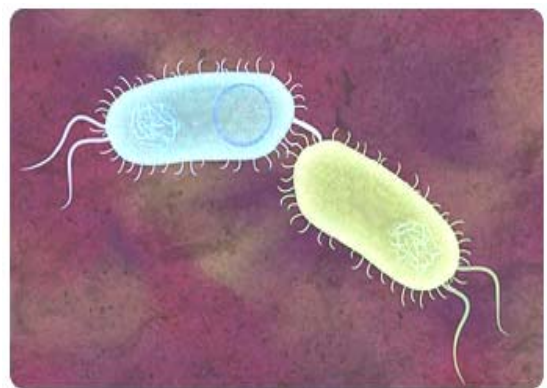
Hình thức phân đôi của vi khuẩn



Tái tổ hợp bằng biến nạp



Tái tổ hợp bằng tải nạp



Tái tổ hợp bằng giao nạp ở E.coli

4. Phân loại vi khuẩn *(bài đọc thêm)*

ĐỌC THÊM PHÂN LOẠI VI KHUẨN

Nguồn: www.thuvienkhoahoc.com/tusach/Đa_dạng_VSV

Vi khuẩn (Bacteria) theo nghĩa rộng bao gồm cả Vi khuẩn lam (Cyanobacteria), Xạ khuẩn (Actinomycete), Xoắn thể (Spirochete), v.v.. Theo hệ thống phân loại **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology** phiên bản tháng 5 năm 2004 thì lĩnh giới vi khuẩn thật (*eubacteria*) được chia thành **24** ngành (phylum) và lĩnh giới cổ khuẩn (*archae*) gồm **2** ngành.

- **Vi khuẩn thật**

Actinobacteria - Aquificae - Bacteroidetes - Chlorobi - Chlamydiae - Verrucomicrobia - Chloroflexi - Chrysiogenetes - Cyanobacteria - Deferribacteres – Deinococcus -Thermus - Dictyoglomi - Fibrobacteres - Acidobacteria - Firmicutes - Fusobacteria - Gemmatimonadetes - Nitrospirae - Planctomycetes - Proteobacteria - Spirochaetes - Thermodesulfobacteria - Thermomicrobia - Thermotogae

- **Cổ khuẩn**

1. Euryarchaeota
2. Crenarchaeota

VI KHUẨN Ở VIỆT NAM

- **Vi khuẩn gây bệnh cho người và gia súc ở Việt Nam bao gồm**

Chlamydia trachomatis (mắt hột), *Mycoplasma pneumoniae* (viêm phổi), *Treponema pallidum* (giang mai), *Borrelia recurrentis* (sốt hồi quy), *Leptospira spp.* (bệnh Leptose), *Rickettsia rickettsiae* (sốt mò), *Coxiella burnetii* (sốt Q), *Corynebacterium diphtheriae* (bạch hầu), *Mycobacterium tuberculosis* (lao), *Mycobacterium leprae* (phong/hủi), *Actinomyces spp.* (bệnh Actinomycose), *Bacillus anthracis* (than), *Clostridium tetani* (uốn ván), *Clostridium perfringens* (ngộ độc thịt), *Neisseria gonorrhoeae* (lậu), *Neisseria meningitidis* (viêm màng não vi khuẩn), *Diplococcus pneumoniae* (viêm phổi), *Staphylococcus aureus* (nhiễm khuẩn tụ cầu vàng), *Vibrio cholerae* (tả), *Helicobacter pylori* (viêm dạ dày- tá tràng), *Yersinia pestis* (dịch hạch), *Shigella spp.* (lỵ), *Salmonella typhi* (thương hàn), *Salmonella typhi-suis* (thương hàn lợn), *Escherichia coli* (ia chảy), *Pseudomonas aeruginosa* (nhiễm khuẩn mũ xanh), *Brucella spp.* (bệnh Brucellose), *Bordetella pertusis* (ho gà); *Enterobacter aerogenese*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris*, *Streptococcus spp.* (nhiễm khuẩn)...

- **Vi khuẩn cố định nitơ:** *Rhizobium spp.* và *Bradyrhizobium spp.* (trong nốt sần đậu, đỗ, lạc, muồng...), *Azotobacter spp.*, *Clostridium pasteurianum*...

- **Vi khuẩn thực phẩm và công nghiệp:** *Acetobacter aceti* (giấm), *Acetobacter xylinum* (thạch dừa), *Brevibacterium spp.* (bột ngọt, lizin...), *Lactobacillus spp.* (sữa chua), *Leuconostoc dextranicum* (dextran)...

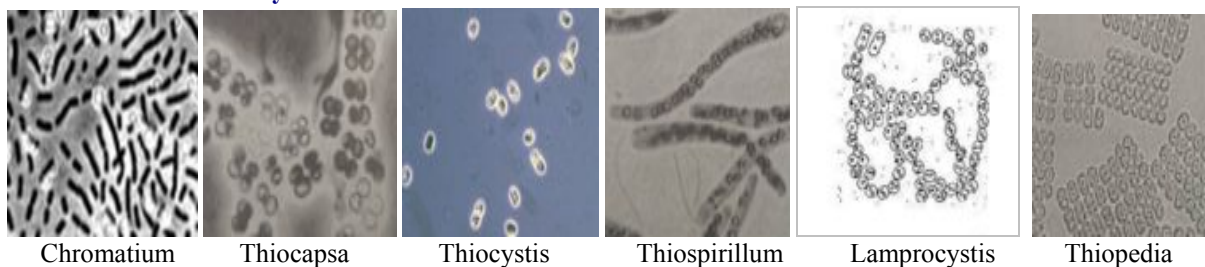
- **Vi khuẩn trừ sâu:** *Bacillus thuringiensis*

- **Vi khuẩn lam:** các chi *Chamaesiphon*, *Chroococcus*, *Gloeotheca*, *Gleocapsa*, *Prochloron*, *Fischerella*, *Stigonema*, *Geitlerinema*.

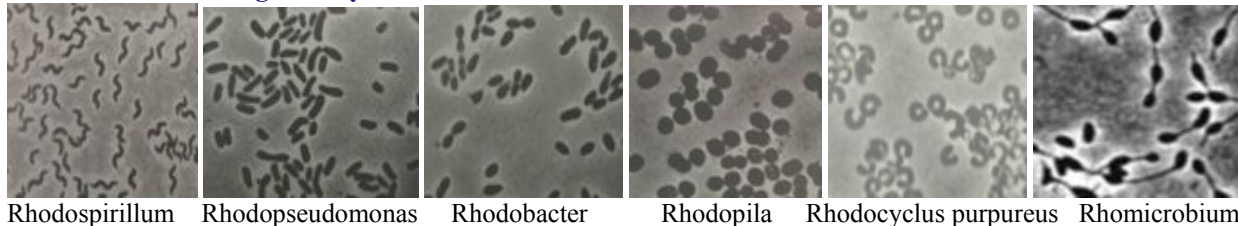
- **Xạ khuẩn:** Các chi đã phân lập ở Việt Nam gồm có: *Streptomyces*, *Actinoplanes*, *Micromonospora*, *Catenuloplanes*, *Kineosporia*, *Pseudonocardia*, *Actinosynnema*, *Amycolatopsis*, *Catellatospora*, *Couchioplanes*, *Nocardia*, *Streptosporangium*, *Nocardia*

Hình ảnh minh họa

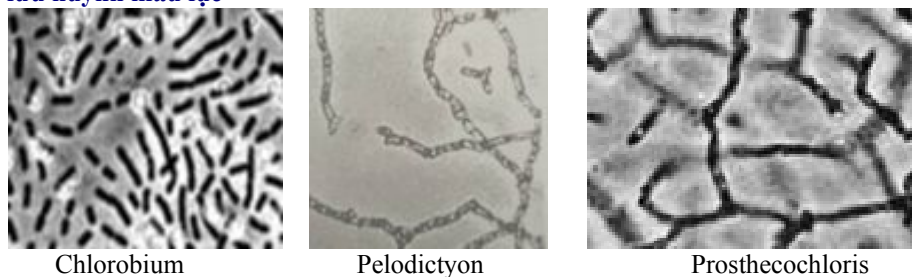
Nhóm Vi khuẩn lưu huỳnh màu tía



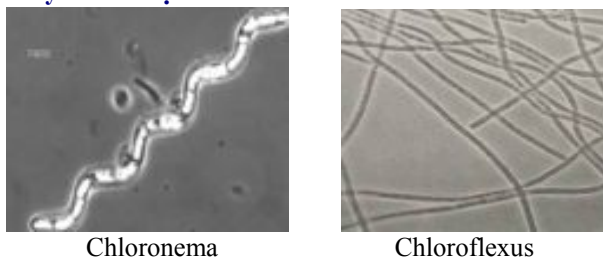
Nhóm Vi khuẩn không lưu huỳnh màu tía



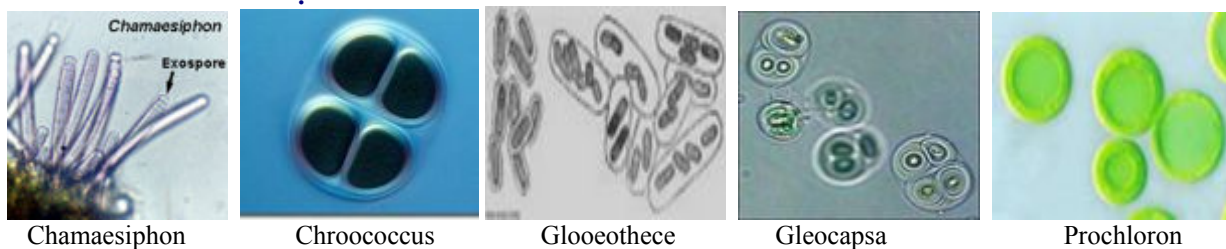
Nhóm Vi khuẩn lưu huỳnh màu lục



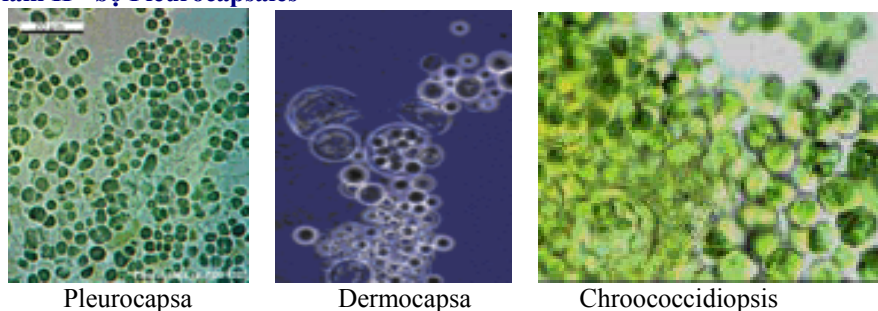
Nhóm Vi khuẩn không lưu huỳnh màu lục



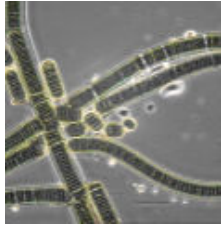
Nhóm Vi khuẩn lam I - bộ Chroococcales



Nhóm Vi khuẩn lam II - bộ Pleurocapsales



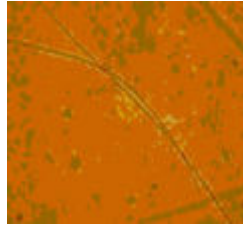
Nhóm Vi khuẩn lam III - bộ Oscillatoriales



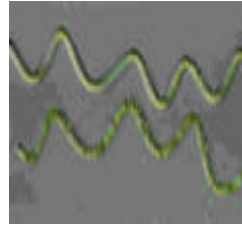
Lyngbya



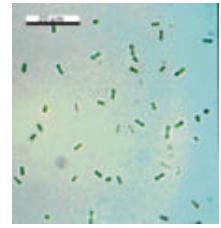
Oscillatoria



Prochlorothrix

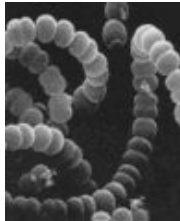


Spirulina



Pseudanabaena

Nhóm Vi khuẩn lam IV - bộ Nostocales



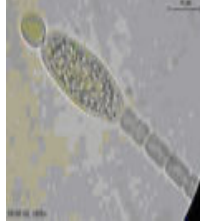
Anabaena



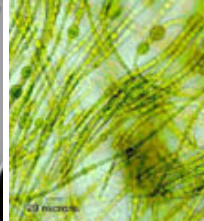
Anabaena trong bèo hd Cylindrospermum



Cylindrospermum



Nostoc



Scytonema



Nhóm Vi khuẩn lam V - bộ Stigonematales



Calothrix



Fischerella



Fischerella



Geitlerinema

XẠ KHUẨN

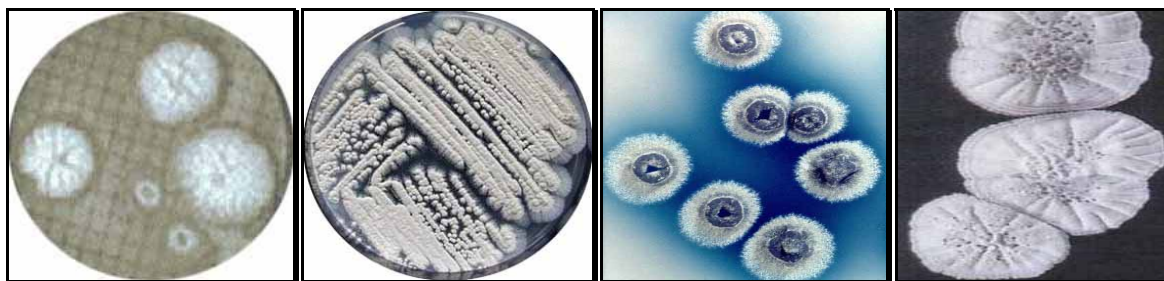
1. Đặc điểm

Xạ khuẩn là nhóm vi sinh vật đơn bào, phân bố rộng rãi trong tự nhiên (trong đất, nước và các cơ chất hữu cơ). Chúng có khuẩn lạc khô và đa số có dạng hình phóng xạ (actino-) nhưng khuẩn thể lại có dạng sợi phân nhánh như nấm (myces).

Trước đây, vị trí phân loại của xạ khuẩn luôn là câu hỏi gây nhiều tranh luận giữa các nhà vi sinh vật học, do nó có những đặc điểm vừa giống vi khuẩn vừa giống nấm. Tuy nhiên, đến nay, xạ khuẩn đã được chứng minh là vi khuẩn với những bằng chứng sau đây:

- Một số xạ khuẩn như các loài thuộc chi *Actinomyces* và *Nocardia* rất giống với các loài vi khuẩn thuộc chi *Lactobacillus* và *Corynebacterium*.
- Xạ khuẩn giống vi khuẩn ở chỗ không có nhân thật, chúng chỉ chứa nhiễm sắc chất phân bố dọc theo các sợi hoặc các tế bào.
- Đường kính của sợi xạ khuẩn và bào tử giống với ở vi khuẩn. Đồng thời sợi xạ khuẩn thường không chứa vách ngăn.
- Xạ khuẩn là đích tấn công của các thực khuẩn thể giống như vi khuẩn, trong khi đó, nấm không bị tấn công bởi thực khuẩn thể.
- Xạ khuẩn thường nhạy cảm với các kháng sinh có tác dụng lên vi khuẩn, nhưng lại thường kháng với những kháng sinh tác dụng lên nấm.
- Xạ khuẩn không chứa chitin, chất có mặt trong sợi và bào tử của nhiều nấm, mà không có ở vi khuẩn. Đồng thời giống như phần lớn vi khuẩn, xạ khuẩn không chứa cellulose.
- Tương tự với vi khuẩn, xạ khuẩn nhạy cảm với phản ứng acid của môi trường, đặc điểm này không có ở nấm.

Xạ khuẩn thuộc về lớp *Actinobacteria*, bộ *Actinomycetales*, bao gồm 10 dưới bộ, 35 họ, 110 chi và 1000 loài. Hiện nay, 478 loài đã được công bố thuộc chi *Streptomyces* và hơn 500 loài thuộc tất cả các chi còn lại và được xếp vào nhóm xạ khuẩn hiếm.



Hình: Khuẩn lạc xạ khuẩn

2. Cấu tạo xạ khuẩn

Xạ khuẩn có cấu tạo hệ sợi (khuẩn ty), phân nhánh và không có vách ngăn ngang. Đường kính sợi từ 0.2-1 μm . Nhiều khuẩn ty kết hợp với nhau tạo thành hệ khuẩn ty. Màu sắc khuẩn ty hết sức phong phú. Có thể có các màu trắng, vàng, da cam, đỏ, lục, lam...

Đặc điểm nuôi cấy

Xạ khuẩn phần lớn là vi sinh vật hiếu khí, một số ít kỵ khí. Xạ khuẩn thu nhận năng lượng nhờ sự oxy hoá các hợp chất hữu cơ.

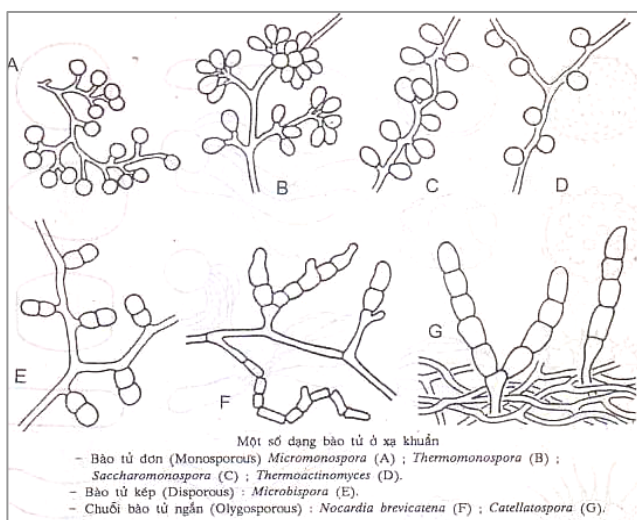
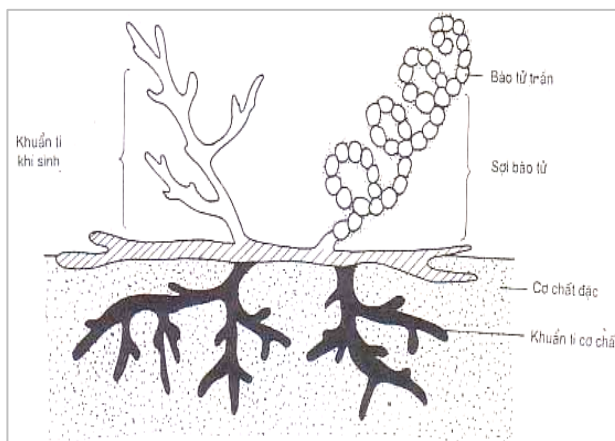
Khi nuôi cấy trong **môi trường dịch thể**, xạ khuẩn tạo thành dạng bông, lâu rồi lắng xuống đáy.

Khi nuôi cấy trên **môi trường đặc**, khuẩn ty xạ khuẩn phát triển thành hai loại, một loại cắm sâu vào môi trường để lấy nước và thức ăn gọi là khuẩn ty cơ chất (khuẩn ty dinh dưỡng) (substrate mycelium); một loại phát triển trên bề mặt môi trường, ngoài không khí gọi là khuẩn ty khí sinh (aerial mycelium).

Khuẩn ty khí sinh còn được gọi là khuẩn ty thứ cấp để phân biệt với các khuẩn ty sơ cấp (các khuẩn ty bắt đầu phát triển từ các bào tử nảy mầm).

Nhiều loại chỉ có khuẩn ty cơ chất nhưng cũng có loại (như chi *Sporichthya*) chỉ có khuẩn ty khí sinh.

Cấu tạo và thành phần hoá học của xạ khuẩn cũng tương tự vi khuẩn, gồm có thành tế bào, màng NSC, nguyên sinh chất, thể nhân, các hạt dự trữ và không bào.



3. Sinh sản của xạ khuẩn

Xạ khuẩn sinh sản chủ yếu bằng bào tử. Sau một thời gian phát triển, trên đỉnh khuẩn ty khí sinh sẽ xuất hiện các sợi mang bào tử. Các sợi này có thể thẳng, lượn sóng, xoắn, mọc đơn hay mọc vòng. Một số bào tử có sinh nang (túi) bào tử (sporangium), bên trong có chứa các bào tử nang (bào tử kín).

Bào tử xạ khuẩn có hình tròn, bầu dục, que, trụ... Hình dạng của bào tử và sợi mang bào tử có vai trò quan trọng trong việc định tên xạ khuẩn.

Bào tử trần (conidispore) là cơ quan sinh sản chủ yếu của xạ khuẩn. Bào tử trần được hình thành theo hai phương thức khác nhau:

- *Sự kết đoạn (fragmentation)*

Các hạt nhiễm sắc (chất tạo thành thể nhân) trong nguyên sinh chất được phân bố đồng đều khắp cuống sinh bào tử, sau đó nguyên sinh chất và các chất ưa kiềm co lại và bao bọc xung quanh các hạt nhiễm sắc để tạo thành tiền bào tử. Vách ngăn được hình thành dần từ phía trong của màng tế bào và tiến dần vào phía bên trong và tạo thành các vách ngăn không hoàn chỉnh, sau đó sợi bào tử mới phân cắt thành các bào tử trần.

Bào tử hình thành theo kiểu này thường có hình cầu và được giải phóng ra ngoài khi màng của cuống sinh bào tử tan đi.

- *Sự cắt khúc (segmentation)*

Sự hình thành các tiền bào tử cũng tương tự như phần kết đoạn. Sau đó cả thành và màng tế bào đồng thời xuất hiện vách ngăn ngang phân tách các tiền bào tử cùng một lúc → tạo thành một chuỗi bào tử trần.

Bào tử hình thành theo kiểu này thường có hình que hay hình trụ.

Ngoài hình thức sinh sản bằng bào tử, trong một số trường hợp, do sự va chạm mạnh, khuẩn ty của xạ khuẩn đứt thành từng đoạn, những đoạn này khi gặp điều kiện thuận lợi cũng có thể phát triển thành các cơ thể mới.

4. Vai trò của xạ khuẩn

- Xạ khuẩn có vai trò quan trọng trong việc hình thành đất và tạo ra độ phì nhiêu cho đất.
- Tham gia tích cực vào các quá trình chuyển hoá và phân giải các hợp chất hữu cơ phức tạp (cellulose, chitin, lignin...)
- Hầu hết xạ khuẩn thuộc giống *Actinomyces* có khả năng hình thành các chất kháng sinh, đây là đặc điểm quan trọng nhất của xạ khuẩn
- Trong quá trình trao đổi chất, xạ khuẩn có thể sinh ra các vitamin nhóm B, acid hữu cơ...
- Có khả năng sinh ra nhiều loại men (proteaza, amylaza...)
- Một số loại có khả năng tạo thành các chất kích thích sinh trưởng.

Bên cạnh một số xạ khuẩn có ích, một số xạ khuẩn lại sinh ra các độc tố kìm hãm sự sinh trưởng của thực vật, gây các bệnh khó chữa cho người và gia súc. Các bệnh này được gọi tên chung là actinomycose.

5. Phân loại xạ khuẩn (bài đọc thêm).

ĐỌC THÊM PHÂN LOẠI XẠ KHUẨN

Nguồn: <http://vietsciences.org/khaocuu/nguyenlandung/phanloaixakhuan02.htm>

Để phân loại xạ khuẩn người ta sử dụng các tiêu chuẩn như trình tự rADN 16S, lai ADN, hình thái, sinh lý sinh hóa và hóa phân loại. Hiện nay, đại đa số các nhà khoa học đồng ý với quan niệm hai chủng được coi là hai loài riêng biệt nếu chúng giống nhau dưới 70% khi tiến hành lai ADN. Keswani và cộng sự đã chứng minh rằng nếu sự tương đồng giữa hai trình tự rADN 16S là 98.6% thì xác suất để mức độ giống nhau trong phép lai ADN thấp hơn 70% sẽ là 99%. Vì thế giá trị tương đồng 98.6% của trình tự rADN 16S được coi là ngưỡng để phân biệt hai loài khác nhau. Tuy nhiên, cũng có nhiều nhà khoa học lấy giá trị này là 98%.

Đặc biệt hóa phân loại là rất quan trọng trong việc phân loại xạ khuẩn. Chúng rất có ích trong phân loại ở mức độ đến chi. Đó là những đặc điểm sau: đường, loại acetyl, acid mycolic trong thành tế bào, menaquinone, phospholipid, acid béo và tỷ lệ GC trong ADN.

Một số môi trường và phương pháp phân lập xạ khuẩn:

1. Môi trường HV (Humic acid-vitamin agar)

Acid humic 1 g	CaCO ₃ 0,02 g	FeSO ₄ .7H ₂ O 0,01 g
KCl 1,71 g	MgSO ₄ .7H ₂ O 0,05 g	Na ₂ HPO ₄ 0,5 g
Hỗn hợp vitamin nhóm B* 5 ml	Cycloheximide 500 mg	Thạch 18 g
Nước cất 1l	pH 7,2	

* Thành phần hỗn hợp vitamin nhóm B

Thiamine-HCl 10 mg	Riboflavin 10 mg	Niacin 10 mg
Pyridoxin-HCl 10 mg	Inositol 10 mg	Ca-Pantothenate 10 mg
Acid p-Aminobenzoic 10 mg	Biotin 10 mg	Nước cất 10 ml

2. Môi trường YS (Yeast extract-Soluble starch agar)

Cao nấm men 2 g	Tinh bột tan 10 g	Thạch 18 g
Nước cất 1l	pH 7,3	

Thường sử dụng môi trường YS pha loãng 5 lần để phân lập xạ khuẩn và pha loãng 2 lần để nghiên cứu.

3. Môi trường Maltose-Bennette

Cao nấm men 1 g	Cao thịt 1 g	NZ amine 2 g
Maltose monohydrat 10 g	Thạch 18 g	Nước cất 1l
		pH 7,3

4. Môi trường ISP-2

Cao nấm men 4 g	Cao malt 10 g	Glucose 4 g
Thạch 18 g	Nước cất 1l	pH 7,2

5. Môi trường dịch thể YG (Yeast extract-Glucose)

Yeast extract 1%	Glucose 1%
------------------	------------

Phương pháp RC (Rehydration- Centrifugation method): dùng để phân lập xạ khuẩn có khả năng di động

- Để mẫu khô tự nhiên trong 3-5 ngày, nghiền nhỏ mẫu
- Lấy 0,5 g mẫu cho vào 50 ml đệm phosphat 10 mM- 5% cao nấm men (pH 7)
- Loại bỏ phần nổi trên bề mặt
- Giữ ở 28oC trong 1,5 giờ

- Chuyển 8 ml lớp dịch phía trên sang ống ly tâm
- Ly tâm với tốc độ 3000 rpm (1500 x g) trong 20 phút
- Giữ ở nhiệt độ phòng trong 30 phút
- Chuyển 3 ml lớp dịch trên sang ống khác.
- Lấy 1 ml pha loãng với nước cất (10-3, 10-4)
- Trãi trên môi trường HV với độ pha loãng 10-2, 10-3, 10-4
- Nuôi cấy ở nhiệt độ 28°C trong 14-21 ngày

Phương pháp SDS-YE (Sodium dodecyl sulfate – Yeast extract method): để phân lập tất cả các loại xạ khuẩn

- Để mẫu khô tự nhiên trong 3-5 ngày, nghiền nhỏ mẫu
- Lấy 1 g mẫu cho vào 10 ml nước cất vô trùng (10-1)
- Lấy 1 ml dịch trên cho vào 9 ml SDS-YE trong đệm phosphat (10-2) (SDS 0,05%, cao nấm men 6%, đệm phosphat 5mM, pH 7,0)
- Sốc nhiệt ở 40oC trong 20 phút
- Pha loãng bằng nước cất vô trùng
- Trãi trên môi trường HV
- Nuôi cấy ở 28oC trong 14-21 ngày

Phương pháp DH (Dry heating method): dùng để phân lập xạ khuẩn chủ yếu thuộc chi Streptomyces

- Để mẫu khô tự nhiên trong 3-5 ngày, nghiền nhỏ mẫu
- Sấy mẫu ở 100oC trong 30 phút
- Rắc một lượng rất nhỏ mẫu lên môi trường HV
- Nuôi cấy ở 28oC trong 7-14 ngày

CHƯƠNG 2 – VI SINH VẬT NHÂN CHUẨN – VI NẤM

Vi sinh vật nhân chuẩn bao gồm các vi nấm, một số động vật nguyên sinh, một số tảo đơn bào
Vi nấm được chia thành 4 ngành (Division, Phylum):

- Ngành Chytridiomycota
- Ngành Zygomycota
- Ngành Ascomycota
- Ngành Basidiomycota

Các loài nấm không tìm thấy (đúng ra là chưa tìm thấy) dạng sinh sản hữu tính được xếp chung vào nhóm Nấm bất toàn – Fungi imperfecti. Hiện nay người ta cho rằng trong tự nhiên có khoảng 1 triệu đến 1,5 triệu loài nấm nhưng mới định tên được khoảng 10 000 chi và 70 000 loài.

Căn cứ vào hình thái người ta chia vi nấm thành hai nhóm khác nhau: nhóm nấm men (yeast) và nhóm nấm sợi (filamentous fungi). Chúng chỉ khác nhau về hình thái chứ không phải là những đơn vị phân loại riêng biệt. Nhiều nấm men cũng có dạng sợi và rất khó phân biệt với nấm sợi

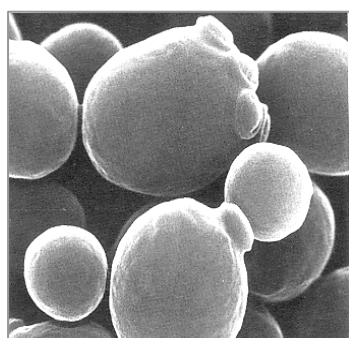
NẤM MEN

Nấm men (yeast, levure) chỉ là tên chung để chỉ nhóm vi nấm thường có cấu tạo đơn bào và thường sinh sôi nảy nở bằng phương pháp nảy chồi (budding). Nấm men không thuộc về một đơn vị phân loại nào nhất định, chúng có thể thuộc ngành Nấm túi (Ascomycota) hoặc ngành Nấm đảm (Basidiomycota).

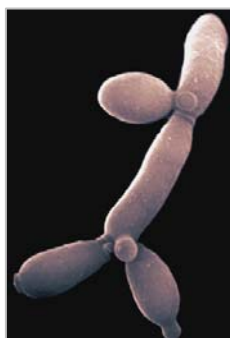
1. Hình thái, kích thước và cấu tạo của tế bào nấm men

Nấm men có cấu tạo tế bào hình trứng hay hình bầu dục (*Saccharomyces cerevisiae*), hình dài (*Candida utilis*) hoặc hình elip (*Candida tropicalis*).

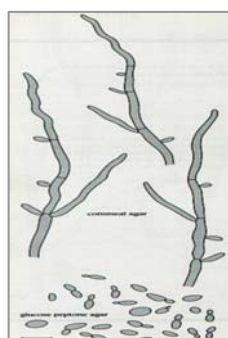
Một số nấm men có tế bào hình dài nối tiếp nhau thành những dạng sợi được gọi là khuẩn ty giả (pseudomycellium).



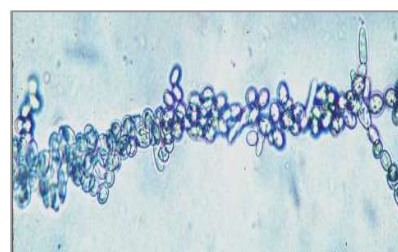
S. cerevisiae



Candida



C. tropicalis



Khuẩn ty giả của *Endomyces*

Bên cạnh các nấm men có dạng quen thuộc thường gặp còn có các nấm men có tế bào hình tam giác, hình mũi tên.

Kích thước của tế bào nấm men thay đổi theo từng giống, từng loài. Kích thước từ 2.5-5x5-10µm. Hình thái của nấm men có thể thay đổi theo điều kiện môi trường nhất là trong môi trường đã cũ.

Nấm men có cấu tạo đơn bào và cũng như các tế bào khác, nó bao gồm thành TB, màng sinh chất, nguyên sinh chất, nhân hoàn chỉnh và các thể ẩn nhập. Trong thành tế bào, ngoài các thành phần đã có như trong tế bào vi khuẩn, phần nảy chồi của nấm men còn có thêm chitin, một chất bền vững có tác dụng bảo vệ chồi khi chồi còn non. Nhân đã có màng bao bọc hoàn chỉnh.



Hình . Cấu tạo tế bào nấm men

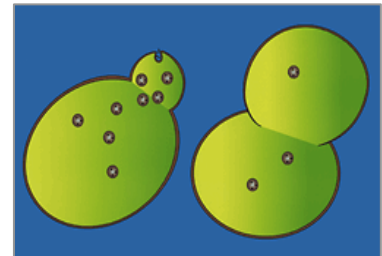
2.Sinh sản của nấm men

Nấm men có thể sinh sản theo 2 phương thức: vô tính và hữu tính

2.1. Sinh sản vô tính

Bao gồm nảy chồi, phân cắt và bằng bào tử

Nảy chồi là cách sinh sản vô tính điển hình của nấm men. Khi nấm men trưởng thành sẽ nảy ra một hoặc nhiều chồi nhỏ. Chồi lớn dần lên, chất nhân và nguyên sinh chất từ tế bào mẹ được chuyển sang cho các chồi. Vách ngăn sẽ được hình thành để ngăn cách giữa chồi và tế bào mẹ để tạo ra các tế bào mới. Tế bào con có thể tách khỏi tế bào mẹ hoặc dính trên tế bào mẹ và tiếp tục nảy mầm tạo ra một tập hợp tế bào nấm men giống hình cành cây. Thời gian để một tế bào con hoàn chỉnh và tách ra khỏi tế bào mẹ là 20-30 phút.



Hình thức sinh sản thứ hai của nấm men là **phân cắt**. Nấm men còn có hình thức sinh sản phân cắt như vi khuẩn. Điển hình cho kiểu phân cắt này là các nấm men thuộc chi *Schizosaccharomyces*.



Sinh sản bằng bào tử:

- **Bào tử đốt** (arthroconidia hay arthrospore): Khi đó sẽ hình thành các vách ngăn ở đầu các nấm men dạng sợi, sau đó tách ra thành các bào tử đốt. Loại này gặp ở các nấm men thuộc cả hai ngành: Nấm túi và Nấm đảm. Thường gặp nhất là ở các chi nấm men *Galactomyces*, *Dipodascus* (dạng vô tính là *Geotrichum*) và *Trichosporon*.

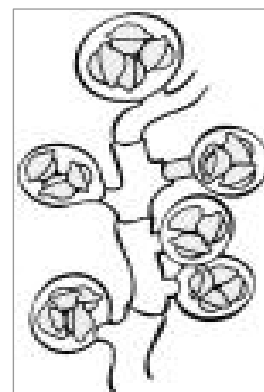


- **Bào tử bắn**: Loại bào tử này được sinh ra trên một cuống nhỏ mọc ở các tế bào sinh dưỡng. Khi bào tử chín nó được bắn ra phía đối diện. Có thể thấy được hiện tượng này khi cây zigzag trên ống thạch nghiêng. Thường gặp bào tử bắn ở các chi *Bensingtonia*, *Bullera*, *Deoszegia*, *Kockovaella*, *Sporobolomyces*...



2.2. Sinh sản hữu tính

Bằng bào tử túi (ascospore) được sinh ra từ các túi (asci). Có thể xảy ra sự tiếp hợp (conjugation) giữa hai tế bào nấm men tách rời hoặc giữa tế bào mẹ và con. Còn có cả sự biến nạp trực tiếp trong 1 tế bào sinh dưỡng (vegetative cell), tế bào này biến thành túi không qua tiếp hợp (unconjugated ascus). Thường trong mỗi túi có 4 hay đôi khi có 8 bào tử túi. Trong một số trường hợp lại chỉ có 1-2 bào tử túi. Bào tử túi ở chi *Saccharomyces* có dạng hình cầu, hình bầu dục; ở chi *Hanseniaspora* và loài *Hansenula anomala* có dạng hình mũ; ở loài *Hansenula saturnus* bào tử túi có dạng quả xoài giữa có vành đai như dạng Sao Thổ. Một số bào tử túi có dạng kéo dài hay hình xoắn... Bề mặt bào tử túi có thể nhẵn nhụi, có thể xù xì hoặc có gai...



3. Vai trò của nấm men

Được ứng dụng trong công nghiệp sản xuất rượu, bia, nước giải khát, bánh mỳ, sinh khối phục vụ chăn nuôi, cao nấm men.

Được sử dụng để sản xuất các enzym như amylase, invertase, lactase, vitamin B2, các acid amin như lisin, cystein, methionin.

Bên cạnh rất nhiều nấm men có ích còn có những loại nấm men có thể gây nên hiện tượng hư hỏng thực phẩm và gây bệnh cho người và vật nuôi (*Candida albicans*) (tự đọc thêm)

4. Phân loại nấm men

Để phân loại nấm men người ta phải tiến hành nghiên cứu các đặc điểm sau đây:

- Đặc điểm hình thái: tế bào, khuẩn lạc, kiểu nảy chồi, các dạng bào tử vô tính và hữu tính, khuẩn ty và khuẩn ty giả...

- Đặc điểm sinh lý và sinh hoá:

+ Lên men 13 loại đường

+ Đồng hóa 46 nguồn carbon. Có thể dùng bộ kit chẩn đoán nhanh ID 32C (Bio Mérieux SA, Marcy-l'Étoile...)

+ Tính chống chịu với 0,01% hoặc 0,1% cycloheximide (có thể bao gồm trong bộ kit ID 32C).

+ Đồng hoá 6 nguồn nitơ: nitrate, nitrite, ethylamine hydrochloride, L-lyzine, cadaverine dihydrochloride, creatine

+ Sinh trưởng khi thiếu hụt một số vitamin (myo-Inositol, calcium pantothenate, biotin, thiamine hydrochloride, pyridoxin hydrochloride, niacin, folic acid, p-aminobenzoic acid).

+ Sinh trưởng tại các nhiệt độ khác nhau: 25, 30, 35, 37, 42⁰C.

+ Tạo thành tinh bột.

- + Sản sinh acid từ glucose
- + Thủy phân Urê
- + Phân giải Arbutin
- + Phân giải lipid
- + Năng lực sản sinh sắc tố
- + Sinh trưởng trên môi trường chứa 50% và 60% Glucose
- + Hóa lỏng gelatine
- + Phản ứng với Diazonium Blue B
- + Phát triển trên môi trường chứa acid acetic 1%

Để xác định loài mới còn cần phân tích thành phần acid béo của tế bào, thành phần đường trong tế bào, phân tích hệ coenzyme Q, tỷ lệ G+C, đặc tính huyết thanh miễn dịch, giải trình tự ADN và lai ADN...

PHÂN LOẠI VI NẤM

Vi nấm được chia thành 4 ngành (Division, Phylum):

- Ngành Chytridiomycota
- Ngành Zygomycota
- Ngành Ascomycota
- Ngành Basidiomycota

Theo thuật ngữ Latinh tên các taxon trong phân loại nấm là như sau: Ngành-mycota; Ngành phụ-mycotina; Lớp-mycetes; Lớp phụ- mycetidae; Bộ-ales; Bộ phụ- inea; Họ-aceae; Họ phụ- oideae.

Hiện nay tồn tại các hệ thống phân loại nấm không thống nhất với nhau, chủ yếu là các hệ thống phân loại theo Ainsworth và cộng sự (1973), V.Ar. (1981), Ainsworth & Bisby (1983), Kendrick (1992), Ainsworth & Bisby (1995), Alexopoulos & Mins (1996).

Dựa theo hệ thống phân loại theo Giáo trình nấm học CBS. CBS Course of Mycology), lần xuất bản thứ 4, Baarn, Delft, 1998, vi nấm được phân loại như sau:

Ngành	Lớp	Lớp phụ hoặc nhóm
Labyrinthomorpha	Labyrinthulea Thraustochytriacea	
Pseudofungi	Hyphochytriomycetes Oomycetes	
Chytridiomycota	Chytridiomycetes	
Zygomycota	Zygomycetes Trichomycetes	
Ascomycota	Archiascomycetes Saccharomycetes Ascomycetes	discomycetes Major licheneized orders plectomycetes pyrenomycetes loculoascomycetes powdery mildews Laboulbeniomycetes conidial ascomycetes (Hyphomycetes, Coelomycetes)
Basidiomycota	Urediniomycetes	Platyglomycetidae Urediniomycetidae
	Ustilaginomycetes	
	Hymenomycetes	Tremellomycetidae Dacrymycetidae Auriculariomycetidae Hymenomycetidae

Các loài nấm không tìm thấy (đúng ra là chưa tìm thấy) dạng sinh sản hữu tính được xếp chung vào nhóm Nấm bất toàn – Fungi imperfecti. Hiện nay người ta cho rằng trong tự nhiên có khoảng 1 triệu đến 1,5 triệu loài nấm nhưng mới định tên được khoảng 10 000 chi và 70 000 loài.

Căn cứ vào hình thái người ta chia vi nấm thành hai nhóm khác nhau: nhóm Nấm men (Yeast) và nhóm Nấm sợi (Filamentous fungi). Chúng chỉ khác nhau về hình thái chứ không phải là những taxon phân loại riêng biệt. Nhiều nấm men cũng có dạng sợi và rất khó phân biệt với nấm sợi.

ĐỌC THÊM CÁC PHƯƠNG PHÁP THỰC NGHIỆM ĐỂ ĐỊNH TÊN NẤM MEN

1. 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 60°C 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 6° Baume.

Phân vào các dụng cụ thủy 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 5,7° Baume. Có tài liệu lại sử dụng nồng độ 5-8° 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 25-30°C 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 thước 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 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 lơ 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.

2. 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°	10ml
Dung dịch phenol 3%	90ml

(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 đập 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:

Rõ 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).

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.

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: Rõ 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)

3. 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-Glucose hay môi trường mạch nha - cao nấm men - Glucose - pepton).

Môi trường mạch nha - cao nấm men - Glucose - pepton

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

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.

4. 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 - Glucose, môi trường khoai tây - Glucose hay môi trường ngô.

Môi trường thạch - pepton - Glucose

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

Môi trường khoai tây - Glucose

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

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 đây lá kính mỏng, phải tránh bọt khí, đây 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. Lắp 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 đặt hộp Petri lại và nuôi cấy ở 25-30°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.

5. Quan sát bào tử bắn (*Ballistoconidium*, *Ballistospore*)

Lấy 10-15ml môi trường nước chiết mạch nha, môi trường khoai tây - Glucose 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 đĩa Petri khác chứa cùng môi trường nhưng không cấy nấm men. Trong đĩa Petri này chứa 1 lamelle vô trùng, để ở 20°C 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 nấm theo các cách khác như sau:

Cấy các loại nấm men nghi ngờ có hình thành bào tử nấm 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 nấm 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 20°C 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 nấm trên phiến kính trên kính hiển vi.

6. 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 nấm 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:

- Nấm men có hình thành bào tử túi hay không.
- 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.
- 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 - Glucose - pepton và để 2-3 ngày sau đó đưa chuyển vào môi trường sinh bào tử. Giữ ở 25°C 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, Gorodkova-aga, acetat-agar, malt-yeast-Glucose, 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 nhào 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 (120°C trong 30 phút). Cây nấm men tươi (từ thạch nghiêng mới nuôi cấy 48 giờ tuổi). Giữ 25°C 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
Glucose:	5 g
KH ₂ PO ₄ :	0,2g
CaCl ₂ :	0,05g
MgSO ₄ :	0,05g
FeSO ₄ :	0,001g
(NH ₄) ₂ SO ₄ :	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
Glucose:	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:

Glucose:	0,4 g
Axetat Na không ngâm nước:	1,4 g
Thạch:	20 g
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 37°C, sau đó quan sát bào tử túi theo từng thời điểm thích hợp.

Môi trường Klevn

Natri glutamat (hay asparagin, pepton, glixin):	0,25g
Glucose:	0,062g
NaCl:	0,062g
Natri axetat:	0,5g
KH ₂ PO ₄ :	0,012 g
K ₂ HPO ₄ :	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: $MgSO_4$ - 0,4g; $CuSO_4$ - 0,002g; $FeSO_4$ - 0,2g; $MnSO_4$ - 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.
- Chung 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 (anascoprogenous).

7. 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 tảng, 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 ẩm 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.

8. 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-Glucose. 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 Glucose. Nếu nấm men có khả năng lên men Glucose 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.

9. 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.

9.1. 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-Glucose.

- 46 nguồn carbon gồm: Glucose, galactosa, L-sorboza, sucroza, maltoza, xenlobioza, trelaloza, lactoza, melibioza, raffinoza, melezitoza, 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, a- metyl-D-glucosid, salicin, glucono-d-lacton, D-gluconat, 2-ketogluconat, 5-ketogluconat, DL-lactat, succinat, citrat, inositol, hexandecan, saccharat, xylytol, 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 - Glucose - 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 25x10⁶/ml (hay mật độ A₆₄₀ = 1,0).

- Sau đó lấy ra 100ml 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 bia 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.

9.2. 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 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 37⁰C sau 30 phút cho đông thạch. Có thể sau đó úp ngược để 37⁰C 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-Glucose). Theo dõi kết quả sau 48 giờ đến 1 tuần.

9.3. Phương pháp dùng con dấu

Đĩa Petri gốc chứa môi trường malt - cao men - Glucose - pepton - thạch chứa khoảng 25 khuẩn lạc nấm men nghiên cứu khác nhau. Sau đó dùng con dấu nhưng 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-Glucose).

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.

10. 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 NH₃ ở khí quyển hoà tan vào môi trường.

11. 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
Glucose:	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
Cao nấm men:	1 g
Glucose:	30 g
Nước:	1000 g

Phân vào các bình tam giác một lớp môi trường cao khoảng 0,5cm rồi khử trùng. Cây 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.

12. 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

13. 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-Glucose 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).

14. Đánh giá sự phát triển khi có mặt Cycloheximit

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

Xycloheximit 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 xycloheximit có thể đã có thay đổi về loại ribosom này.

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

Môi trường Christensen:

Pepton:	1g
NaCl:	5g
KH ₂ PO ₄ :	2g
Glucose:	5g
Thạch:	20g
Nước:	1000ml

Dun 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.

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

Một ống giống được cấy trên môi trường pep ton - cao men - Glucose - 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-Glucose:	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-Glucose:	1,0
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 công sư, 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 Campbeo 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 - Glucose (Vander Walt và Codder, 1970)

Môi trường dịch thể được chuẩn bị từ 5g- cao nấm men, 20g- D-Glucose, 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 nitơ:

(NH₄)₂SO₄: 3,5 g L-Asparagin: 1,5g

Nguồn carbon

D-Glucose: 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

H₃BO₃: 500 mg CuSO₄.5H₂O: 40 mg

KI: 100 mg FeCl₃.6H₂O: 200 mg

MnSO₄.4H₂O: 400 mg Na₂MoO₄.H₂O: 200 mg

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-Glucose.

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.

NẤM SỢI

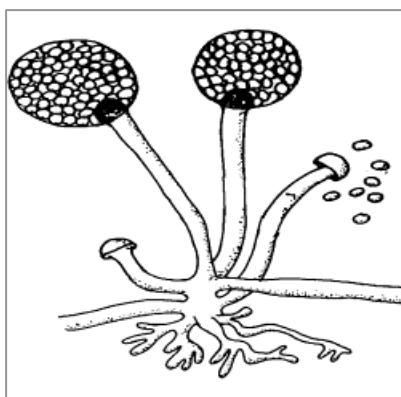
Nấm sợi (Filamentous fungi) còn được gọi là nấm mốc. Nấm mốc là tên chung để chỉ tất cả các nhóm nấm không phải là nấm men cũng không phải là những nấm sinh mũ (nấm rơm, nấm gỗ)

1. Hình thái cấu tạo và đặc điểm của nấm mốc

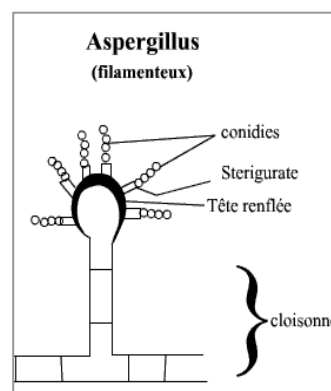
- Nấm mốc có cấu tạo dạng sợi phân nhánh, có khả năng sinh trưởng đỉnh và phát triển nhanh tạo thành hệ sợi nấm
- Các sợi nấm đều có chiều ngang tương tự nấm men ($2.5-5\mu\text{m}$) còn chiều dài bất kỳ, có thể tới vài cm
- Nấm mốc không có diệp lục, sống ký sinh hoặc hoại sinh, vì vậy nó phát triển sâu vào cơ chất để hút thức ăn
- Nhân tế bào được bao bọc bởi màng nhân, trên màng nhân có nhiều lỗ thủng, trong nhân có hạch nhân (nucleolus). Thường có nhiều nhân tập trung ở phần ngọn của sợi nấm.
- Các nấm bậc thấp thường có sợi nấm không vách ngăn, ngược lại các nấm bậc cao thường mang sợi nấm có vách ngăn.

+ Một số nấm bậc thấp, khuẩn ty không có vách ngăn, toàn bộ hệ sợi là một tế bào phân nhánh (*Mucor*, *Rhizopus*). Sợi nấm không vách ngăn mang nhiều nhân nhưng vẫn có thể gọi là đơn bào. Ở các nấm không vách ngăn thì vách ngăn vẫn có thể hình thành khi sản sinh thể sinh sản hay cơ quan sinh sản. Tại các bộ phận bị thương tổn sợi nấm cũng có thể hình thành vách ngăn. Đó là loại vách ngăn liền, không có lỗ thủng, có tác dụng bảo vệ cơ thể.

+ Phần lớn các loài nấm mốc khác, sợi nấm có vách ngăn là cơ thể đa bào. Mỗi tế bào có 1 nhân hoặc nhiều nhân. Tuy nhiên sợi nấm vẫn không phải do nhiều tế bào hợp thành mà là do các vách ngăn tách sợi nấm ra thành nhiều tế bào.



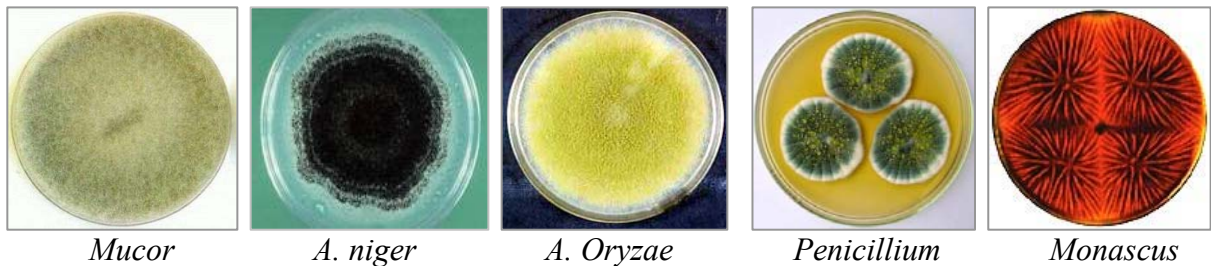
Sợi nấm không vách ngăn



Sợi nấm có vách ngăn

- Nấm mốc không di chuyển được vì không có cơ quan di động
- Nấm mốc là loại vi sinh vật hiếu khí, chỉ phát triển được trong điều kiện thoáng khí
- Nấm mốc chịu ảnh hưởng của nhiệt độ và độ acid kém hơn vi khuẩn

- Nấm mốc có màu sắc đa dạng, có loại màu đỏ như *Neospora crassa*, đen như *A. niger*, xám như *A. usamii*, trắng xám như *Mucor*, *Rhizopus*, xanh như *Penicillium*.



2. Sinh sản của nấm mốc

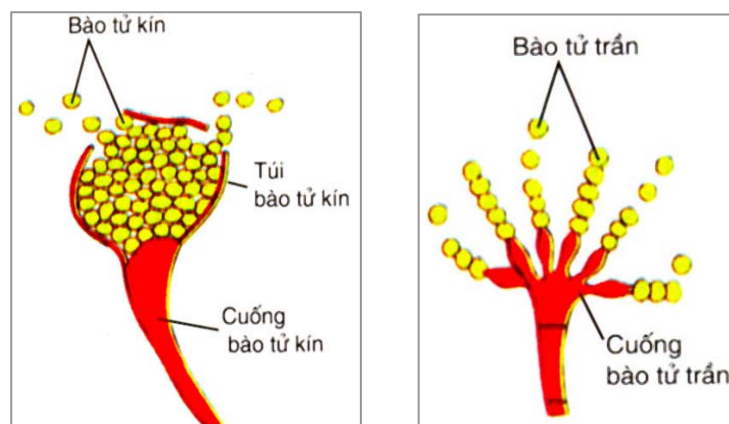
Bao gồm sinh sản sinh dưỡng, vô tính và hữu tính

2.1. Sinh sản sinh dưỡng

- Bằng đoạn sợi nấm: Một đoạn sợi nấm trong môi trường thích hợp có thể phát triển rất nhanh. Phương pháp này thường dùng ở trong phòng thí nghiệm để cấy các giống nấm.
- Bằng bào tử áo: Một số tế bào trên sợi nấm hình thành màng dày và chứa nhiều chất dự trữ, chịu được điều kiện khó khăn. Khi gặp điều kiện thuận lợi có thể nảy mầm.

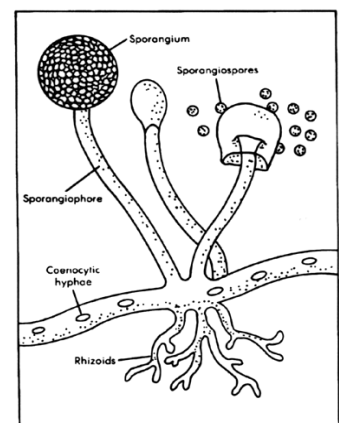
2.2. Sinh sản vô tính

Bằng bào tử nội sinh (bào tử kín) và bào tử ngoại sinh (bào tử trần)



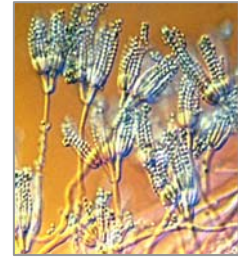
- **Bào tử nội sinh:** Từ cuống nang bào tử (xuất hiện trên đầu sợi nấm khí sinh) sẽ hình thành nên túi đỉnh. Bên ngoài túi đỉnh được bao bọc bởi một màng dày gọi là nang bào tử. Trong nang, các bào tử hình thành có hình tròn hay hình ovan. Bào tử có thể di động được hoặc không. Mỗi bào tử lại được bao bọc bởi một lớp màng dày. Khi bào tử chín, nang bào tử vỡ ra, bào tử phát tán. Thường gặp kiểu sinh sản này ở các nấm bậc thấp như *Mucor*, *Rhizopus*.

- **Bào tử ngoại sinh:** Từ cuống nang bào tử (xuất hiện trên đầu sợi nấm khí sinh) sẽ hình thành nên túi đỉnh. Đầu túi đỉnh hình thành nên những tế bào hình chai gọi là thể bình. Thể bình có khi là 1 dây (thể bình bậc 1), có khi là 2



dây (thể bình bậc 2) nối tiếp nhau. Các bào tử trần được sinh ra trong thể bình hoặc sát miệng thể bình. Các bào tử này được các bào tử trần hình thành tiếp theo đẩy ra khỏi miệng thể bình. Thường gặp kiểu sinh sản này ở các nấm bậc cao như *Aspergillus*.

Ở nấm *Penicillium*, bộ phận mang bào tử có dạng phân nhánh hình chổi. Đầu mỗi nhánh có các thể bình, trong thể bình có chứa các bào tử trần.



2.3. Sinh sản hữu tính

Là hình thức sinh sản không phổ biến trong giới nấm (*SV tự đọc*)

3. Phân loại nấm mốc (*bài đọc thêm*)

ĐỌC THÊM CÁC PHƯƠNG PHÁP ĐỊNH LOẠI NẤM SỢI

Các chủng cần định loại phải được nuôi cấy trên các môi trường, nhiệt độ, thời gian nuôi cấy theo đúng quy định của các khoá phân loại đối với từng chi nấm mốc.

Nguồn: <http://vietsciences.org/khaocuu/nguyenlandung/namsoi01.htm>

GIỚI THIỆU MỘT SỐ PHƯƠNG PHÁP CHÍNH

PHƯƠNG PHÁP LẤY MẪU :

1. Mẫu đất
2. Lá và cành cây khô
3. Lá tươi và vỏ cây
4. Phân.
5. Côn trùng
6. Nước ngọt và các vật liệu có trong nước ngọt
7. Nước mặn và các vật liệu có trong nước mặn.

PHƯƠNG PHÁP PHÂN LẬP:

1. Phương pháp dùng kim nhọn
2. Phương pháp phân lập bào tử đơn độc
3. Phương pháp dùng vi thao tác Skerman
4. Phương pháp pha loãng
5. Phương pháp pha loãng kết hợp với xử lý tia cực tím
6. Phương pháp phân lập nấm đấm và nấm túi (Basidiomycetes và Ascomycetes)
7. Phương pháp rửa bề mặt

PHƯƠNG PHÁP ĐỊNH LOẠI NẤM SỢI

1. Yêu cầu
2. Quy trình định loại một chủng nấm sợi
3. Tiến hành định loại

NỘI DUNG CHI TIẾT CỦA TỪNG PHƯƠNG PHÁP

PHƯƠNG PHÁP LẤY MẪU :

Chúng ta có thể phân lập vi nấm từ bất kỳ một cơ chất tự nhiên nào vì mọi cơ chất trong tự nhiên đều có vi sinh vật bên trong. Tuy nhiên nếu chọn lấy mẫu một cách ngẫu nhiên, không có mục đích thì rất mất thời gian và tiền bạc.

Những vật liệu khác nhau sẽ được coi như những cơ chất khác nhau để phân lập nấm. Vật liệu chung nhất thường là: lá cây tươi, lá cây rụng, lá cây mục, phân động vật, côn trùng, nước ngọt, nước biển,....

Trước khi đi lấy mẫu phân lập nấm sợi chúng ta phải cân nhắc và suy nghĩ về những điều cần thiết sau:

- Sẽ chọn loại vật liệu để phân lập cho loại nấm nào
- Dùng bản đồ kiểm tra lại vị trí lấy mẫu.
- Sẽ dùng phương pháp phân lập nào cho mẫu đó.
- Sẽ mang mẫu như thế nào về phòng thí nghiệm.

Sau đó sẽ quyết định nơi lấy mẫu, chuẩn bị vật dụng đi lấy mẫu đó như: Túi ni lông, thìa, cân, túi đựng mẫu làm bằng giấy, chai lọ, đèn gas xách tay, túi chứa, ... Lập kế hoạch số lượng mẫu cần lấy

Phân lập nấm sau khi lấy mẫu càng sớm càng tốt.

1. Mẫu đất

Mẫu đất là mẫu có hiệu quả nhất vì có thể phân lập nấm trên mẫu đất với số lượng lớn. Có thể lấy mẫu đất ở nhiều nơi chẳng hạn như ở ruộng lúa, nơi trồng cây lấy hạt hoặc cánh đồng trồng rau, dưới rừng tùng hay dưới rừng tán lá rộng, ở vùng núi cao, ven bờ suối... Nấm phân lập được từ mẫu đất gọi là nấm đất, nhưng một số nấm phân lập được ở đáy hồ ao, sông suối hay đáy biển lại gọi là nấm ưa nước hay nấm ưa mặn.

Để phân lập được nhiều loài nấm khác nhau, nên lấy mẫu đất trên bề mặt dưới lớp lá cây mục vì quần thể nấm tập trung trên lớp đất bề mặt nhiều hơn là phần dưới đất sâu. Khi lấy mẫu, gạt bỏ lớp lá mục để lộ bề mặt lớp đất và dùng thìa sạch lấy phần đất bề mặt đó cho vào túi ni lông. Đồng thời ghi các thông số cần thiết về nơi lấy mẫu: địa chỉ, kinh độ, vĩ độ, ngày lấy mẫu, tình trạng lấy mẫu, nhiệt độ lúc lấy mẫu, người lấy mẫu.

2. Lá và cành cây khô

Nấm sợi phân lập từ lá và cành cây khô gọi là nấm rác (litter fungi). Để phân lập nấm rác có hiệu quả cần lấy mẫu lá và cành cây tốt. Trong trường hợp nấm rác, chúng ta phân lập được các loài nấm khác nhau khi lấy mẫu ở độ sâu khác nhau trong cùng một mẫu.

Mẫu lá cây khô lấy được nên để trong túi bằng giấy và nên xử lý ngay để phân lập, vì nếu để lâu theo thời gian mẫu khô dần, nấm rác trong mẫu sẽ phát triển kém đi và các vi sinh vật bên ngoài sẽ xâm nhiễm vào.

Phải ghi rõ tên thực vật lấy mẫu, độ phân huỷ của lá cây rụng, nơi lấy mẫu (kinh độ, vĩ độ, địa chỉ), ngày tháng lấy mẫu, người lấy mẫu.

3. Lá tươi và vỏ cây

Có ít nhất 3 nhóm nấm phân lập từ lá cây tươi, nhóm thứ nhất là **nấm bề mặt lá** (phyloplane fungi). Nhóm thứ 2 thuộc về **nấm gây bệnh**, bao gồm ký sinh bắt buộc và không bắt buộc. Nhóm thứ 3 là **nấm thực vật hoại sinh**, nhưng sự khác nhau giữa nhóm thứ 3 này và nhóm ký sinh không bắt buộc không phải lúc nào cũng rõ ràng.

Trong khi lấy mẫu lá cây tươi và vỏ cây, luôn phải ghi nhớ 6 điều sau:

- Quá trình phân huỷ có thể đã diễn ra, mặc dù trông bề ngoài lá vẫn như đang còn tươi (đặc biệt điều này hay diễn ra ở vùng nhiệt đới)
- Hệ sinh thái nấm trên lá thực vật sau khi ngắt có thể khác đi so với khi chúng còn trên cây
- Tính đa dạng sinh học của nấm ở lá tươi còn non sẽ kém hơn ở lá đã trưởng thành
- Hệ sinh thái nấm có thể khác nhau giữa bề mặt lá và mặt sau của lá
- Trong cùng một cây độ cao lấy mẫu của chúng sẽ cho hệ sinh thái nấm khác nhau.
- Mỗi loài thực vật khác nhau sẽ phân lập được các chủng nấm đặc hiệu, ví dụ như loài nấm *Trochophora simplex* chỉ phân lập được từ cây *Daphniphyllum macropodium*.

Đặc biệt khi phân lập nấm từ mẫu lá và vỏ cây thực vật, rất khó có thể phân lập được loài nấm trong thực vật gọi là nấm nước trên cạn (terrestrial aquatic fungi) vì nhóm nấm này sinh trưởng rất chậm và không dễ dàng sinh bào tử như những nấm trên bề mặt, nấm gây bệnh hay các nấm hoại sinh khác. Vì thế khó có thể phân lập các loài nấm này từ lá cây hay từ vỏ cây nếu chỉ sử dụng những kỹ thuật phân lập thông thường.

Nấm nước trên cạn sinh bào tử nhanh chóng nếu có nước kích thích, chẳng hạn gặp mưa, sương. Nên lấy mẫu sau khi trời mưa hoặc lấy mẫu từ những giọt sương đọng trên cành lá.

4. Phân

Thành phần hữu cơ trong phân là rất lớn, do đó khu hệ vi sinh vật trong đó vô cùng đa dạng. Những loài nấm có thể tồn tại được trên phân động vật được gọi là nấm phân. Sự thay đổi của nấm phân xuất hiện trên một mẫu phân động vật là một ví dụ điển hình về tính kế thừa ở nấm. Xuất hiện đầu tiên là ngành nấm tiếp hợp Zygomycota (ví dụ Basidiobolus), tiếp đến là Pyrenomycetes, Plectomycetes, và Discomycetes của ngành nấm túi Ascomycota (ví dụ

Arthroderma, Gymnoascus,...) rồi đến các nấm hoại sinh (Ví dụ Arthrotrys, Oedocephalum, Scopulariopsis,...) và cuối cùng là nấm đảm Basidiomycota (ví dụ Corprinus).

Người ta thường phân lập nấm phân từ phân động vật ăn cỏ chẳng hạn như phân ngựa, cừu, dê, thỏ, gia súc, và thậm chí là chuột cũng đã được công bố.

5. Côn trùng

Những côn trùng nhỏ bé như amip, giun đất, ve rận, sâu bọ,... là những mẫu tốt dùng cho phân lập nấm. Đặc biệt là nấm hoại sinh giun tròn (nematode-trapping fungi).

6. Nước ngọt và các vật liệu có trong nước ngọt

Từ mẫu nước ngọt chủ yếu phân lập được 2 nhóm nấm: nhóm thứ nhất là Chytridiomycota, nhóm thứ 2 là các loài nấm ưa nước, ưa nước hiếu khí. Để phân lập nhóm nấm này, nên lấy mẫu nước ngọt và lá rơi ở những ổ sinh thái nước, chẳng hạn như ở sông, suối, ao hồ. Đặc biệt nấm ưa nước dễ dàng bị mắc vào những khúc gỗ mục dưới lòng suối hay đằng sau các hốc đá có dòng nước chảy tạo bọt.

7. Nước mặn và các vật liệu có trong nước mặn.

Nấm sợi sống ở nước mặn gọi là nấm sợi ưa mặn, những đặc điểm hình thái và sinh lý của chúng giúp chúng thích nghi được với môi trường mặn. Có 2 nhóm nấm ưa mặn: một loại là ưa mặn bắt buộc (toàn bộ vòng đời của chúng trải qua trong môi trường mặn); loại kia là ưa mặn không bắt buộc (phần lớn có thể phân lập được chúng trong môi trường đất và cả trong môi trường mặn).

Để phân lập nấm ưa mặn, có thể lấy mẫu từ các cành củi mục, thực vật ưa mặn, thực vật ven biển, từ cát ở bãi biển và từ nước biển, đặc biệt là bọt biển là mẫu rất tốt để phân lập nấm ưa mặn.

Chú ý: Trên cùng một cơ chất, có thể có nhiều nhóm nấm tồn tại mỗi nhóm lại có một chu kỳ sống khác nhau, nên phân lập ở nhiều thời điểm khác nhau và bằng các phương pháp khác nhau thì có thể phân lập được loài mới hay tìm ra một hệ sinh thái mới của nấm.

PHƯƠNG PHÁP PHÂN LẬP

Kỹ thuật phân lập để tìm ra loài nấm mới hay nấm hữu ích là rất quan trọng trong quá trình nghiên cứu. Không có một quy luật chung nào dùng cho phân lập vi sinh vật. Phương pháp phân lập tốt nhất sẽ là phương pháp mà ta lựa chọn để phân lập vi sinh vật mà ta cần. Suy nghĩ một cách sáng tạo cho công việc và thành thạo với các kỹ thuật phân lập mới là yêu cầu chung của bất kỳ một nhà vi sinh vật nào.

Các nhà nấm học Nhật Bản thường dùng các phương pháp sau để phân lập nấm sợi: Sử dụng kim nhọn nhét bào tử; Phân lập bào tử đơn độc; Sử dụng vi thao tác Skerman; Phương pháp pha loãng; Phân lập từ bào tử đảm; Phương pháp rửa bề mặt; Phương pháp sát khuẩn bề mặt; Phương pháp dùng buồng kích ẩm; Phương pháp kích thích sự nảy mầm của nấm; Phương pháp sục khí.

Dưới đây là một số phương pháp hay dùng nhất, đã áp dụng phân lập nấm trong đất, trong lá cây rụng và nấm nội sinh endophyte tại Bảo tàng Giống chuẩn Vi sinh vật- TT công nghệ Sinh học- Đại học QG Hà nội trong chương trình hợp tác về nghiên cứu đa dạng sinh học với Viện Công nghệ và Đo lường Quốc gia Nhật Bản (NITE- Japan).

1. Phương pháp dùng kim nhọn

Sử dụng phương pháp này để phân lập tất cả mọi loại nấm phát triển trên bất kỳ một cơ chất nào.

Cách làm:

- Đặt cơ chất cần phân lập (lá, cành cây mục,...) lên kính hiển vi vật kính X10 (độ phóng đại 10 lần) hoặc lên kính lúp
- Chỉnh tiêu cự để quan sát được bào tử, cuống sinh bào tử từ cơ chất.
- Khử trùng que nhọn bằng ngọn lửa đèn cồn.

- Đưa que nhọn vào khoảng giữa vật kính và cơ chất, nhặt bào tử chuyển sang môi trường phân lập.
- Nuôi cấy bào tử ở nhiệt độ 25⁰C, quan sát sự nảy mầm của bào tử hàng ngày đến khi hình thành khuẩn lạc thì chuyển sang môi trường thạch nghiêng.

2. Phương pháp phân lập bào tử đơn độc:

Sử dụng phương pháp này để phân lập nấm gây bệnh thực vật.

Cách làm:

- Chuẩn bị dịch huyền phù bào tử: bằng cách dùng kim nhọn đánh bệt 1 đầu, gắn vào một cái tay cầm chắc chắn, dùng que đó cào vào chỗ trên lá cây bệnh có xuất hiện đốm nấm, đặt sang lam kính đã có sẵn một giọt nước vô trùng, khuấy đều.
- Dùng đầu kim lấy một giọt nước có hoà tan bào tử đó vẽ một hình tam giác lên môi trường thạch nước (Water agar). Ủ 20⁰C trong 24 giờ.
- Quan sát bằng kính hiển vi, tìm bào tử nảy mầm trên môi trường thạch đĩa theo đường viền tam giác trên. Đánh dấu điểm có bào tử nảy mầm bằng bút viết kính ở mặt dưới đĩa thạch.
- Chuyển đĩa môi trường thạch có nuôi cấy các bào tử trên sang kính lúp. Quan sát vị trí đánh dấu bào tử nảy mầm. Thanh trùng que cấy, dùng que cấy lấy bào tử nảy mầm ra, chuyển sang ống nghiệm môi trường thạch nghiêng để nuôi cấy.

3. Phương pháp dùng vi thao tác Skerman

Chuẩn bị dụng cụ:

Bộ vi thao tác Skerman gồm 5 phần (hình bên).



- Lấy một ống pipet pastơ hơi trên ngọn lửa đèn cồn, kéo thành ống rất nhỏ, dài khoảng 4cm, gắn vào ống sắt trên cục nam châm D (cố định bằng parafin nóng chảy).
- Cố định phần dụng cụ B vào vật kính 10
- Gắn nam châm có ống thủy tinh vào rãnh kim loại của dụng cụ B.
- Di chuyển phần thiết bị có gắn cục nam châm lên xuống cho đến khi nhìn thấy đầu ống thủy tinh ở giữa vi trường.
- Gắn đầu kim hàn E vào biến thế A và đặt vào vị trí đặt tiêu bản của kính hiển vi.
- Chỉnh kính, tìm vi trường, quan sát đầu kim hàn, điều chỉnh sao cho đầu que hàn và ống thủy tinh sát nhau và đều quan sát được dưới kính hiển vi.
- Bật biến thế A nấc cao để đầu que hàn nóng đỏ và tiến về phía ống thủy tinh, ấn que hàn chạm vào ống thủy tinh để ống thủy tinh bắt đầu nóng chảy, kéo nhanh ống thủy tinh khỏi kim hàn tạo thành que thủy tinh thuôn nhọn.
- Hạ nhiệt độ que hàn bằng cách giảm biến thế, dùng đầu que hàn chạm nhẹ vào đầu que thủy tinh kéo nhẹ tạo thành hình chữ L.

Tiến hành lấy từng bào tử đơn độc trên đĩa thạch.

Các bước tiến hành:

- Chuẩn bị mẫu: lá cây khô, cho vào hộp nhựa hoặc túi ni lông có chứa nước vô trùng sẵn để làm ẩm, giữ 2-3 ngày ở nhiệt độ phòng, để kích thích bào tử nảy mầm.
- Lấy mẫu lá trên cho vào cốc thủy tinh, cho thêm nước cất, khuấy nhẹ nhàng cho bào tử nổi lên mặt nước.
- Thu thập bào tử bằng cách lấy lam kính để nghiêng 45 độ so với mặt nước để lấy nước trên bề mặt cốc. Dùng lam kính đó trải một đường thẳng trên mặt đĩa môi trường phân lập nấm LCA (Low cacbon agar), MEA (Malt extract agar).
- Quan sát đĩa thạch trên dưới kính hiển vi, tìm bào tử có hình dạng đặc biệt. Khi thấy bào tử cần tìm thì giữ nguyên vị trí.
- Gắn phần dụng cụ hình chữ V (hình C) của bộ vi thao tác vào vật kính 10 của kính hiển vi. Tiếp đến gắn phần nam châm có que thủy tinh hình chữ L vừa làm xong vào phần dụng cụ chữ V đó. Điều chỉnh lên xuống sao cho có thể quan sát được đầu chữ L của que thủy tinh.
- Nâng kính lên sao cho bề mặt thạch sát với đầu que thủy tinh, lúc này ta có thể quan sát được cả bào tử nấm cần tìm và cả đầu L của que thủy tinh.
- Dùng que L kéo bào tử cần lấy ra phần môi trường sạch của đĩa thạch. Dùng chính kim phần chữ L đó đánh dấu điểm đặt bào tử.
- Hạ đĩa môi trường thấp xuống và dùng que cấy vô trùng lấy bào tử tại điểm đánh dấu chuyển sang đĩa thạch môi trường MEA. Nuôi cấy ở nhiệt độ phòng và quan sát sự nảy mầm của bào tử hàng ngày. Nếu bào tử nảy mầm thì có thể chuyển sang thạch nghiêng để giữ giống sau khi để ở thạch đĩa 2-4 tuần.

4. Phương pháp pha loãng

Phương pháp này dùng cho các mẫu đất.

- Trước hết các mẫu đất phải được xử lý trước khi phân lập bằng cách phơi khô ở nhiệt độ phòng 2-3 ngày, sau đó dùng rây qua sàng có kích thước 2-3mm.
- Cân 1g đất đã xử lý cho vào 9ml nước cất khử trùng, dùng vortex hoà tan đất.
- Pha loãng mẫu ở các nồng độ pha loãng khác nhau: 10^{-4} , 10^{-5} là 2 nồng độ thích hợp để phân lập nấm trong đất ở Việt Nam.
- Hút 0,5 ml dịch pha loãng ở 2 nồng độ trên nhỏ lên đĩa Peptri chứa môi trường phân lập (môi trường Martin, hoặc môi trường cơ sở). Dùng que gạt trang đều dịch trên bề mặt thạch.
- Đặt đĩa thạch trong tủ 25°C, phân lập nấm sợi từ những khuẩn lạc riêng rẽ trên đĩa thạch sau khoảng thời gian 4- 10 ngày.

5. Phương pháp pha loãng kết hợp với xử lý tia cực tím

Tương tự như 4 bước ban đầu của phương pháp pha loãng. Thêm một bước tiếp đó là đặt đĩa Peptri chứa môi trường phân lập và đã gạt dịch pha loãng đều trên bề mặt thạch vào tủ cấy và bật đèn tím 20 phút.

Các bước khác tương tự như phương pháp pha loãng thông thường.

6. Phương pháp phân lập nấm đấm và nấm túi (Basidiomycetes và Ascomycetes)

- Quả thể nấm sau khi thu hái, rửa sạch, cắt miếng nhỏ khoảng 5cm phần bên trong.
- Rửa sạch bằng nước cất vô trùng (2-3 phút), sau đó dùng băng dính 2 mặt dính 3-4 miếng cắt quả thể gắn vào nắp trên của đĩa thạch nước. Đánh dấu vị trí gắn miếng nấm bằng bút viết kính ở đáy đĩa thạch nước.
- Ủ 20°C trong vòng 24 giờ.
- Soi dưới kính lúp tại vị trí đánh dấu xem độ nảy mầm của bào tử nấm.
- Dùng que cấy hình vòng tròn lấy đám bào tử vừa nảy mầm, chuyển sang đĩa môi trường thạch cao malt.

7. Phương pháp rửa bề mặt

Phương pháp này dùng để phân lập nấm từ lá tươi hoặc lá rụng.

Cách làm:

- Cắt mẫu lá cây (tươi và khô), rễ cây, cành cây,... ra thành các miếng nhỏ, sau đó cho vào ống nghiệm.
- Thêm 20ml dung dịch 0.005% Aerosol OT (di-iso-octyl sodium sulfosuccinate) hoặc dung dịch 0.005% Tween 80, lắc mạnh bằng máy vortex khoảng 10 phút để loại trừ vi sinh vật bám trên bề mặt mẫu.
- Bước làm khô mẫu: loại bỏ nước trong ống nghiệm, dùng kẹp vô trùng lấy mẫu ra đặt lên bề mặt giấy lọc để qua đêm trong tủ cấy vô trùng, bước này có tác dụng loại bỏ sự nhiễm khuẩn.
- Dùng kẹp vô trùng đặt mẫu đã làm khô lên bề mặt môi trường thạch LCA lăn một vòng mẫu lá (để loại tạp nhiễm (nếu có) một lần nữa), mỗi đĩa thạch có thể chia làm 8 phần để kiểm tra.
- Sau đó chuyển mẫu sang đĩa thạch môi trường LCA vô trùng khác, mỗi đĩa nên đặt một mẫu, mỗi mẫu 5 miếng cắt. Ủ ở nhiệt độ 25⁰C trong vòng một tháng.
- Trong khoảng thời gian đó hàng ngày phải kiểm tra sự nảy mầm của các vi sinh vật dưới kính lúp, phân lập nấm sợi nếu có.

PHƯƠNG PHÁP ĐỊNH LOẠI NẤM SỢI

1. Yêu cầu:

- Có được các chủng nấm sợi thật thuần khiết (không được lẫn tạp nấm hoặc các vi sinh vật khác).
- Các chủng cần định loại phải được nuôi cấy trên các môi trường, nhiệt độ, thời gian nuôi cấy theo đúng quy

2. Quy trình định loại một chủng nấm sợi:

Quan sát đặc điểm phân loại của chủng nấm sợi cần định loại.

Quan sát đặc điểm khuẩn lạc trên thạch

- Hình dáng
- Kích thước (đường kính, chiều dày)
- Dạng mặt (nhung mượt, mịn, len xốp, dạng hạt, lồi lõm, có khía hay không...)
- Màu sắc khuẩn lạc mặt trên và mặt dưới
- Dạng mép khuẩn lạc (mông, dày, phẳng, nhăn nheo...)
- Giọt tiết nếu có (nhiều, ít, màu sắc)
- Mùi khuẩn lạc (có, không mùi)
- Sắc tố hoà tan (màu của môi trường xung quanh khuẩn lạc) nếu có.
- Các cấu trúc khác: bó sợi, bó giá (Synnematosus or sporodochial conidiomata) các cấu trúc mang bào tử trần (Fruit body - conidiomata) như đĩa giá (acervuli) hoặc túi giá (Pycnidia), đệm nấm (Stroma), hạch nấm (sclerotia) vv..

Quan sát các đặc điểm vi học

- Sợi nấm: (hyphae) có vách ngăn, không có vách ngăn, có mấu.
- Bào tử trần(conidia): kiểu phát sinh bào tử trần (ở nấm bất toàn), hình dạng, kích thước, màu sắc, bề mặt (nhẵn, có gai, gồ ghề) cách sắp xếp đơn độc chuỗi gốc non (basipetal) chuỗi gốc già (acropetal) khối cầu vv...
- Bộ máy mang bào tử (spore apparatus): nang bào tử và nang bào tử nhỏ (nếu có) (Sporangia & Sporangiola) hình dáng, kích thước, màu sắc, bề mặt của nang, cuống nang, không hoặc có nhánh (nhánh mọc vòng, mọc cách, hợp trục vv...); bào tử nang (hình dạng, kích thước, bề mặt, ...) ở nấm tiếp hợp.
- Bộ máy mang bào tử trần (conidiogenous apparatus): giá bào tử trần (conidiophore) - kích thước, đường kính, chiều dài, bề mặt (nhẵn, có gai, có nốt sần, vv...) màu sắc, có vách ngang hoặc không, có hoặc không có cấu

trúc đặc biệt như tế bào chân (foot cell) sợi cứng (setae) tăng trưởng ở gốc hoặc ở ngọn có hoặc không có dạng hình thái đặc biệt như bó giá, đệm giá. Các nhánh (của bào tử trần) số lượng nhánh, kích thước bề mặt, màu sắc, cách sắp xếp (đối xứng, không đối xứng sát nhau hoặc tẽ rộng, vị trí dọc giá bào tử trần hoặc tập trung ở ngọn giá)vv...

- Tế bào sinh bào tử trần (conidiogenous cell)

Kiểu tế bào sinh bào tử trần (thể bình, dạng có khuyên ở đỉnh, dạng sinh bào tử trần đồng thời, như dạng (dạng bình- phialo type; dạng phân đốt, Anello type). Dạng sinh bào tử trần không đồng thời (Aleurio- type), bào tử đỉnh kiểu này chồi (Blasto - type), dạng sinh bào tử trần qua lỗ để lại sẹo (Poro - type) vv.. hình dạng, kích thước, màu sắc, cách sắp xếp (đơn độc hoặc thành cụm, thành vòng), vị trí (trên sợi nấm, dọc theo giá bào tử trần, các nhánh hoặc ở đỉnh giá) vv...

- Thể quả túi (ascocarp) như cleistothecium, cần khảo sát vị trí, số lượng, hình dạng, kích thước, màu sắc, bề mặt của thể quả, quan sát túi bào tử (ascus) bào tử túi (ascospore) về hình dạng, kích thước bề mặt.

Tiến hành định loại

Căn cứ vào kết quả quan sát đầy đủ, chính xác các đặc điểm của khuẩn lạc và các đặc điểm vi học tiến hành xác định tên loài (hoặc thứ nếu có) chủng nấm mốc như sau:

- Dùng khoá phân loại của các nhóm phân loại bậc cao (ngành, ngành phụ, lớp, bộ, họ, chi) để xác định lần lượt xem những nấm mốc thuộc chi nấm mốc nào. Tiếp theo dùng khoá phân loại của chi đó để xác định đến loài (thứ) bằng cách so sánh tất cả các đặc điểm đã quan sát được của chủng nấm mốc đó với các đặc điểm tương ứng của loài nào đó trong khoá phân loại. Nếu các đặc điểm so sánh phù hợp với đặc điểm của loài mô tả trong khoá, ta xác định được tên loài của chủng nấm mốc cần định loại.

- Nếu có chủng nấm mẫu của loài (hoặc thứ) vừa xác định thì tiến hành so sánh các đặc điểm hình thái khuẩn lạc, đặc điểm vi học của chủng mẫu với các đặc điểm tương ứng của chủng cần định loại. Nếu các đặc điểm của 2 chủng phù hợp với nhau thì có thể khẳng định chắc chắn loài (hoặc thứ) của chủng nấm mốc cần định loại.

- Nếu có chủng nấm mẫu của loài (hoặc thứ) vừa xác định thì tiến hành so sánh các đặc điểm hình thái khuẩn lạc, đặc điểm vi học của chủng mẫu với các đặc điểm tương ứng của chủng cần định loại. Nếu các đặc điểm của 2 chủng phù hợp với nhau thì có thể khẳng định chắc chắn loài (hoặc thứ) của chủng nấm mốc cần định loại.

CHƯƠNG 3 - VIRUS

Virus được phát hiện vào năm 1892 do sự nghiên cứu bệnh khảm cây thuốc lá của Ivanoski. Ông đã làm các thí nghiệm và thu được các kết quả như sau:

- Dịch ép cây bệnh → lọc qua màng lọc vi khuẩn → tiêm vào cây lành → cây bị bệnh
 - Khi cấy dịch lọc lên môi trường dinh dưỡng tổng hợp → không thấy có sự phát triển
 - Không quan sát được dưới kính hiển vi
- ↳ Gọi tác nhân gây bệnh là siêu vi khuẩn

Những năm tiếp theo đã xác định được virus gây lở mồm long móng, virus sốt vàng và hàng chục loại virus gây bệnh khác nhau.

Virus chủ yếu gây ra các bệnh truyền nhiễm ở người, ĐV, TV và côn trùng (*bài đọc thêm*)

1. Đặc điểm của virus

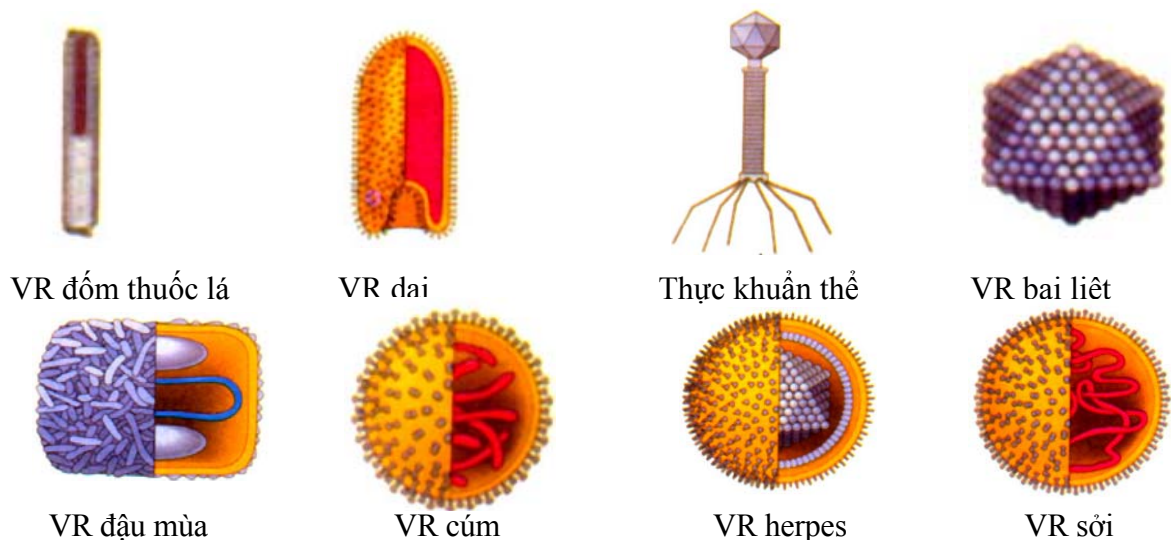
- Kích thước rất nhỏ bé (20-250nm)
- Không có cấu tạo tế bào (phi bào)
- Thành phần hoá học đơn giản (gồm protein và acid nucleic)
- Không có khả năng sinh trưởng, phát triển trong môi trường dinh dưỡng tổng hợp
- Ký sinh nội bào
- Một số virus động, thực vật có khả năng tạo thành tinh thể

2. Hình thái và cấu trúc của virus

2.1. Hình thái

Virus có nhiều hình dạng khác nhau:

- Hình cầu: gồm phần lớn các virus gây bệnh cho người và động vật như virus cúm, quai bị, bạch hầu...
- Hình que: thường gây bệnh cho thực vật như khảm thuốc lá, đốm lá khoai tây
- Hình khối: virus đậu mùa
- Phức hợp: đặc trưng cho virus ký sinh trên vi khuẩn



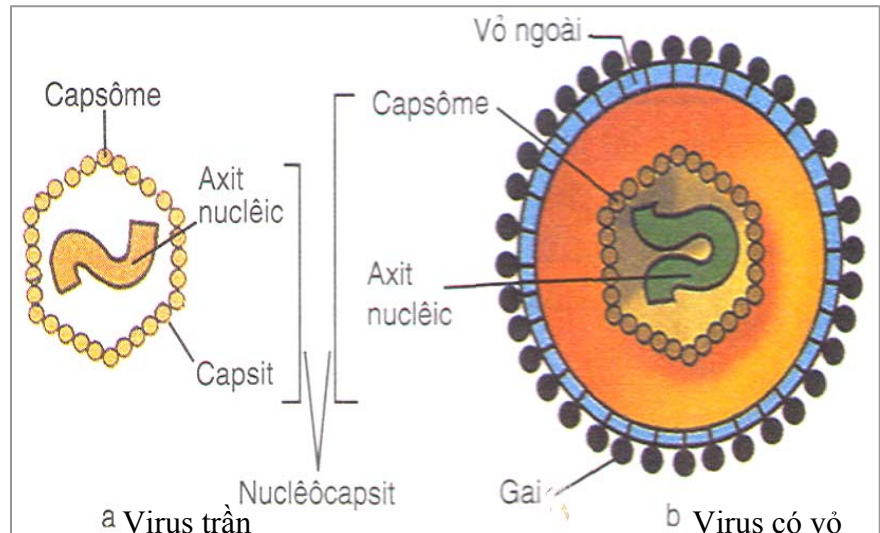
2.2. Cấu tạo cơ bản

Virus có cấu tạo bao gồm phần vỏ và phần lõi

Phần vỏ

Vỏ capsid

Capsid là vỏ protein được cấu tạo bởi các đơn vị hình thái gọi là capsome. Đây là lớp vỏ bắt buộc của tất cả các virus. Capsome lại được cấu tạo từ 5 hoặc 6 đơn vị cấu trúc gọi là protome. Protome có thể là monome (chỉ có một phân tử protein) hoặc polyme (có nhiều phân tử protein)



- Capsid có khả năng chịu nhiệt, pH và các yếu tố ngoại cảnh nên có chức năng bảo vệ lõi acid nucleic

- Trên mặt capsid chứa các thụ thể đặc hiệu, hay là các gai glicoprotein, giúp cho virus bám vào các thụ thể trên bề mặt tế bào. Đây cũng chính là các kháng nguyên (KN) kích thích cơ thể tạo đáp ứng miễn dịch (ĐUMD).

- Vỏ capsid có kích thước và cách sắp xếp khác nhau khiến cho virus có hình dạng khác nhau. Có thể chia ra ba loại cấu trúc: đối xứng xoắn, đối xứng hình khối và cấu trúc phức tạp.

Vỏ ngoài

Một số virus còn có vỏ bọc xung quanh vỏ capsid và được gọi là vỏ ngoài, cấu tạo bởi hai lớp lipid và protein có nguồn gốc từ màng sinh chất. Đây là thành phần không bắt buộc của virus. Vỏ ngoài dễ bị biến tính do tác động của các yếu tố ngoại cảnh (dung môi hữu cơ, enzyme...) làm mất khả năng lây nhiễm của virus

Virus không có vỏ ngoài gọi là virus trần

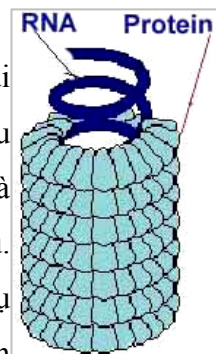
Hệ gen của virus

Virus chỉ chứa AND hoặc ARN mà không bao giờ chứa cả hai loại. Điều này ngược lại với các cơ thể có cấu tạo tế bào (trong mỗi tế bào bao giờ cũng có hai loại acid nucleic). Hệ gen của các cơ thể bậc cao của cả động và thực vật bao giờ cũng là AND chuỗi kép, còn hệ gen của virus có thể là AND hoặc ARN ở dạng chuỗi đơn hoặc chuỗi kép. Cả 4 loại genom AND chuỗi kép, AND chuỗi đơn, ARN chuỗi kép, ARN chuỗi đơn đều tìm thấy trong số các virus động vật, thực vật và vi sinh vật.

Phức hợp bao gồm vỏ capsid và lõi acid nucleic và gọi là nucleocapsid (thành phần hoá học thì gọi là nucleoprotein, đối với virus ARN thì còn gọi là ribonucleoprotein)

2.2.1. Cấu trúc đối xứng xoắn

Thuộc loại này bao gồm các virus gây bệnh khảm thuốc lá (TMV), dại (rhabdo), quai bị, sởi (paramyx), cúm (orthomyxo). Sở dĩ các virus có cấu trúc này là do capsome sắp xếp theo chiều xoắn của acid nucleic. Tùy loại mà có chiều dài, đường kính và chu kỳ lặp lại của các nucleocapsid khác nhau. Cấu trúc xoắn thường làm cho virus có dạng hình que hay hình sợi. Ví dụ virus đốm thuốc lá. Ở virus cúm các nucleocapsid được bao bởi vỏ ngoài nên

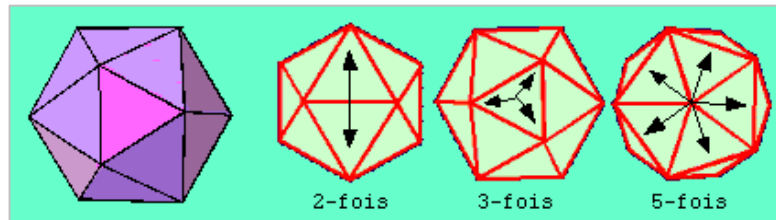


khi quan sát dưới kính hiển vi điện tử thấy chúng có dạng cầu.

VR khảm TL

2.2.2. Cấu trúc đối xứng dạng khối đa diện 20 mặt

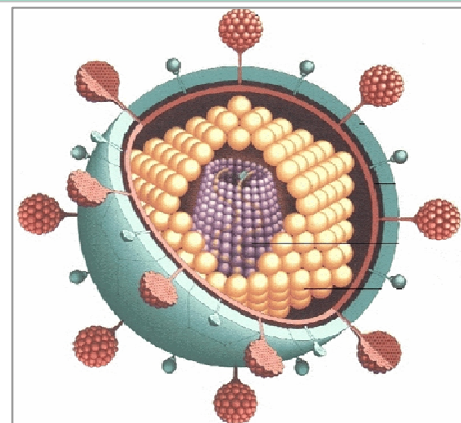
Ở các virus loại này, capsome sắp xếp tạo vỏ capsid hình khối đa diện với 20 mặt tam giác đều, có 30 cạnh và 12 đỉnh. Đỉnh là nơi



gặp nhau của 5 cạnh. Thuộc loại này gồm các virus adeno, reo, herpes và picorna. Gọi là đối xứng vì khi so sánh sự sắp xếp của capsome theo trục. Ví dụ đối xứng bậc 2, bậc 3, bậc 5, vì khi ta xoay với 1 góc 180^0 (bậc 2), 120^0 (bậc 3) và 72^0 (bậc 5) thì thấy vẫn như cũ.

Các virus khác nhau có số lượng capsome khác nhau. Virus càng lớn, số lượng capsome càng nhiều.

Cấu trúc khối thường làm cho virus có dạng hình cầu

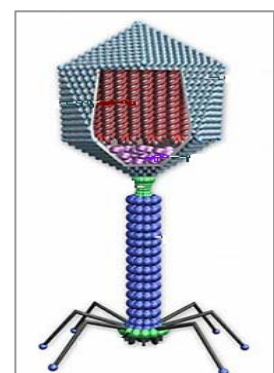


Virus HIV

2.2.3 Virus có cấu tạo phức tạp

Một số virus có cấu tạo phức tạp, điển hình là phage và virus đậu mùa. Phage có cấu tạo gồm đầu hình khối đa diện, gắn với đuôi có cấu tạo đối xứng xoắn. Phage T chặn (T2, T4, T6) có đuôi dài trông giống như tinh trùng, còn phage T lẻ (T3, T7) có đuôi ngắn, thậm chí có loại không có đuôi (?6, ?X174).

Virus đậu mùa có kích thước rất lớn, hình viên gạch. ở giữa là lõi lõm hai phía trông như quả tạ.



Thực khuẩn thể T2

3. Môi quan hệ giữa virus và tế bào

Sự nhân lên của virus có thể làm tan dẫn đến chết tế bào gọi là chu trình tan (lytic cycle) hoặc có thể tồn tại lâu dài trong tế bào dưới dạng tiềm ẩn mà không gây chết tế bào gọi là chu trình tiềm tan (latent cycle).

3.1. Chu trình tan

Đại đa số virus sau khi xâm nhập tế bào, tiến hành nhân lên làm tan và giết chết tế bào. Virus nhân lên mà **phá vỡ tế bào chủ** gọi là **virus độc** và tế bào này gọi là **tế bào sinh tan**.

Các nguyên nhân gây chết tế bào có thể kể đến

- Ở giai đoạn sớm đã làm xáo trộn quá trình tổng hợp protein của tế bào
- Tích lũy các chất gây độc tế bào
- Phá hủy lysosom giải phóng các enzyme tiêu hóa vào tế bào chất mà gây tan bào

3.2. Chu trình tiềm tan

Là trạng thái nhiễm virus mà không gây tan bào, trong đó hệ gen của virus gắn xen vào nhiễm sắc thể của tế bào.

Virus nhân lên mà **không phá vỡ tế bào chủ** gọi là **virus ôn hòa** và tế bào này được gọi là **tế bào tiềm tan**.

Ở virus động vật ADN gắn xen gọi là **provirus** (*bài đọc thêm*), còn ở thể thực khuẩn thì gọi là **prophage**.

Hệ thống miễn dịch của cơ thể không tiếp xúc được được virus ở trạng thái tiềm tan vì không thấm được vào tế bào.

Khi tế bào động vật ở giai đoạn giảm phân, NST nhân đôi hay có các tác động vật lý, hóa học thì provirus cũng có thể tạo thêm các đặc điểm mới hoặc gây hại cho tế bào chúng nhiễm.

Ví dụ : (i) Một prophage có gen mã hóa cho một độc tố (trường hợp *Cl. botulinum*)

(ii) Một hiện tượng khác là tải nạp, đó là đoạn ADN của tế bào này có thể chuyển qua tế bào khác thông qua phage (có chứa cả đoạn ADN của phage)

(iii) Ung thư có thể phát triển khi virus xâm nhập vào tế bào, gen virus ở trạng thái tiềm tan có thể mã hóa tạo protein gây ung thư.

4. Sự xâm nhập virus vào tế bào vật chủ và sự sinh sản của chúng

Sự sinh sản của virus không phải là sự sinh sôi nảy nở như vi khuẩn mà chỉ là sự tổng hợp của hai thành phần cơ bản rồi lắp ráp lại với nhau

Sao chép acid nucleic + tổng hợp protein → hạt virus

Sự sinh sản của virus được chia thành các giai đoạn :

Hấp phụ, xâm nhập, sao chép và lắp ráp, phóng thích

4.1. Hấp phụ

Bước đầu của quá trình nhân lên là sự bám của virus trên tế bào vật chủ. Quá trình hấp phụ xảy ra khi có mối liên kết đặc hiệu giữa thụ thể của virus với thụ thể của tế bào. Điều này giải thích tại sao mỗi virus chỉ ký sinh trên một tế bào vật chủ nhất định.

Quá trình hấp phụ không cần tiêu hao năng lượng.

Trong trường hợp thể thực khuẩn, trên bề mặt của mỗi vi khuẩn có khoảng 300 điểm hấp phụ. Các thể thực khuẩn khác nhau có các vị trí khác nhau về điểm hấp phụ. Thể thực khuẩn T3, T4, T7 có điểm hấp phụ là lipopolysaccharide, T2 và T6 là protein, *Salmonella* có điểm hấp phụ là tiên mao.

4.2. Xâm nhập

Quá trình xâm nhập diễn ra theo hai cách :

- Màng virus dung hợp với màng sinh chất của tế bào do bản chất các màng này giống nhau rồi đẩy phần lõi virus vào tế bào chất, còn phần vỏ ngoài virus nằm lại trên bề mặt tế bào
- Xâm nhập theo cơ chế thực bào hoặc nhập bào. Một phần màng tế bào lõm vào, virus bị đẩy vào tế bào. Màng tế bào bao lấy virus tạo bong nằm trong tế bào chất, bơm proton trong bong làm giảm pH xuống 5, phần kị nước sắp xếp lại tạo điều kiện để màng virus dung hợp với màng bong, nhờ đó nucleocapsid giải phóng vào tế bào chất.

Trong trường hợp thể thực khuẩn, sau khi hấp phụ, đĩa gốc và sợi đuôi sẽ nhận được kích thích, bao đuôi sẽ có các vận động phức tạp, chúng co lại một nửa và đâm ống đuôi qua thành TB và màng TBC. Các enzym ở đầu ống đuôi sẽ hoà tan một phần của thành TB. Thời gian từ hấp phụ đến xâm nhập là rất ngắn (khoảng 15s đối với thể thực khuẩn T4).

Nếu có hai thể thực khuẩn cùng xâm nhập thì cuối cùng chỉ có 1 thể thực khuẩn sinh sản.

4.3. Sao chép, lắp ráp

Khi đã xâm nhập, virus cung cấp thông tin cho tế bào vật chủ để tổng hợp nên các nguyên liệu cho chúng. Các nguyên liệu bao gồm các bộ phận của virus (protein và acid nucleic), sau đó các bộ phận này lắp ráp với nhau thành các virus có kích thước như nhau

4.4. Phóng thích

Một số virus động, thực vật sẽ giết chết tế bào vật chủ và thoát ra ngoài khi tế bào vật chủ đã bị tự phân, một số khác có thể chui ra từ từ mà không giết chết tế bào

Đối với đa số thực khuẩn thể, enzyme lysozym được mã hóa phân giải thành tế bào làm cho thành tế bào vỡ, các thể thực khuẩn ồ ạt ra ngoài lây nhiễm vào tế bào khác.

(bài đọc thêm)

5. Phân loại virus

ICTV (International Committee on Taxonomy of Viruses) đưa ra các tên chuẩn phân loại dựa trên các đặc điểm hình thái, bao gồm kích thước, hình dạng, kiểu đối xứng của capsid, có hay không vỏ ngoài; các đặc điểm vật lý bao gồm cấu trúc genom, sự miễn cảm đối với các tác nhân lý, hoá; các đặc điểm của lipid, cacbohidrat, các protein cấu trúc và không cấu trúc; đặc trưng kháng nguyên và các đặc điểm sinh học khác như phương thức nhân lên, loại vật chủ, phương thức lây truyền và khả năng gây bệnh.

Tuy nhiên người ta ước đoán rằng muốn xác định chính xác một loại virus mới cần phải có tới khoảng 500 đặc điểm. ICTV đang tạo dựng cơ sở dữ liệu (database) cho phép liệt kê các loại virus đến mức độ chủng (*bài đọc thêm*)

BÀI ĐỌC THÊM CHƯƠNG VIRUS

LỊCH SỬ NGHIÊN CỨU VIRUS

Ngay từ năm 1883 nhà khoa học người Đức Adolf Mayer khi nghiên cứu bệnh khảm cây thuốc lá đã nhận thấy bệnh này có thể lây nếu phun dịch ép lá cây bị bệnh sang cây lành, tuy nhiên ông không phát hiện được tác nhân gây bệnh.



Năm 1884 Charles Chamberland đã sáng chế ra màng lọc bằng sứ để tách các vi khuẩn nhỏ nhất và vào năm 1892 nhà thực vật học người Nga Dimitri Ivanovski đã dùng màng lọc này để nghiên cứu bệnh khảm thuốc lá. Ông nhận thấy dịch ép lá cây bị bệnh đã cho qua màng lọc vẫn có khả năng nhiễm bệnh cho cây lành và cho rằng tác nhân gây bệnh có lẽ là vi khuẩn có kích thước nhỏ bé đến mức có thể đi qua màng lọc, hoặc có thể là độc tố do vi khuẩn tiết ra. Giả thuyết về độc tố qua màng lọc đã bị bác bỏ vào năm 1898 khi nhà khoa học người Hà Lan Martinus Beijerinck chứng minh được rằng tác nhân lây nhiễm là chất độc sống (*Contagium vivum fluidum*) và có thể nhân lên được. Ông tiến hành phun dịch ép lá cây bệnh cho qua lọc rồi phun lên cây và khi cây bị bệnh lại lấy dịch ép cho qua lọc để phun vào các cây khác. Qua nhiều lần phun đều gây được bệnh cho cây. Điều đó chứng

tỏ tác nhân gây bệnh phải nhân lên được vì nếu là độc tố thì năng lực gây bệnh sẽ phải dần mất đi.

Năm 1901 Walter Reed và cộng sự ở Cuba đã phát hiện tác nhân gây bệnh sốt vàng, cũng qua lọc. Tiếp sau đó các nhà khoa học khác phát hiện ra tác nhân gây bệnh dại và đậu mùa. Tác nhân gây bệnh đậu mùa có kích thước lớn, không đi qua màng lọc, do đó các tác nhân gây bệnh chỉ đơn giản gọi là virus.

Năm 1915 nhà vi khuẩn học người Anh Frederick Twort và năm 1917 nhà khoa học người Pháp Felix d'Hérelle đã phát hiện ra virus của vi khuẩn và đặt tên là Bacteriophage gọi tắt là phage.

Năm 1935 nhà khoa học người Mỹ Wendell Stanley đã kết tinh được các hạt virus gây bệnh đốm thuốc lá (TMV). Rồi sau đó TMV và nhiều loại virus khác đều có thể quan sát được dưới kính hiển vi điện tử. Như vậy nhờ có kỹ thuật màng lọc đã đem lại khái niệm ban đầu về virus và sau đó nhờ có kính hiển vi điện tử đã có thể quan sát được hình dạng của virus, tìm hiểu được bản chất và chức năng của chúng.

Ngày nay virus được coi là thực thể chưa có cấu tạo tế bào, có kích thước siêu nhỏ và có cấu tạo rất đơn giản, chỉ gồm một loại acid nucleic, được bao bởi vỏ protein. Muốn nhân lên virus phải nhờ bộ máy tổng hợp của tế bào, vì thế chúng là ký sinh nội bào bắt buộc.

Virus có khả năng gây bệnh ở mọi cơ thể sống từ vi khuẩn đến con người, là thủ phạm gây thiệt hại nặng nề cho ngành chăn nuôi, gây thất bát mùa màng và cản trở đối với ngành công nghiệp vi sinh vật.

Từ những thập kỷ cuối của thế kỷ XX trở lại đây ngày càng xuất hiện các dạng virus mới lạ ở người, động vật mà trước đó y học chưa hề biết tới, đe dọa mạng sống của con người. Sau HIV, SARS, Ebola, cúm A H5N1 sẽ còn bao nhiêu loại nữa sẽ xuất hiện để gây tai họa cho con người.

Mặt khác, do có cấu tạo đơn giản và có genom nhiều kiểu với cơ chế sao chép khác hẳn ở các cơ thể khác nên virus được chọn là mô hình lý tưởng để nghiên cứu nhiều cơ chế sinh học ở mức phân tử dẫn đến cuộc cách mạng sinh học cận đại: Sinh học phân tử, di truyền học phân tử. Vì những lý do trên việc nghiên cứu virus đã được đẩy mạnh và trở thành một ngành khoa học độc lập rất phát triển.

SỰ NHIỄM VIRUS VÀO TẾ BÀO VẬT CHỦ VÀ SỰ NHÂN LÊN CỦA NÓ

Để xâm nhập vào tế bào chủ, ADN của virus phải bám được vào một điểm tiếp nhận chuyên biệt trên bề mặt của tế bào.

Ở những virus nhiễm động vật, virus đi nguyên vào tế bào sau đó vỏ protein và acid nucleic tách ra trong tế bào chủ. Virus nhiễm thực vật không có kiểu bám đặc biệt; chúng có thể đi nguyên vào tế bào xuyên qua vách, hay được bơm vào tế bào bởi côn trùng; một lần đi vào trong tế bào cây chủ, virus được chuyên chở từ phần này đến phần khác trong cây qua ngã mô libe.

Ở Thực khuẩn T4 để xâm nhập vào tế bào Vi khuẩn, trước tiên phần sợi đuôi bám vào bề mặt tế bào chủ. Sau đó bám vào các điểm tiếp nhận trên vách tế bào chủ và tiếp theo đĩa gốc cũng bám vào tế bào chủ, kể đó một lỗ được thành lập trên vách của tế bào Vi khuẩn, tại đây bao đuôi co rút lại và chỉ bơm ADN vào tế bào Vi khuẩn. Trong tế bào chủ, ADN của Thực khuẩn được sao chép và phiên mã nhờ các enzym của tế bào chủ, mARN được dịch mã để tạo các thành phần của vỏ protein. Sau đó, phần đầu của vỏ bao quanh ADN, đuôi, đĩa gốc và các sợi đuôi được gắn thêm vào. Cuối cùng tế bào chủ vỡ ra và phóng thích Thực khuẩn (Pha tiêu bào: lytic phase).

Khi vào trong tế bào chủ và sinh sản, nó đòi hỏi phải có enzym để tổng hợp phần đầu và vỏ protein. Do đó nó phải tạo ra ARN thông tin để tổng hợp vừa enzym và protein vỏ. Nó cần sao chép acid nhân cho virus mới. Tất cả vật liệu và năng lượng cũng như bộ máy tổng hợp đều được cung cấp bởi tế bào chủ. Các virus khác nhau không chỉ ở phần lõi acid nhân, một số là sợi đơn ARN, sợi đôi ARN; một số khác là sợi đơn ADN hay sợi đôi ADN, mà còn khác nhau về cách sao chép và biểu hiện của gen.

Thí dụ như ở virus gây bệnh cúm, có lõi là sợi đơn ARN, ARN này không trực tiếp mã hóa protein, nhưng nhờ enzym replicaz (enzim sao chép) sợi ARN bổ sung được tạo ra, sợi này mã hóa protein của virus; vì thế sợi này hoạt động như ARN thông tin vừa mã hóa cho nhiều enzym sao chép vừa mã hóa protein vỏ của Virus. Vì dạng nhiễm của ARN không mã hóa cho một loại protein nào nên những virus này được gọi là virus sợi âm (negative strand virus).

Một nhóm virus ARN khác, được gọi là virus phiên mã ngược (retrovirus), tạo ra ADN bổ sung cho bộ gen trong ARN của nó bằng cách điều khiển ký chủ tổng hợp enzym phiên mã ngược (reverse transcriptaz). Sau đó sợi ADN thứ hai được sao chép và sợi đôi ADN này hòa nhập vào bộ gen tế bào chủ. Tại đây nó làm khuôn cho những bản sao ARN mới để tạo ra những virus mới trong suốt quá trình sinh sản của virus.

Virus với sợi đơn ADN trước tiên sao chép sợi bổ sung để tạo ra phân tử ADN dạng vòng trong tế bào chủ. Sợi bổ sung này trở thành khuôn cho ADN của virus mới cũng như phiên mã ra mARN để tổng hợp enzym của virus nhờ ribô thể của tế bào chủ. Sợi đôi ADN của virus tạo ra mARN cần thiết để tạo ra một số enzym của virus từ cả hai sợi, các enzym này cần thiết cho sự sao chép ADN virus và cho các loại protein cấu trúc vỏ.

Thực khuẩn T4, với một vài bộ phận cấu thành, chúng được ráp nối lại với nhau qua một quá trình gọi là tự ráp nối (self-assembly) trong đó có những bước không đòi hỏi enzym hay một khuôn mẫu nào. Bộ gen của virus mã hóa cho sự thành lập các phần khác nhau của virus. Khi các phần được ráp nối đầy đủ, tế bào bị vỡ ra do một enzym được mã hóa bởi virus và virus được phóng thích.

VỎ NGOÀI VÀ PROTEIN CỦA VIRUS

Vỏ ngoài

Một số virus có vỏ ngoài (envelope) bao bọc vỏ capsid. Vỏ ngoài có nguồn gốc từ màng sinh chất của tế bào được virus cuốn theo khi nảy chồi. Vỏ ngoài có cấu tạo gồm 2 lớp lipid và protein.

Lipid gồm phospholipid và glycolipid, hầu hết bắt nguồn từ màng sinh chất (trừ virus pox từ màng Golgi) với chức năng chính là ổn định cấu trúc của virus.

Protein vỏ ngoài thường là glycoprotein cũng có nguồn gốc từ màng sinh chất, tuy nhiên trên mặt vỏ ngoài cũng có các glycoprotein do virus mã hóa được gắn trước vào các vị trí chuyên biệt trên màng sinh chất của tế bào, rồi về sau trở thành cấu trúc bề mặt của virus. Ví dụ các gai gp 120 của HIV hay hemagglutinin của virus cúm, chúng tương tác với receptor của tế bào để mở đầu sự xâm nhập của virus vào tế bào.

Vỏ ngoài cũng có nguồn gốc từ màng nhân do virus lắp ráp và nảy chồi qua màng nhân (virus herpes) Dưới tác động của một số yếu tố như dung môi hoà tan lipid, enzym, vỏ ngoài có thể bị biến tính và khi đó virus không còn khả năng gây nhiễm nữa.

Protein của virus

Các phương pháp nghiên cứu protein virus

Trước hết cần phải tách chúng khỏi tế bào. Điều này có thể thực hiện được nhờ hàng loạt các bước ly tâm tách, tiếp đó là ly tâm theo gradient nồng độ saccharoza.

Ly tâm gradient nồng độ saccharoza thường cho kết quả thể hiện ở các băng (band) rất rõ nét tại các vị trí đặc thù trên gradient. Các băng này được dùng cho các nghiên cứu tiếp theo. Thông thường để nghiên cứu các virion đánh dấu đồng vị phóng xạ, người ta dùng hàng loạt kỹ thuật như điện di trên gel polyacrylamit, western Blotting (phản ứng với kháng thể).

Vị trí protein của virus trong tế bào có thể xác định được nhờ kỹ thuật nhuộm phân biệt và miễn dịch huỳnh quang, cho kháng thể đơn dòng tương tác với epitop đặc hiệu của protein sau dịch mã thì dùng các chất ức chế proteaza và ức chế quá trình glycosyl hoá.

Việc xác định trình tự gen và việc dự đoán acid amin sẽ giúp hiểu được cấu trúc và chức năng của chúng.

Các loại protein virus

Protein virus được tổng hợp nhờ mRNA của virus trên ribosom của tế bào. Tùy theo thời điểm tổng hợp mà được chia thành protein sớm và protein muộn. Protein sớm do gen sớm mã hoá, thường là enzym (protein không cấu trúc) còn protein muộn do gen muộn mã hoá, thường là protein cấu trúc tạo nên vỏ capsid và vỏ ngoài.

- Protein không cấu trúc

Protein không cấu trúc có thể được gói vào trong virion, nhưng không phải là thành phần cấu tạo virion. Đây là các enzym tham gia vào quá trình nhân lên của virus, ví dụ enzym phiên mã ngược, proteaza và integraza của virus retro, timidinkinaza và ADN polymeraza của HSV.

Protein không cấu trúc khác chỉ có mặt trong tế bào nhiễm mà không được đưa vào virion, bao gồm các protein tham gia vào quá trình điều hoà sao chép, phiên mã, dịch mã (ví dụ Tat của HIV, Protein màng trong của HSV, helicaza, protein gắn ADN...); protein ức chế quá trình tổng hợp acid nucleic và protein của tế bào chủ. Ngoài ra thuộc loại này còn có các protein gây ung thư do các oncogen mã hóa; các protein gây chuyển dạng tế bào, như kháng nguyên T lớn của SV-40 hoặc protein EBNA của virus Epstein.Barr. ở một số virus có protein không cấu trúc liên quan đến hoạt tính anti-apoptosis và anti-cytokin...

-Protein cấu trúc

Protein cấu trúc tham gia vào cấu tạo hạt virus, làm cho chúng có hình dạng, kích thước nhất định và bảo vệ genom của virus khỏi các điều kiện bất lợi. Protein cấu trúc bao gồm protein của nucleocapsid, protein nền (matrix), protein vỏ ngoài (Hình 3). Protein nucleocapsid có thể tự lắp ráp (ví dụ ở TMV, polio) hay lắp ráp với sự trợ giúp của một

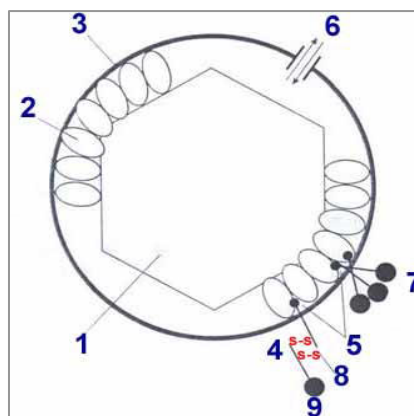
khung protein tạm thời, làm nhiệm vụ dàn giáo để tạo đầu phage hoặc cấu trúc khối đa diện, protein này chỉ tồn tại khi lắp ráp nucleocapsid và sẽ bị mất đi ở virus trưởng thành. Ví dụ capsid của virus polio có cấu tạo tương đối đơn giản, gồm 4 protein là VP1, VP2, VP3 và VP4. Các protein này tham gia lắp ráp tạo capsid thông qua một cấu trúc tiền chất (procapsid), bao gồm VPO (một protein tiền chất) và VP1, VP3. Protein VPO lại được cắt thành VP2 và VP4 khi vỏ capsid tiến hành lắp ráp với acid nucleic của nó. Capsid của virus reo phức tạp hơn nhiều. Đây là capsid trần có hai lớp vỏ. Protein capsid ngoài chức năng bảo vệ acid nucleic genom và lắp ráp để hình thành virion còn phải tương tác với acid nucleic genom trong suốt quá trình lắp ráp. Sự bao gói phân tử acid nucleic vào trong vùng xác định, cần phải có sự sắp xếp và nén genom lại và bảo hiệu sự kết hợp với protein capsid đã lựa chọn, thông qua liên kết hóa học. Ví dụ protein N của virus rhabdo và protein NP của virus cúm là các protein có acid amin mang điện tích dương sẽ tương tác với acid nucleic mang điện tích âm, nên chúng sẽ hút nhau, tạo thuận lợi cho việc lắp ráp. Việc bọc gói sẽ trở nên phức tạp hơn khi virus có genom nhiều đoạn, ví dụ ở virus cúm có 8 đoạn ARN cần phải bọc gói trong cùng một vỏ capsid.

Vỏ ngoài bao quanh nucleocapsid được hình thành từ màng nhân, màng sinh chất hoặc màng lưới nội chất khi virus nảy chồi. Phía trong của vỏ ngoài là protein glycolipid.

Protein nền là protein nằm phía trong, giữa vỏ capsid và vỏ ngoài, giữ mối liên kết giữa hai vỏ này. Chúng thường không được glycosyl hóa và có thể chứa các protein xuyên màng để làm neo, hoặc có thể liên kết với màng nhờ các vùng kỵ nước nằm trên bề mặt hoặc nhờ mối tương tác giữa protein của chúng với glycoprotein vỏ ngoài. ở HSV, khoảng không giữa vỏ ngoài và capsid là lớp vỏ định hình được xem như một lớp màng (tegument). Glycoprotein ngoài của virus được neo vào vỏ nhờ các protein xuyên màng. Phần lớn chúng nằm nhô ra phía ngoài vỏ với một cái đuôi ngắn ở phía trong. Nhiều glycoprotein là monome, chúng ghép lại với nhau tạo thành những chiếc gai có thể quan sát được dưới kính hiển vi điện tử. ở các virus có vỏ ngoài, các gai này có chức năng kháng nguyên, ví dụ gai G ở virus dại, gai gp 120 ở HIV và gai HA ở virus cúm.

Ở cả virus trần (ví dụ polio) và virus có vỏ ngoài các protein cấu trúc này sẽ tương tác với receptor trên bề mặt tế bào chủ để mở đầu cho quá trình gây nhiễm. Cơ thể chống trả lại thông qua đáp ứng miễn dịch. Dựa vào mối tương tác này để thiết kế vaccin chống virus.

- 1 : Nucleocapsid
- 2: Protein nền
- 3: Vỏ ngoài
- 4: Cầu disulfur
- 5: Đuôi trong gắn protein nền
- 6: Kênh vận chuyển
- 7: Glycoprotein (gai phụ)
- 8: Protein vận chuyển màng
- 9: Glycoprotein vỏ ngoài



Hình . Một số lớp protein liên kết với vỏ ngoài virus. Các protein nền nối vỏ ngoài với nucleocapsid. Glycoprotein do virus mã hóa được gắn sẵn vào vỏ ngoài để đảm nhiệm nhiều chức năng. Các gai glycoprotein chịu trách nhiệm nhận biết thụ thể bề mặt của tế bào và gắn vào đó trong khi các protein xuyên màng hoạt động như là những kênh vận chuyển qua vỏ ngoài. Các protein bắt nguồn từ tế bào chủ đôi khi cũng liên kết với vỏ ngoài nhưng với lượng nhỏ. (Cann.A, Principle of Molecular Virology, 1993, Academic press).

Tất cả các protein của virus đều được dịch mã từ mRNA của virus. Các mRNA này có thể

- a)- được phiên mã từ genom ADN của virus (ví dụ HSV), hoặc

b)- từ mạch bổ sung với genom ARN âm (ví dụ virus cúm) hoặc

c)-chính là genom của virus ARN dương (ví dụ virus bại liệt) Protein của virus có thể được xử lý sau dịch mã. Lúc đầu tổng hợp một protein lớn (polyprotein) sau đó nhờ proteaza phân cắt để tạo các phân tử nhỏ (ví dụ polyprotein của virus polio, phức hợp gag-polymeraza của virus HIV). Chúng có thể được phosphoryl hóa. Mức độ phosphoryl hóa thường xác định mức độ chức năng của protein (ví dụ protein N và NS của virus rhabdo). Sự gắn gốc đường vào protein (glycosyl hoá) là gắn cả với N và O. Đối với nhiều protein virus (thường là glycoprotein vô ngoài) gốc đường có thể chiếm 70% trọng lượng protein. Các biến đổi sau dịch mã khác như myristyl hóa, acyl hoá và palmitoyl hóa cũng được tiến hành.

ACID NUCLEIC CỦA VIRUS

Các loại genom của virus

Như trên đã nói, genom của virus rất đa dạng về cấu trúc, kích thước và thành phần nucleotid. Chúng có thể là ADN hoặc ARN, chuỗi đơn hoặc kép, thẳng hoặc khép vòng. Kích thước genom có thể từ 3500 nucleotid (ở phage nhỏ) đến 560.000 nucleotid (ở virus herpes). Các trình tự genom virus phải được đọc mã bởi tế bào chủ, cho nên các tín hiệu điều khiển phải được các yếu tố của tế bào chủ nhận biết. Các yếu tố này thường liên kết với protein virus. Do có kích thước nhỏ nên genom virus đã tiến hoá để sử dụng tối đa tiềm năng mã hóa của mình. Vì thế hiện tượng gen chồng lớp và hiện tượng cắt nối (splicing) mARN ở virus là rất phổ biến.

Genom của virus được xác định dựa theo các thông số sau:

- Thành phần acid nucleic (ADN hay ARN).
- Kích thước genom, chuỗi đơn hay kép.
- Cấu trúc đầu chuỗi
- Trình tự nucleotid
- Khả năng mã hoá
- Các yếu tố điều hoà, promoter, enhancer và terminator

Một số đặc điểm của genom virus cần lưu ý:

- Genom ADN kép (ví dụ ở virus pox, herpes và adeno) thường có kích thước lớn nhất.
- Genom ADN kép khép vòng (siêu xoắn hoặc không siêu xoắn) thường thấy ở phage
- Genom ADN kép ở virus vaccinia có hai đầu khép kín
- ADN đơn dạng thẳng (ví dụ virus parvo) có kích thước rất nhỏ.
- Các ADN dạng thẳng thường có trình tự lặp lại ở đầu.
- Tất cả genom ARN kép đều phân đoạn (chứa một số đoạn không giống nhau, mang thông tin di truyền tách biệt).
- Genom ARN đơn được phân thành ARN dương (genom +) và ARN âm (genom -) dựa vào trình tự nucleotid của mARN.
- Phần lớn genom ARN đơn đều không phân đoạn trừ virus orthomyxo (virus cúm).
- Virus retro có genom là hai phân tử ARN đơn giống nhau, nối với nhau ở đầu 5 nhờ cầu nối hydro.
- Virus đốm cây Alfalfa (AMV) có genom gồm 4 đoạn ARN đơn, dương, dạng thẳng, được gói vào 4 vỏ capsid khác nhau nên còn gọi là virus dị capsid (hetero-capsidic) để phân biệt với virus mà tất cả các đoạn đều được gói trong một hạt-virus đồng capsid (isocapsidic).

Genom ADN

- Các virus ADN có kích thước rất nhỏ (như ϕ x 174, M13 hay parvo) thường có genom là ADN chuỗi đơn. Một số là ADN đơn, dạng thẳng, song một số khác lại khép vòng.
- Hầu hết virus ADN sử dụng ADN kép làm vật liệu di truyền. Một số chứa genom ADN kép dạng thẳng nhưng số khác lại chứa ADN kép dạng vòng. Phage lamda chứa ADN kép dạng thẳng nhưng có hai đầu dính là đoạn đơn bổ sung dài 12 nucleotid nên có thể bắt cặp để khép vòng.
- Ngoài các nucleotid thông thường, ở nhiều virus còn có các base đặc biệt, ví dụ phage T chặn ký sinh ở E.coli mang 5 hydroxymethyl cytosin thay vì cytosin. Glucosea thường gắn vào nhóm hydroxymetyl.
- Ở virus ADN kép có kích thước lớn (ví dụ virus họ herpes) genom có cấu tạo khá phức tạp. Kích thước genom thay đổi, từ virus herpes simplex và varicella zoster (120-180kbp) đến virus cytomegalo và HHV-6 (180-230 kbp). ADN mã cho hơn 40 protein cấu trúc và hơn 40 protein không cấu trúc. Cấu trúc genom ít thay đổi giữa các thành viên trong họ nhưng chúng là nhóm duy nhất chứa các đồng phân (isomer) của cùng một phân tử ADN. Mỗi hạt chứa một đồng phân gồm hai đoạn nối với nhau bằng liên kết cộng hóa trị, đoạn dài duy nhất (UL) và đoạn ngắn duy nhất (US). Ở hai đầu mỗi đoạn lại có các đoạn ngắn lặp lại trái chiều. Các đoạn này khác nhau ở các hạt virus khác nhau, do đó làm cho genom thay đổi ít nhiều (lớn hoặc nhỏ hơn kích thước trung bình).
- Genom của virus adeno là dạng thẳng có kích thước 30 - 38 kbp nhỏ hơn genom của virus herpes. Mỗi virus chứa 30-40 gen. Genom có hai đầu lặp lại trái chiều dài 100-180 kbp. Đoạn 50 base đầu tiên khá giống nhau ở các virus khác nhau và thường chứa nhiều cặp A-T. Điểm nổi bật của đoạn đầu phân tử ADN ở virus adeno là khi genom tách khỏi virion một mạch sẽ tạo vòng "panhandle" và oligome. Điều này liên tưởng đến phage ϕ , nhưng khác ở chỗ ADN của adeno không có đầu đơn. Ở mỗi đầu 5 của genom có gắn một protein 55 kDa. Protein này đóng vai trò quan trọng trong sao chép.

Genom ARN

- Virus ARN thường có genom nhỏ hơn genom của virus ADN
- Các phân tử ARN được chia làm hai loại: ARN (+) và ARN (-) ;
- ARN (+) có trình tự nucleotid trùng với trình tự nucleotid của mRNA, nên có thể dùng thay cho mRNA trong quá trình dịch mã.
- ARN (-) có trình tự bổ sung với mRNA
- Cơ chế tổng hợp mRNA là đặc điểm quan trọng để phân biệt các virus ARN
- Hầu hết các phân tử mRNA ở eukaryota là đơn gen (monocistronic), chỉ mã hóa cho một protein, trong khi tất cả các virus ARN đã biết đều là đa gen (Polycistronic), mã hóa cho nhiều protein
- Genom ARN không dùng làm khuôn để trực tiếp tổng hợp ARN của virion mà phải qua mạch trung gian
- Đa số ARN (+) đều có mũ ở đầu 5 để bảo vệ khỏi tác động của phosphatase và nucleaza. ở virus picorna mũ được thay thế bởi protein VPg (protein gắn với genom).
- Đầu 3 của đa số genom ARN (+) được gắn đuôi poly (A) giống như mRNA của eukaryota
- Virus ARN (-) thường có genom lớn hơn virus ARN (+)
- Một số virus ARN có genom phân đoạn. Ví dụ virus cúm có 8 đoạn ARN (-), virus reo có 10-12 đoạn ARN kép. Các đoạn này không giống nhau và mã hóa cho các protein khác nhau, trong khi 2 phân tử ARN (+) ở virus retro thì giống hệt nhau.

TIỀN VIRUS (PROVIRUS)

Trong pha tiêu bào, sau khi nhiễm vào vi khuẩn, virus thường sao chép để tạo ra hàng triệu virus và sau đó phá hủy tế bào chủ. Tuy vậy, có những trường hợp bộ gen của virus hòa nhập vào nhiễm sắc thể của tế bào chủ vài lúc này chúng được gọi là tiền virus và được đi vào lộ trình sinh tan (lysogenic pathway). Khi hòa nhập bộ gen của virus chỉ được sao chép khi ADN của tế bào chủ sao chép. Do đó, mỗi tế bào con cũng nhận được một bản sao của bộ gen virus.

Dưới một số điều kiện nào đó, như tăng chiều xạ, tiền virus có thể tách ra từ bộ gen của tế bào chủ và bắt đầu sinh sản nhanh chóng. Sau đó chúng đi vào pha tiêu bào làm cho tế bào chủ vỡ ra. Lợi thế của virus là khi ở dạng tiền virus là chúng được sinh sản vô tận và không gây ra một triệu chứng nào để tế bào chủ có thể nhận ra và phản ứng lại.

Có ý kiến cho rằng virus là những gen di động có thể hòa nhập vào bộ gen của tế bào chủ và có thể tách ra khi có điều kiện thuận lợi. Khi tách ra từ nhiễm sắc thể của tế bào chủ nó có thể mang theo một số gen của tế bào chủ... Một số gen của virus gây bệnh ung thư đã được tìm thấy hòa nhập vào nhiễm sắc thể của người và những động vật có xương sống khác

PHÂN LOẠI VIRUS

Virus học đã có lịch sử trên 100 năm, tuy nhiên các nguyên tắc phân loại virus thì vẫn còn rất mới mẻ. Vào những năm đầu của thế kỷ trước các virus đầu tiên được phân loại chỉ bằng một cách đơn giản là cho chúng đi qua màng lọc vi khuẩn. Nhưng khi số lượng virus tăng lên thì lúc đó phải phân biệt chúng dựa vào kích thước, vào vật chủ và vào các triệu chứng bệnh do chúng gây ra. Ví dụ tất cả các virus động vật có khả năng gây viêm gan đều xếp thành một nhóm gọi là virus viêm gan hay tất cả các virus thực vật có khả năng gây đốm trên lá cây đều xếp vào một nhóm gọi là virus đốm. Về sau, vào những năm 30, nhờ sự bùng nổ về kỹ thuật, đã giúp người ta mô tả được các đặc điểm vật lý của nhiều loại virus, cung cấp nhiều đặc điểm mới để có thể phân biệt được các virus khác nhau. Các kỹ thuật này bao gồm phương pháp phân lập, tinh sạch virus, xác định đặc điểm hoá sinh của các virion, các phương pháp huyết thanh học và đặc biệt là sự ra đời của kính hiển vi điện tử đã giúp mô tả được hình thái của nhiều loại virus khác nhau. Đến những năm 50 dựa trên các đặc điểm này người ta đã phân biệt được ba nhóm virus quan trọng ở động vật là Myxovirus, Herpesvirus và Poxvirus.

Vào những năm 60, các kiến thức và dữ liệu về virus đã rất phong phú, đòi hỏi phải cho ra đời một tổ chức của các nhà virus học để thống nhất về hệ thống phân loại với các qui tắc chặt chẽ và cách đặt tên... Đó là Ủy ban quốc tế về phân loại virus, gọi tắt là ICTV (International Committee on Nomenclature of Viruses), được thành lập năm 1966. Chức năng của ICTV là thảo luận để đi đến thống nhất về các qui tắc phân loại, cách đặt tên, xây dựng thư mục và cung cấp thông tin cho các nhà virus học trên khắp thế giới. Các thông tin của ICTV có thể truy cập theo website <<http://www.ncbi.nlm.gov/ICTV/>>.

ICTV đưa ra các tên chuẩn phân loại dựa trên các đặc điểm hình thái, bao gồm kích thước, hình dạng, kiểu đối xứng của capsid, có hay không vỏ ngoài; các đặc điểm vật lý bao gồm cấu trúc genom, sự miễn cảm đối với các tác nhân lý, hoá; các đặc điểm của lipid, cacbohidrat, các protein cấu trúc và không cấu trúc; đặc trưng kháng nguyên và các đặc điểm sinh học khác như phương thức nhân lên, loại vật chủ, phương thức lây truyền và khả năng gây bệnh. Tuy nhiên người ta ước đoán rằng muốn xác định chính xác một loại virus mới cần phải có tới khoảng 500 đặc điểm. ICTV đang tạo dựng cơ sở dữ liệu (database) cho phép liệt kê các loại virus đến mức độ chủng.

Ủy ban cũng đã thống nhất đưa ra các khái niệm về các thứ bậc trong phân loại, bao gồm:

Bộ virus (order).

Bộ là đại diện cho các nhóm ghép của các họ, có các đặc điểm chung khác biệt với các bộ và họ khác. Các bộ được ký hiệu bởi những vĩ tố (suffixe) **-virales**. Có một bộ đã được ICTV chấp thuận là **Mononegavirales** bao gồm các họ Paramyxoviridae, Rhabdoviridae và Filoviridae. Đó là các virus ARN đơn, âm, không phân đoạn và có vỏ ngoài.

Họ virus (family).

Họ là đại diện cho các nhóm ghép của các chi, có các đặc điểm chung khác với các thành viên của các họ khác. Họ có vĩ tố **-viridae**, đóng vai trò trung tâm và thường có tiếp đầu ngữ mang đặc điểm đặc trưng. Ví dụ *Picornaviridae* là từ ghép pico/rna/viridae (pico tiếng Ý là nhỏ) gồm các virus có kích thước nhỏ; Flavoviridae - tiền Latinh flavo là vàng (vì trong đó có virus gây bệnh sốt vàng) ở một số họ (ví dụ Herpesviridae) có sự khác nhau giữa các thành viên trong họ, dẫn đến sự hình thành các họ phụ, được ký hiệu với vĩ tố **-virinae**. Như vậy họ *Herpesviridae* còn được phân tiếp thành các họ phụ *Alphaherpesvirinae*, (virus, Herpes simplex), *Betaherpesvirinae* (virus cytomegalo) và *Gammaherpesvirinae* (virus Epstein-Barr).

Chi virus.

Chi là đại diện cho các nhóm ghép của các loài, có các đặc điểm chung và khác với các thành viên của các chi khác. Tên chi thường có vĩ tố **-virus**. Cũng như tên họ, tên chi thường có tiếp đầu ngữ mang đặc điểm đặc trưng. Ví dụ Rhinovirus (Rhino tiếng Hy Lạp là mũi, ám chỉ virus gây bệnh sổ mũi. Các tiêu chuẩn để phân định các chi thay đổi giữa họ này với họ khác nhưng chúng vẫn bao gồm sự khác nhau về các đặc điểm di truyền, cấu trúc và các đặc điểm khác.

Loài virus.

Loài virus được định nghĩa như là một lớp phân loại dựa trên một số lượng lớn các đặc điểm lớp (polythetic class), tạo lập mối liên hệ với nhau về sao chép và chiếm một ổ sinh thái riêng biệt. ICTV hiện đang xem xét một cách cân trọng các đặc điểm thiết yếu cần phải có để xác định loài. Sự phân chia giữa loài và chủng vẫn còn là một vấn đề khó khăn.

Một số tính chất được ICTV sử dụng trong phân loại loài - Tính chất của virion

Đặc điểm hình thái.

- Kích thước virion
- Hình dạng virion
- Có hay không có peplome (lipoprotein vỏ ngoài) và bản chất của peplome
- Có hay không có vỏ ngoài (envelope)
- Kiểu đối xứng và cấu trúc của capsid

Tính chất hoá lý, vật lý.

- Khối lượng phân tử của virion (M₂).
- Mật độ nổi (buoyant density) của virion (trong CSCI, sacaroza vv□).
- Hệ số lắng của virion.
- Tính ổn định pH.
- Tính ổn định nhiệt.
- Tính ổn định với các cation (Mg²⁺, Mn²⁺).
- Tính ổn định với các dung môi.
- Tính ổn định với các chất tẩy rửa.
- Tính ổn định với chiếu xạ.

Genom

- Loại acid nucleic (ADN hay ARN).
- Kích thước genom, tính theo Kb hoặc Kbp.
- Acid nucleic sợi đơn (ss) hay sợi kép (ds).
- Chuỗi thẳng hay khép kín.
- Phân cực (nghĩa - dương, âm hay lưỡng cực).
- Số lượng và kích thước các đoạn (segment).
- Trình tự nucleotid.
- Có các trình tự lặp lại.
- Có các đồng phân.
- Tỷ lệ G+C.
- Có hay không mũ ở đầu 5.
- Có hay không protein liên kết ở đầu 5.
- Có hay không có đuôi poly (A) ở đầu 3.

Các protein.

- Số lượng, kích thước và hoạt động chức năng của các protein cấu trúc.
- Số lượng, kích thước và hoạt động chức năng của các protein không cấu trúc.
- Những chi tiết về hoạt động chức năng của các protein, đặc biệt là transcriptaza phiên mã ngược,
- emaglutinin, neuraminidaza và các protein dung hợp.
- Trình tự toàn phần hoặc từng phần acid amin của protein.
- Tính chất glycosyl hoá, phosphoryl hóa, myristyl hoá của protein.
- Lập bản đồ của quyết định kháng nguyên (epitop)

Các lipid

Hàm lượng, đặc điểm.

Hydrat cacbon

Hàm lượng, đặc điểm

Cấu trúc genom và phương thức sao chép.

- Cấu trúc genom.
- Phương thức sao chép.
- Số lượng và vị trí khung đọc.
- Đặc điểm phiên mã.
- Vị trí tích lũy các protein của virion.
- Vị trí lắp ráp virion.
- Vị trí và bản chất của sự hoàn thiện và giải phóng virion.

Tính chất của kháng nguyên

Sự giống nhau về typ huyết thanh, đặc biệt nhận được từ các trung tâm liên quan.

Các đặc điểm sinh học.

- Phạm vi vật chủ tự nhiên.
- Phương thức lây truyền trong tự nhiên.
- Mối quan hệ với vectơ truyền bệnh.
- Sự phân bố địa lý.
- Khả năng gây bệnh và bệnh liên quan.
- Tính hướng mô, bệnh lý học và bệnh lý học mô.

CHƯƠNG 4 – TRAO ĐỔI CHẤT CỦA VI SINH VẬT

1. Khái niệm

Trao đổi chất là tổng số các phản ứng hoá sinh phức tạp xảy ra bên trong các tế bào của một cơ thể. TĐC bao gồm hai quá trình: đồng hoá (tổng hợp các chất hữu cơ và sử dụng năng lượng) và dị hoá (phân giải các chất phức tạp thành các chất đơn giản hơn đồng thời giải phóng năng lượng).

Tế bào vi sinh vật không có cơ quan chuyên biệt để thu nhận thức ăn mà toàn bộ sự trao đổi chất của chúng được thực hiện bằng khuếch tán và hấp phụ qua toàn bộ bề mặt tế bào.

2. Quá trình đồng hoá (quá trình dinh dưỡng)

Quá trình dinh dưỡng của vi sinh vật gắn liền với đặc điểm tế bào của chúng. Trong tế bào vi sinh vật bao gồm các thành phần chính là nước, hydratcarbon, protein, lipid nên thành phần dinh dưỡng của chúng cũng cần hội đủ các nguyên tố C, H, O, N

2.1. Nước

Nước là một phần không thể thiếu đối với cơ thể vi sinh vật. Nước chiếm 80-90% trọng lượng tế bào VSV và thay đổi tùy theo trạng thái, tuổi của TB. Tất cả các phản ứng hoá học xảy ra trong tế bào đều cần sự có mặt của nước. Nước trong TB tồn tại ở dạng nước tự do và nước liên kết.

- Nước tự do chiếm phần lớn trong TB và có tác dụng hoà tan các chất vô cơ, hữu cơ. Sự mất nước tự do làm rối loạn và ức chế trao đổi chất của tế bào.
- Nước liên kết tuy chiếm một lượng nhỏ trong tế bào nhưng rất khó tách. Khi mất nước liên kết thì cấu trúc tế bào bị phá vỡ → tế bào chết.

Yêu cầu của vi sinh vật đối với nước được biểu thị định lượng bằng hoạt độ nước

$$a_w \equiv p/p_0$$

Trong đó: a_w : hoạt độ nước P: áp suất hơi của dung dịch P_0 : áp suất hơi của nước

Nước nguyên chất có $a_w = 1$, trị số này sẽ nhỏ đi khi hoà thêm các chất vào nước. Phần lớn các vi sinh vật thích $a_w = 0.99$ và hầu hết đều cần $a_w > 0.91$ để phát triển. Độ ẩm tương đối và hoạt lực nước cũng có mối quan hệ với nhau và được tính $RH = a_w \times 100$

Giới thiệu hoạt lực nước của một số dung dịch bão hoà ở 25°C

a_w	Dung dịch
0.11	Lithium chloride
0.22	Potassium acetate
0.43	Potassium carbonate
0.53	Magnesium nitrate
0.74	Sodium nitrate

a_w	Dung dịch
0.75	Sodium chloride
0.84	Potassium chloride
0.94	Potassium nitrate
0.97	Potassium sulfate

Hoạt độ nước cần thiết cho sự phát triển của vi sinh vật

a_w	Vi sinh vật phát triển với hoạt độ nước \geq hoạt độ nước dưới đây	Thực phẩm (ví dụ)
0.95	<i>Pseudomonas, Escherichia, Proteus, Shigella, Klebsiella, Bacillus, Clostridium perfringens</i> , một vài nấm men	Hầu hết các thực phẩm nấu chín (quả tươi hoặc đóng hộp, rau, thịt, cá) sữa, xúc xích chín, bánh mì, thực phẩm chứa $\geq 4\%$ saccharose hoặc 7% NaCl
0.91	<i>Salmonella, Vibrio parahaemolyticus, C. botulinum, Lactobacillus</i> , một vài nấm sợi	Fromage (Cheddar, Swiss, Provolone), thịt chế biến, nước quả, thực phẩm có nồng độ saccharose $\approx 55\%$ hoặc 12% NaCl
0.87	Đa số nấm men, <i>Candida, Torulopsis, Hansenula micrococcus</i>	Thịt lên men, bánh xốp, fromage khô, bơ thực vật, thực phẩm có nồng độ saccharose $\approx 65\%$ hoặc 15% NaCl
0.80	Hầu hết nấm mốc, hầu hết nấm men thuộc giống <i>Saccharomyces, Debaryomyces, Staphylococcus aureus</i>	Phần lớn nước quả cô đặc, sữa đặc, syrup, bột, bánh có hàm lượng đường cao, đậu hạt có độ ẩm $15-17\%$
0.75	Hầu hết vi khuẩn ưa mặn, <i>Mycotoxigenic aspergilli</i>	Mứt ươm, mứt cam, kem hoa quả, bánh hạnh nhân, kẹo dẻo
0.65	Nấm sợi <i>Xerophilic, Saccharomyces bisporus</i>	Bột yến mạch chứa 10% độ ẩm, các sản phẩm nấu đông, ri đường, lạc
0.60	Các nấm men chịu được áp suất thẩm thấu, một vài nấm mốc	Quả khô chứa $15-20\%$ độ ẩm, caramel, kẹo cứng, mật ong
0.50	Không có sự phát triển của vi sinh vật	Mỳ có độ ẩm 12% , gia vị với độ ẩm 10%
0.40		Bột trứng chứa 5% độ ẩm
0.30		Bánh quy, kẹo giòn, biscote chứa $3-5\%$ độ ẩm
0.03		Tất cả các loại sữa bột chứa $3-3\%$ độ ẩm, súp khô

2.2. Nguồn thức ăn C

Đây là nguồn thức ăn chính của vi sinh vật. Dựa vào khả năng hấp thu nguồn C, tất cả các vi sinh vật đều thuộc một trong bốn kiểu dinh dưỡng cơ bản sau và được thể hiện trong bảng dưới đây

Kiểu dinh dưỡng	Nguồn C chủ yếu	Nguồn NL	Ví dụ
Tự dưỡng quang năng	CO_2	Ánh sáng	Tảo, VK lam, VK lưu huỳnh màu tía, màu lục
Dị dưỡng quang năng	Chất hữu cơ	Ánh sáng	Vi khuẩn tía, VK lục không chứa lưu huỳnh
Tự dưỡng hóa năng	CO_2	Chất vô cơ (NH_4^+ , NO_2^- , H_2 , H_2S , Fe^{2+} ...)	VK nitrat hóa, VK oxy hóa lưu huỳnh, VK hydro...
Dị dưỡng hóa năng	Chất hữu cơ	Chất hữu cơ	VSV hoại sinh, ký sinh, lên men

2.3. Nguồn thức ăn N

Quan hệ của vi sinh vật với các nguồn N rất khác nhau, có loài sử dụng được N ở dạng đơn giản nhất là N_2 , có loại sử dụng được N ở dạng phức tạp nhất là protein. Dựa vào quan hệ của vi sinh vật với các nguồn N mà người ta chia chúng thành 2 nhóm:

Vi sinh vật tự dưỡng amin

Các vi sinh vật tổng hợp được protein từ những hợp chất vô cơ chứa N đơn giản nhất. Trong nhóm này được chia thành 2 loại:

- Vi khuẩn azot: đồng hoá được N tự do trong không khí như vi khuẩn nốt sần
- Vi khuẩn amin: sử dụng được các muối amoni như vi khuẩn cellulose, nấm mốc và một số nấm men

Vi sinh vật dị dưỡng amin

Sử dụng các aminoacid đã có sẵn. Trong nhóm này có thể chia thành:

- Vi sinh vật pepton: sử dụng N ở dạng pepton (chế phẩm thủy phân không triệt để của protein) hoặc aminoacid.
- Vi sinh vật ký sinh: Ký sinh ở động vật và thực vật thượng đẳng, hấp thu N ở dạng protein xác định của các sinh vật này.

2.4. Nguồn thức ăn khoáng

Khi sử dụng các môi trường tự nhiên để nuôi cấy vi sinh vật thường không cần thiết bổ sung các nguyên tố khoáng. Trong môi trường tổng hợp (hoá chất) cần phải bổ sung các nguyên tố khoáng cần thiết cho sự phát triển của vi sinh vật. Những nguyên tố khoáng được VSV đòi hỏi với liều lượng lớn gọi là các nguyên tố đa lượng, với liều lượng nhỏ là các nguyên tố vi lượng.

P. Chiếm tỉ lệ cao nhất trong số các nguyên tố khoáng ($\approx 50\%$), có mặt trong nhiều thành phần quan trọng của tế bào (phospholipid, phosphoprotein, ADP, ATP, NADP, flavin...). Bổ sung K_2HPO_4 và KH_2PO_4 không những cung cấp nguồn P cho VSV mà còn tạo ra tính đệm cho môi trường.

S. Có mặt trong một số aminoacid (xistein, methionin), một số vitamin (biotin, thiamin), ngoài ra nó còn đóng vai trò quan trọng trong quá trình oxy hoá khử.

Mg. Tham gia nhiều phản ứng enzym liên quan đến quá trình phosphoryl hoá. Mg^{2+} có tác dụng hoạt hoá nhiều enzym và làm liên kết các tiểu phần riboxom với nhau.

Ca. Cần thiết đối với việc hình thành các cấu trúc không gian ổn định của nhiều bào quan như riboxom, ti thể, nhân..., là cầu nối trung gian giữa nhiều thành phần quan trọng của tế bào sống. Sự tồn tại một cách dư thừa các nguyên tố khoáng là không cần thiết với cơ thể và có thể dẫn tới ảnh hưởng xấu. Việc thừa P có thể làm giảm hiệu suất tích lũy một số chất kháng sinh, thừa Fe làm cản trở quá trình tích lũy B2 và B12

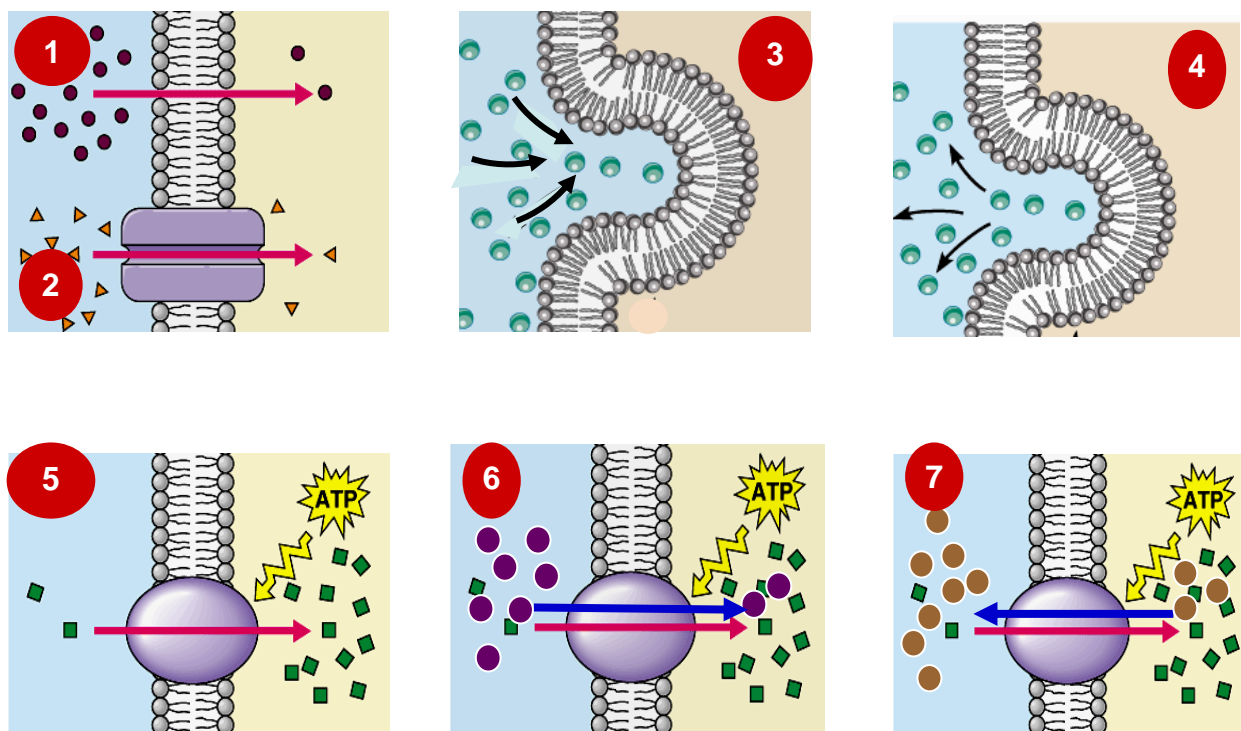
2.5. Nhu cầu về chất kích thích sinh trưởng

Về chất kích thích sinh trưởng thì cần hiểu rằng đây là một khái niệm rất linh động, nó chỉ có ý nghĩa là những chất hữu cơ cần thiết đối với hoạt động sống mà một loại vi sinh vật nào đó không tự tổng hợp được. Thông thường các chất được coi là chất sinh trưởng đối với một loại vi

sinh vật nào đó có thể thực trong các loại sau: gốc kiềm purin, pirimidin, các dẫn xuất của chúng, các acid béo, vitamin...

3. Cơ chế vận chuyển các chất dinh dưỡng vào tế bào vi sinh vật

Thức ăn được vận chuyển vào tế bào vi sinh vật theo các cơ chế: vận chuyển thụ động, vận chuyển thụ động và xuất, nhập bào



Hình: Các hình thức vận chuyển qua màng sinh chất

(1): Khuếch tán qua lớp kép phospholipid; (2): Khuếch tán qua kênh protein; (3): Nhập bào; (4): Xuất bào; (5, 6, 7): Vận chuyển chủ động: đơn cảng, đồng cảng, đối cảng.

Vận chuyển thụ động: Là sự vận chuyển các chất qua màng theo nguyên lý khuếch tán mà không tiêu tốn năng lượng. Các phân tử đi qua màng nhờ sự chênh lệch nồng độ hay chênh lệch điện thế (trong trường hợp các ion) ở hai phía của màng. Nhiều nghiên cứu khẳng định trừ nước ra, rất ít các hợp chất có thể qua màng bằng cơ chế này.

Vận chuyển chủ động là hình thức tế bào có thể chủ động vận chuyển các chất qua màng nhờ sự tiêu tốn năng lượng. Hình thức này để vận chuyển các chất tế bào cần, chất độc hại có kích thước lớn hơn lỗ màng. Những phân tử vận chuyển (protein thấm-permeaza) sắp xếp trong màng liên kết với các phân tử chất hoà tan rồi chuyển chúng vào bề mặt trong của màng, từ đây các phân tử chất hoà tan được chuyển vào trong tế bào chất. Một protein thấm có thể vận chuyển 1 chất (đơn cảng), 2 chất cùng chiều (đồng cảng) hay 2 chất ngược chiều (đối cảng).

Sự vận chuyển các chất nhờ permeaza có thể là thụ động (không cần năng lượng của tế bào) (chất hoà tan-permeaza được vận chuyển theo cả hai phía của màng nhờ sự chênh lệch nồng độ của một chất nào đó) hoặc chủ động (cần năng lượng của tế bào).

Xuất bào, nhập bào: Hình thức này đòi hỏi có sự biến đổi của màng và tiêu tốn năng lượng.

Đối với các phân tử lớn (thể rắn hoặc thể lỏng) không lọt qua lỗ màng thì tế bào sử dụng hình thức xuất nhập bào để chuyển tải chúng ra hoặc vào trong tế bào.

Trong hiện tượng **nhập bào**, các phân tử rắn hoặc lỏng khi tiếp xúc với màng sẽ làm màng biến đổi và tạo nên các bóng nhập bào bao lấy các phân tử đó. Các bóng này sẽ được tế bào tiêu hóa trong lysosome.

Trong hiện tượng **xuất bào**, tế bào bài xuất ra ngoài các chất hoặc các phân tử bằng cách tạo thành các bóng xuất bào, các bóng này liên kết với màng, màng sẽ biến đổi và bài xuất các chất hoặc phân tử đó ra ngoài.

4. Quá trình dị hoá (quá trình phân giải)

4.1. Khái niệm

Đó là sự oxy hoá những hợp chất hữu cơ phức tạp thành các chất đơn giản hơn ở bên trong và bên ngoài tế bào nhờ các enzym xúc tác, đồng thời giải phóng năng lượng (*bài đọc thêm*). Người ta đã lợi dụng các quá trình phân giải có lợi của vi sinh vật để phục vụ cho đời sống (muối dưa, muối cà, lên men rượu ...) hoặc tìm cách kìm hãm chúng nếu có hại (các vi sinh vật gây hư hỏng thực phẩm, các nấm sinh độc tố...)

Quá trình oxy hoá chất hữu cơ xảy ra trong điều kiện các chất hữu cơ vừa làm nhiệm vụ chất cho, vừa làm nhiệm vụ chất nhận điện tử thì gọi là **quá trình lên men**. Ngược lại, quá trình oxy hoá chất hữu cơ xảy ra trong điều kiện chất nhận điện tử cuối cùng là oxy phân tử thì được gọi là **quá trình hô hấp**.

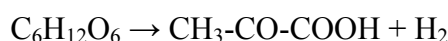
Phương trình chung của sự hô hấp

Nguyên liệu hô hấp + NAD → Nguyên liệu hô hấp đã bị oxy hoá + NADH₂

Chất nhận hydro + NADH₂ → chất nhận đã bị khử + NAD

Nguyên liệu hô hấp thích hợp nhất là glucid, lipid, rượu, các acid béo.

Như vậy trong quá trình oxy hoá, nguyên liệu hô hấp phải trải qua nhiều chặng. Hydro từ nguyên liệu hô hấp qua nhiều chất trung gian để chuyển tới chất nhận hydro. Chất trung gian quan trọng nhất của sự oxy hoá glucid là acid pyruvic



4.2. Các kiểu hô hấp của vi sinh vật

Trước khi tạo thành acid pyruvic thì sự lên men và hô hấp là hoàn toàn giống nhau. Sau đó, tùy theo đặc tính của cơ thể sống là hiếu khí hay kỵ khí mà sự chuyển hoá sẽ khác nhau vì VSV có thể sử dụng các chất nhận H₂ cuối cùng khác nhau. Dựa vào chất nhận H₂ cuối cùng (tức là quan hệ của vi sinh vật với nguồn oxy tự do) mà ta chia vi sinh vật thành 3 loại có tính chất hô hấp khác nhau.

Vi sinh vật hô hấp hiếu khí

Là vi sinh vật sử dụng oxy làm chất nhận hydro cuối cùng

- Nếu quá trình oxy hoá hoàn toàn, năng lượng được giải phóng hoàn toàn



- Nếu oxy hoá không hoàn toàn, năng lượng tự do còn tàng trữ trong các hợp chất trung gian



Trong thực tế, sử dụng tính chất oxy hoá không hoàn để sản xuất các acid hữu cơ

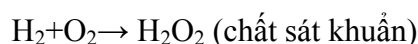
Vi sinh vật hô hấp kỵ khí

Là những vi sinh vật không có khả năng sử dụng O_2 phân tử làm chất nhận H_2 mà nó có khả năng sử dụng các sản phẩm trung gian trong quá trình phân giải các chất làm chất nhận

Quá trình lên men lactic, acid pyruvic là chất nhận H_2

Quá trình lên men rượu, CH_3CHO là chất nhận H_2

Sự có mặt của O_2 trong lên men yếm khí là chất độc đối với các vi sinh vật này



Tính chất hô hấp này được sử dụng để sản xuất các chế phẩm lên men

Vi sinh vật hô hấp tùy tiện

Chủ yếu là nấm men, một số là nấm mốc như *Mucor rouxii*, *Rhizopus*, một số vi khuẩn đường ruột (*E.coli*)

Hô hấp tùy tiện có nghĩa

Đối với nấm men

- + Trong điều kiện có oxy, nấm men sử dụng oxy làm chất nhận H_2 , sinh khối thu được nhiều (TB sinh trưởng nhanh, NL giải phóng nhiều) → ứng dụng cho SX sinh khối
- + Trong điều kiện không có oxy → lên men rượu

Đối với nấm mốc

- + Có oxy: hình thành acid hữu cơ
- + Không có oxy: hình thành rượu

5. Sự sử dụng năng lượng hô hấp của vi sinh vật

Năng lượng được phân giải trong quá trình hô hấp được sử dụng và các hoạt động có ích của vi sinh vật như tổng hợp tế bào, hấp thu thức ăn, sinh sản, di động... Năng lượng phục vụ cho hoạt động sống chỉ chiếm 1/3 năng lượng hô hấp còn lại thoát ra dưới dạng nhiệt năng hoặc quang năng. Chính vì vậy mà người ta có thể quan sát được các hiện tượng tăng nhiệt độ trong các nồi lên men, trong các đồng phân rác ủ. Ở một số VSV, năng lượng hô hấp được toả ra dưới dạng quang năng (1 số VSV ký sinh trên cá → ứng dụng đi tìm luồng cá)

BÀI ĐỌC THÊM CHƯƠNG TRAO ĐỔI CHẤT

1. Sự phân giải hydrat C

Glucose và các loại đường khác trong tự nhiên thường tồn tại dưới dạng các chất trùng hợp. Dưới dạng các đơn phân tử, chúng là những chất dinh dưỡng chủ yếu đối với đa số vi sinh vật dị dưỡng.

Có nhiều con đường phân giải glucose dẫn đến các hợp chất 3C, trong đó acid pyruvic là chất trung gian quan trọng nhất của quá trình trao đổi chất. 3 con đường thường gặp đó là:

- Con đường đường phân hay con đường EMP (Embden-Meyerhof-Parnas), là con đường phổ biến nhất.
- Con đường pentozophosphat hay con đường hexomonophosphat: thấy được ở nhiều cơ thể vi sinh vật, diễn ra theo một chu trình mà trật tự phản ứng theo chiều nghịch, bao gồm các phản ứng chủ yếu đối với sự tái sinh chất nhận CO_2 của quá trình cố định CO_2 .
- Con đường Entner-Doudoroff hay con đường KDPG vì sản phẩm trung gian điển hình của nó là acid 2-keto-3-desoxy-6-phosphogluconic.

Ngoài ra cũng còn những cơ thể phân giải khác, song chúng chỉ mang ý nghĩa cá biệt.

1.1. Đường phân

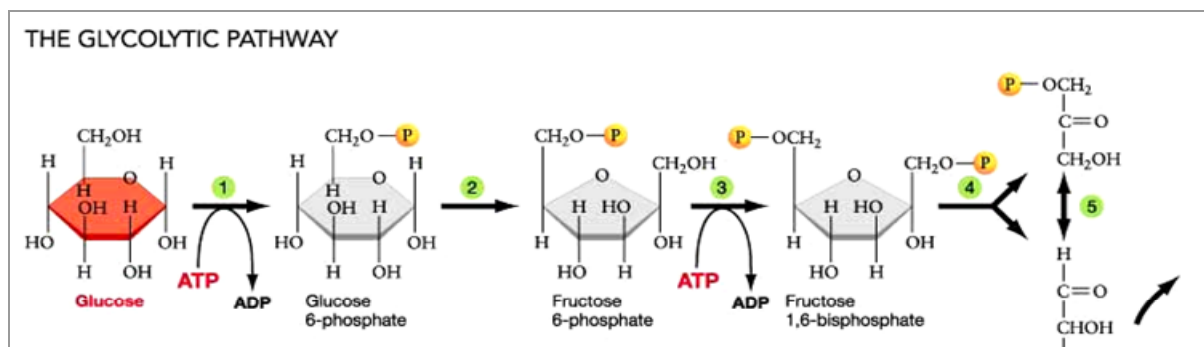
Đường phân là giai đoạn đầu tiên của quá trình phân giải glucose xảy ra không cần sự hiện diện của O_2 . Đường phân xảy ra trong dịch tế bào chất của tất cả tế bào sống, và là chuỗi phản ứng đã xảy ra ở những sinh vật đầu tiên khi mà trái đất còn chưa có O_2 .

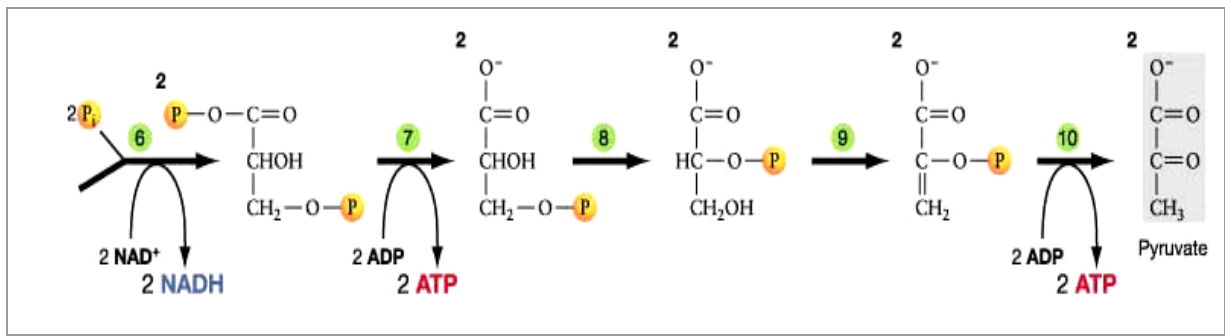
Đường phân gồm có 10 bước và chia thành 3 giai đoạn, mỗi bước được xúc tác bởi một enzym riêng biệt. 3 giai đoạn đó là: (hình)

- Giai đoạn đầu tư năng lượng (bước 1-3)
- Giai đoạn phân giải (bước 4-5)
- Giai đoạn bảo tồn năng lượng (bước 6-10)

(i, ii) Glucose là một hợp chất bền vững, ít có xu hướng phân cắt ra thành những chất đơn giản hơn, do đó tế bào muốn lấy năng lượng từ glucose trước tiên phải đầu tư năng lượng để hoạt hóa phân tử. Do đó, giai đoạn đầu của đường phân là cung cấp ATP cho phân tử glucose (hình). Trong các phản ứng chuẩn bị hai phân tử ATP gắn gốc phosphat cuối cùng của nó vào phân tử glucose. Đến giai đoạn này quá trình đường phân đã **sử dụng 2 phân tử ATP**.

(iii) Phản ứng kế tiếp, hơi phức tạp hơn, bắt đầu để dẫn đến sự thành lập ATP mới, thật sự là hai phản ứng. Phản ứng đầu là một phản ứng oxy hóa khử, trong trường hợp này sản phẩm trung gian là NADH thay vì là NADPH. Phản ứng thứ hai là sự phosphoryl hóa PGAL (phosphoglyceraldehyd). Ở giai đoạn này, tế bào **thu lại được 2 phân tử ATP** đã dùng cho sự phosphoryl hóa glucose trong lúc bắt đầu đường phân. Năng lượng đầu tư ban đầu đã được trả lại. Sau phản ứng sắp xếp lại trong bước (9) gốc phosphat được chuyển vào ADP theo sự phosphoryl hóa ở mức cơ chất để thành lập ATP, kết quả tạo ra hai phân tử ATP và hai phân tử acid pyruvic





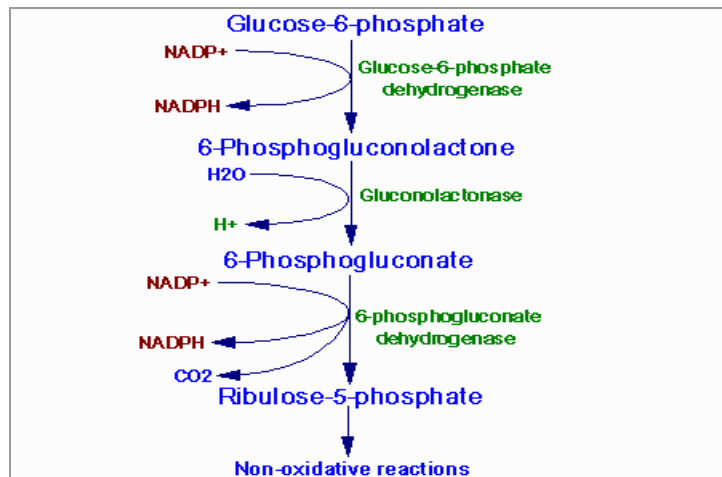
Hình: Sơ đồ chu trình đường phân



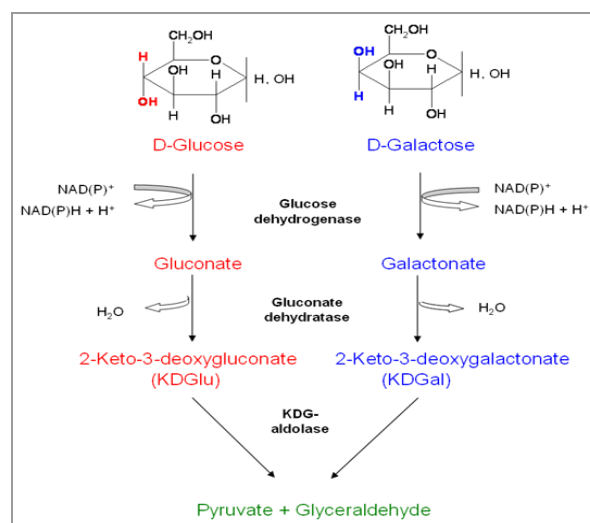
1.2. Chu trình pentozophosphat và Entner Doudoroff:

Là những phương thức phân giải glucose khác thu ít phân tử ATP hơn so với đường phân, tuy nhiên chúng sinh ra các tiền chất trao đổi không được sinh ra trong đường phân.

Phương trình của chu trình pentozophosphat (hexomonophosphat):

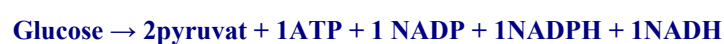


Hình: Sơ đồ chu trình pentozophosphat



Hình: Sơ đồ chu trình Entner Doudoroff

Phương trình của chu trình Entner Doudoroff:

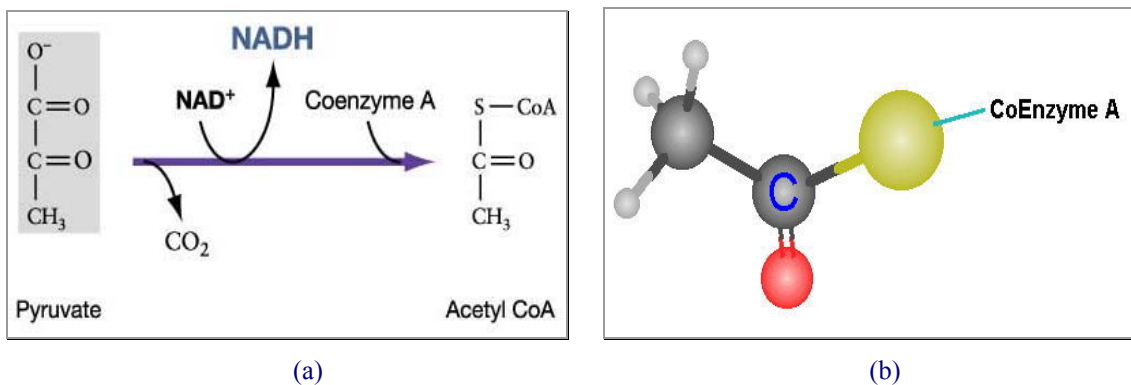


1.3. Hô hấp tế bào và lên men

Sau khi glucose đã được oxy hoá theo con đường đường phân hoặc một trong các con đường trao đổi chất trung gian, tế bào sẽ sử dụng các phân tử acid pyruvic sinh ra để hoàn thiện hô hấp tế bào hoặc lên men.

Hô hấp tế bào: là một quá trình trao đổi chất liên quan đến sự oxy hoá hoàn toàn các phân tử cơ chất và sau đó là sự sản sinh ATP nhờ một loạt phản ứng oxy hoá khử. 3 giai đoạn của sự hô hấp tế bào là: (i) sự tổng hợp Acetyl-CoA, (ii) chu trình Krebs, (iii) một loạt các phản ứng oxy hoá khử cuối cùng, tập hợp lại tạo nên một chuỗi vận chuyển điện tử.

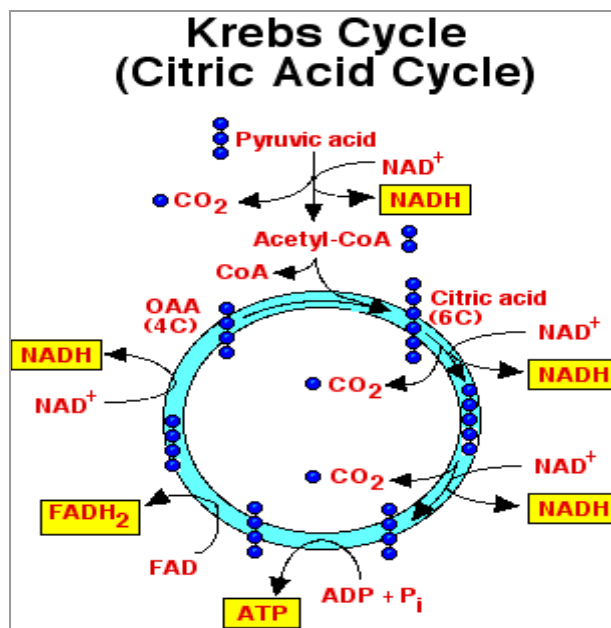
Sự tổng hợp Acetyl-CoA: 2 nguyên tử C từ acid pyruvic sẽ liên kết với coenzyme A để tạo thành Acetyl-CoA, chất này sau đó sẽ đi vào chu trình Krebs. Một loạt gồm 8 bước được xúc tác bởi enzym để chuyển năng lượng từ Acetyl-CoA tới các coenzym NAD^+ và FAD.



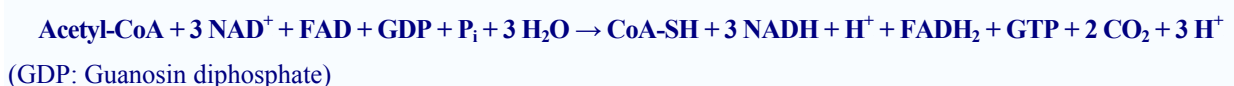
Hình: Sơ đồ tổng hợp Acetyl-CoA (a), phân tử Acetyl-CoA (b)

Chu trình Krebs (chu trình acid citric, chu trình tricarboxylic)

Acetyl-CoA được hình thành đi vào một chuỗi phản ứng của một chu trình gọi là chu trình Krebs hay chu trình acid citric. Mỗi phân tử acetyl-CoA được tạo ra từ phân tử glucose ban đầu kết hợp với một hợp chất 4C (acid oxaloacetic) đã hiện diện trong tế bào để tạo ra một hợp chất 6C mới là acid citric. Vì mỗi phân tử glucose tạo ra hai phân tử acetyl CoA nên có hai vòng acid citric xảy ra.



Phương trình phản ứng



Lên men

Là sự phân giải hydratcarbon trong điều kiện kỵ khí. Là quá trình oxy hoá khử cơ kết quả là một phần cơ chất bị khử còn một phần khác bị oxy hoá. Oxy phân tử không tham gia vào quá trình oxy hoá này mà sở dĩ có hiện tượng oxy hoá chỉ là do tách hydro ra khỏi cơ chất.

Các sản phẩm cuối cùng của lên men bao gồm acid, rượu, aldehyd, các loại khí.

Sau khi đã hoàn thành giai đoạn đường phân, tùy theo đặc tính của vi sinh vật là hiếu khí hay kỵ khí mà sự chuyển hoá sẽ khác nhau vì vi sinh vật có thể sử dụng các chất nhận hydro cuối cùng khác nhau. Tùy theo chất nhận hydro cuối cùng (tức là quan hệ của vi sinh vật với nguồn oxy tự do mà người ta chia chúng thành 3 loại có tính chất hô hấp khác nhau

- *Vi sinh vật hô hấp hiếu khí*: vi sinh vật sử dụng oxy phân tử làm chất nhận hydro cuối cùng. Nếu quá trình oxy hoá hoàn toàn, năng lượng được giải phóng hoàn toàn; nếu oxy hoá không hoàn toàn, năng lượng được tồn trữ dưới các hợp chất trung gian

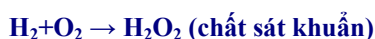


Trong thực tế, sử dụng tính chất hô hấp không hoàn toàn để sản xuất các acid hữu cơ.

- *Vi sinh vật hô hấp kỵ khí*: là vi sinh vật không có khả năng sử dụng oxy phân tử làm chất nhận H₂ mà nó có khả năng sử dụng các sản phẩm trung gian trong quá trình phân giải các chất làm chất nhận

Ex: Quá trình lên men lactic, acid pyruvic là chất nhận H₂, trong lên men rượu, CH₃CHO là chất nhận H₂.

Sự có mặt của oxy là chất độc đối với các loại vi sinh vật hô hấp kỵ khí



Tính chất hô hấp này được sử dụng để sản xuất các chế phẩm lên men.

- *Vi sinh vật hô hấp tùy tiện*: chủ yếu là nấm men, một số nấm mốc như Mucor rouxii, Rhizopus, một số vi khuẩn đường ruột (E.coli)

Ex: Nấm men trong điều kiện có oxy, sử dụng O₂ làm chất nhận H₂, sinh khối thu được nhiều (tế bào sinh trưởng nhanh, năng lượng giải phóng nhiều), ứng dụng trong sản xuất sinh khối. Trong điều kiện không có oxy, lên men rượu.

Nấm mốc, có O₂, sản xuất acid hữu cơ; không có O₂: sản xuất rượu

CHƯƠNG 5 – SINH TRƯỞNG-PHÁT TRIỂN Ở VI SINH VẬT VÀ CÁC YẾU TỐ ẢNH HƯỞNG

1. Khái niệm

Cũng như các sinh vật khác, sinh trưởng và phát triển là một thuộc tính cơ sở của vi sinh vật.

Sinh trưởng là sự tăng về kích thước và khối lượng tế bào.

Phát triển là sự tăng về số lượng tế bào (sinh sản).

Chương này chỉ đề cập đến sự sinh trưởng và phát triển của vi khuẩn vì vi khuẩn đã được nghiên cứu rất kỹ và có thể khái quát hoá dưới dạng toán học.

Do kích thước của tế bào nhỏ nên khi nghiên cứu sinh trưởng, phát triển của vi sinh vật, người ta theo dõi sự thay đổi của cả quần thể.

2. Các thông số và hằng số dùng để xác định số lượng vi sinh vật

Trong môi trường dinh dưỡng thích hợp vi khuẩn sẽ sinh trưởng nhanh và bước vào quá trình phân chia.

- Từ N_0 tế bào, sau n lần phân chia, ta sẽ có tổng số tế bào $N = N_0 \cdot 2^n$ (1)

- Vi khuẩn phân chia n lần sau khoảng thời gian t thì khoảng thời gian giữa hai lần phân chia liên tiếp gọi là thời gian thế hệ (g) $g = t/n$

- Giá trị nghịch đảo của thời gian thế hệ hay là số lần phân chia sau đơn vị thời gian gọi là hằng số tốc độ phân chia (c) $c = 1/g = n/t$

- Như vậy, thời gian thế hệ càng ngắn, VK sinh trưởng và sinh sản càng nhanh vì $c = n/t$ nên $n = c \cdot t$

- Thay giá trị của n vào phương trình 1 ta có : $N = N_0 \cdot 2^{c \cdot t}$

Hằng số tốc độ phân chia c phụ thuộc vào một số điều kiện như : loài vi khuẩn, nhiệt độ nuôi cấy, môi trường nuôi cấy.

Thời gian thế hệ của VK *E. coli* trong điều kiện thích hợp là 20 phút, nấm men dài hơn, với *Saccharomyces cerevisiae* là 2h. Tảo tiểu cầu *Chlorella* là 7h, với VK lam *Nostoc* là 23 h.

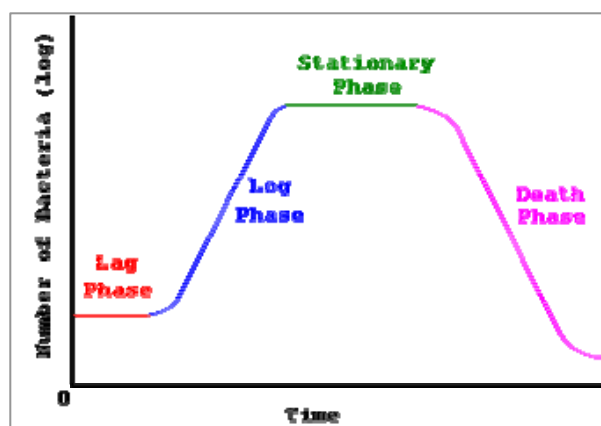
3. Sinh trưởng và phát triển của VSV trong các điều kiện nuôi cấy khác nhau

Vi sinh vật có thể phát triển trong môi trường tĩnh hoặc môi trường liên tục.

3.1. Nuôi cấy tĩnh

Phương pháp nuôi cấy mà trong suốt thời gian đó người ta không thêm vào chất dinh dưỡng, cũng không loại bỏ các sản phẩm trao đổi chất thì gọi là nuôi cấy tĩnh.

Quần thể vi sinh vật trong môi trường nuôi cấy tĩnh (tính theo hàm log) được thể hiện qua 4 pha: Pha lag (pha mở đầu, pha tiềm sinh), pha log (pha lũy thừa), pha ổn định, pha tử vong.



Pha lag : được tính từ lúc bắt đầu cấy tới khi vi khuẩn đạt tốc độ sinh trưởng cực đại. Trong pha lag, tế bào chưa phân chia nhưng trọng lượng tế bào tăng lên nhiều nhờ sự tổng hợp các chất cao phân tử (protein, acid nucleic).

Độ dài pha lag phụ thuộc vào tuổi của ống giống và thành phần môi trường. Tế bào càng già thì pha lag diễn ra càng dài. Trong pha lag diễn ra việc xây dựng lại các tế bào nghỉ thành các tế bào sinh trưởng. Tìm hiểu độ dài thời gian pha lag là cần thiết trong việc phán đoán đặc tính của vi khuẩn và tính chất của môi trường.

Pha log : Trong pha này, vi khuẩn phát triển theo lũy thừa. Tế bào ở trạng thái động học và coi như là những tế bào tiêu chuẩn. 3 thông số quan trọng của pha log là thời gian thế hệ g (thời gian nhân đôi), hằng số tốc độ phân chia c và hằng số tốc độ sinh trưởng μ . Các thông số này thay đổi theo các yếu tố môi trường và điều kiện nuôi cấy.

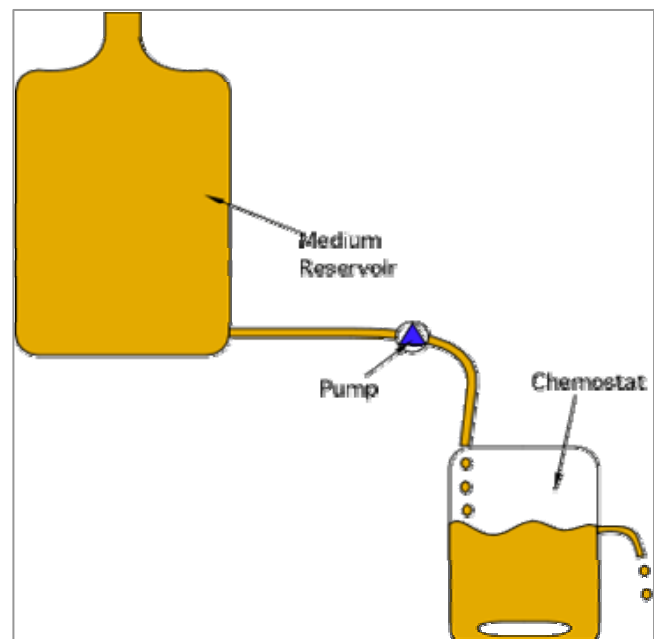
Pha ổn định : trong pha này, quần thể vi khuẩn ở trạng thái cân bằng động học, số tế bào mới sinh ra bằng số tế bào cũ chết đi. Nguyên nhân của pha ổn định là sự tích lũy các sản phẩm trao đổi chất có hại cho vi sinh vật như acid hữu cơ, rượu và việc cạn kiệt các chất dinh dưỡng.

Pha tử vong : trong pha này, số lượng tế bào có khả năng sống giảm mạnh (mặc dù tế bào tổng số có thể không giảm). Nguyên nhân của pha tử vong là cạn kiệt dinh dưỡng, tích lũy các chất có hại, hoặc một số tế bào sinh ra các enzyme tự phân.

Tốc độ tử vong của tế bào có liên quan trực tiếp đến ngành vi sinh vật học, đó là vấn đề bảo quản các vi sinh vật quan trọng và cần nghiên cứu (*bài đọc thêm các phương pháp bảo quản giống vi sinh vật*).

3.2. Nuôi cấy liên tục

Trong nuôi cấy tĩnh, không có bổ sung chất dinh dưỡng cũng như không có sự loại bỏ các sản phẩm trao đổi chất và sinh khối của tế bào dư thừa. Do đó pha lũy thừa chỉ kéo dài qua vài thế hệ. Vì vậy để thu nhận được nhiều sinh khối hoặc sản phẩm của vi sinh vật, trong công nghiệp người ta sử dụng phương pháp nuôi cấy liên tục, trong đó các điều kiện môi trường duy trì ổn định nhờ việc bổ sung thường xuyên chất dinh dưỡng và loại bỏ không ngừng các chất thải. Trong



một hệ thống mở như vậy, quần thể vi sinh vật có thể sinh trưởng ở pha lũy thừa trong thời gian dài, mật độ vi sinh vật tương đối ổn định. Nuôi cấy liên tục được sử dụng để thu nhận sinh khối vi sinh vật, emzym, vitamin, cồn...

4. Các yếu tố ảnh hưởng đến hoạt động sống của vi sinh vật

Mọi hoạt động sống của vi sinh vật đều phụ thuộc vào sự tác động, chi phối của các điều kiện sống xung quanh, ngược lại, bản thân vi sinh vật cũng có tác dụng làm biến đổi điều kiện của môi trường sống

Điều kiện ngoại cảnh ảnh hưởng đến vi sinh vật được chia làm 3 loại :

- Các yếu tố vật lý
- Các yếu tố hóa học
- Các yếu tố sinh học

Về tác động của từng yếu tố lên vi sinh vật lại chia làm 3 giới hạn :

- Điểm cực đại : giới hạn trên cùng mà vi sinh vật có khả năng thể hiện sự sống
- Điểm tối thích : điểm vi sinh vật hoạt động mạnh nhất
- Điểm cực tiểu : giới hạn dưới, điểm bắt đầu các hoạt động sống

Nghiên cứu ảnh hưởng của các điều kiện ngoại cảnh lên sự phát triển của vi sinh vật giúp chúng ta xác định hoạt động của loài này hay ức chế sự hoạt động của loài khác.

Ví dụ : Trong sản xuất sữa chua, tạo điều kiện thuận lợi cho vi khuẩn lactic phát triển, acid lactic sinh ra ức chế sự hoạt động của vi khuẩn butyric.

4.1. Ảnh hưởng của các yếu tố vật lý :

Bao gồm độ ẩm, nồng độ các chất hòa tan, nhiệt độ, tác dụng của ánh sáng và các tia năng lượng, tác dụng của áp lực, siêu âm, âm thanh...

4.1.1. Độ ẩm của môi trường

Tế bào vi sinh vật có 75-90% là nước nên hầu hết các hoạt động sống đều liên quan đến nước. Đa số vi sinh vật đòi hỏi độ ẩm môi trường cao.

Khi thiếu nước dẫn đến hiện tượng rối loạn trao đổi chất của vi sinh vật

Mỗi loại vi sinh vật, mỗi giai đoạn sinh lý có khả năng chịu được các mức độ ẩm khác nhau

Ví dụ : Vi khuẩn chịu khô hạn kém nấm, bào tử chịu khô hạn tốt hơn tế bào sinh dưỡng

Ứng dụng : Dựa vào đặc điểm vi sinh vật khó chịu được lâu trong điều kiện khô hạn để áp dụng bảo quản khô thực phẩm (sấy khô, phơi khô), đưa thực phẩm về đến độ khô an toàn (độ ẩm tối thiểu)

4.1.2. Nồng độ các chất hòa tan (áp suất thẩm thấu)

Trong tự nhiên, vi sinh vật thường sống trong những dung dịch có nồng độ chất hòa tan khác nhau, do đó có áp suất thẩm thấu khác nhau.

Sự nâng cao nồng độ dung dịch sẽ tạo nên xung quanh tế bào một sự khô cạn sinh lý → hiện tượng co nguyên sinh → trao đổi chất bị rối loạn → tế bào chết dần.

Tuy nhiên ở một số loại vi sinh vật, tế bào có khả năng thích ứng với sự thay đổi nồng độ các chất hòa tan của môi trường, đó là do trong dịch bào vi sinh vật có tích lũy các muối khoáng và các chất

hòa tan điều hòa áp suất thẩm thấu ở trong và ngoài tế bào. Đây là sự tự điều chỉnh áp suất ở VSV.

Ứng dụng : Muối thịt, muối cá, ngâm xiro. Thường hay sử dụng đường và muối vì hai loại này có khả năng tạo dung dịch có áp suất thẩm thấu lớn.

4.1.3. Nhiệt độ

Vi sinh vật có các phản ứng khác nhau về nhiệt độ khác nhau. Căn cứ vào quan hệ của vi sinh vật với nhiệt độ mà người ta chia vi sinh vật thành 3 nhóm chính : vi sinh vật ưa lạnh, vi sinh vật ưa ấm vi sinh vật ưa nhiệt và vi sinh vật ưa siêu nhiệt

Nhóm vi sinh vật	Nhiệt độ cực tiểu ($^{\circ}\text{C}$)	Nhiệt độ tối ưu ($^{\circ}\text{C}$)	Nhiệt độ cực đại ($^{\circ}\text{C}$)
VSV ưa lạnh	0	5-10	20-30
VSV ưa ấm	5	25-37	45-50
VSV ưa nhiệt	30	50-60	70
VSV ưa siêu nhiệt	75	85-100	110

Nhiệt độ quá giới hạn nhiệt độ cực đại sẽ có tác dụng tiêu diệt vi sinh vật vì làm mất hoạt tính enzym Khả năng chịu nhiệt độ cao của các vi sinh vật khác nhau là khác nhau và phụ thuộc vào trạng thái sinh lý của tế bào

Ví dụ: vi khuẩn bị tiêu diệt sau 30 phút ở $60-70^{\circ}\text{C}$; Nấm bị tiêu diệt sau 5-10 phút ở $50-60^{\circ}\text{C}$; Bào tử bị tiêu diệt sau 1-1.5h ở $150-160^{\circ}\text{C}$

Căn cứ vào ảnh hưởng của nhiệt độ với vi sinh vật, người ta đề ra các biện pháp diệt trùng bằng nhiệt độ cao và nhiệt độ thấp.

(i) Diệt trùng bằng nhiệt độ cao có hai hình thức chính: bằng sức nóng ướt và sức nóng khô

Diệt trùng bằng sức nóng ướt

Thanh trùng (Pasteurisation): Nâng nhiệt độ lên $60-80^{\circ}\text{C}$, sau đó làm nguội nhanh. Thời gian thanh trùng phụ thuộc vào nhiệt độ, loại sản phẩm, dung tích sản phẩm mà có thể kéo dài từ 10-30 phút. Tuy nhiên cũng có thể tiến hành đun sôi trong vài giây. Đun nóng nhanh rồi làm lạnh đột ngột cũng góp phần làm vi sinh vật chết.

Mục tiêu của thanh trùng là tiêu diệt tế bào sinh dưỡng. Sử dụng phương pháp này để thanh trùng các loại đồ hộp rau quả, nước giải khát...

Ưu điểm: Tiến hành nhanh, ít làm biến tính sản phẩm, không làm giảm giá trị sản phẩm

Nhược điểm: Không diệt trùng được triệt để, bao giờ cũng còn bào tử

Thời gian thanh trùng phụ thuộc:

- Số lượng vi sinh vật và bào tử
- Nhiệt độ tác động
- Dung tích sản phẩm
- Thành phần hóa học của sản phẩm (đồ hộp chứa các chất mặn, chua thì thời gian thanh trùng ngắn; đồ hộp chứa chất nhiều dầu, đạm, thời gian thanh trùng dài)

Chế độ thanh trùng có thể được biểu diễn như sau: $\frac{A - B - C}{t}$

Trong đó: A: thời gian nâng nhiệt; B: thời gian giữ nhiệt; C: thời gian hạ nhiệt; t: nhiệt độ tác động
(*Bài đọc thêm: cơ sở của quá trình thanh trùng đồ hộp*)

Tiệt trùng (Sterilisation): diệt trùng ở nhiệt độ từ 100-140°C trong khoảng 15-40 phút

Mục đích là tiêu diệt tế bào sinh dưỡng và bào tử của nó

Ưu điểm: diệt trùng triệt để, được ứng dụng để diệt trùng các loại đồ hộp thịt, cá. Được sử dụng trong phòng thí nghiệm vi sinh để khử trùng môi trường nuôi cấy.

Nhược điểm: dễ làm biến tính sản phẩm.

Phương pháp thanh trùng gián đoạn

Thanh trùng bằng hơi nước ở nhiệt độ 100°C trong 30 phút, làm trong ba ngày, mỗi ngày một lần. Sau mỗi lần thanh trùng, sản phẩm được đặt vào trong tủ ẩm có nhiệt độ thích hợp cho bào tử nảy mầm.

Ưu điểm: Diệt trùng được triệt để

Nhược điểm: Tốn thời gian

Phương pháp này được sử dụng để thanh trùng đối với các thực phẩm dễ bị hỏng khi tác động ở nhiệt độ cao.

Diệt trùng bằng sức nóng khô

Phương pháp này được sử dụng để diệt trùng các đồ dùng kim loại, thủy tinh và các dụng cụ chịu nhiệt khác (sấy).

Có thể đốt nóng trực tiếp trên ngọn lửa để sát trùng các dụng cụ kim loại có kích thước nhỏ (que cấy...)

(ii) Diệt trùng bằng nhiệt độ thấp

Nhiệt độ thấp ít có khả năng tiêu diệt vi sinh vật mà chủ yếu chỉ là đình chỉ các hoạt động trao đổi chất của chúng. Phương pháp này được sử dụng để bảo quản lạnh và bảo quản lạnh đông.

Bảo quản lạnh: Giữ sản phẩm từ 0-6°C, hình thức này có thời gian bảo quản ngắn

Bảo quản lạnh đông: gồm có đông thường (0-(-18°C)) và đông sâu (<-18°C). Phương pháp này thường để bảo quản các hải sản đánh bắt → sản phẩm bị đóng băng → thời gian bảo quản dài

Nhược điểm: Dễ gây các biến đổi cơ học, hóa lý trong sản phẩm. Khi bị tan băng, thực phẩm chảy nước có chứa nhiều các chất dinh dưỡng, dễ bị hư hỏng bởi vi sinh vật. Chính vì vậy thực phẩm khi làm tan băng phải được sử dụng ngay.

4.1.4. Tia năng lượng:

Bao gồm ánh sáng thường, tia tử ngoại, tia rơnghen (X), tia phóng xạ (α , β , γ), sóng vô tuyến, siêu âm.

Tia năng lượng có hai tác dụng với vi sinh vật

Tác dụng trực tiếp

- Với hàm lượng nhỏ → có tác dụng xúc tác, kích thích sự phát triển của tế bào thông qua sự hoạt hóa một số enzym hoặc một số đoạn AND nào đó → hình thành nên một số đặc

tính vi sinh vật, tạo nên những đặc tính cần thiết cho con người, được sử dụng trong di truyền, biến dị.

- Với hàm lượng lớn: gây nên những biến đổi thuận nghịch trong tế bào, làm đông tụ protein, phân hủy enzym, ion hóa một số chất → làm chết tế bào.

Tác dụng gián tiếp: gây nên một số biến đổi hóa lý nhất định trong môi trường và thông qua các điều kiện sống gây tác động cho tế bào

Vi dụ: Sóng có bước sóng ngắn → có tác dụng đâm xuyên → gây nên hiệu ứng nhiệt của môi trường → môi trường nóng lên nhanh → vi sinh vật chết.

Ứng dụng: thanh trùng thực phẩm, mứt nghiền, nước quả (chỉ dùng thanh trùng được các sản phẩm trong bình chứa thủy tinh).

4.2. Ảnh hưởng của các yếu tố hóa học

4.2.1. pH

Mỗi loại vi sinh vật thích hợp với một giới hạn pH nhất định (VK: 6.5-8; nấm 3-5)

Ảnh hưởng trực tiếp: pH ảnh hưởng đến hoạt độ enzym, khi pH thay đổi → tính chất TĐC cũng thay đổi

Đối với nấm men pH = 4-5: lên men rượu; pH = 8-10: tạo thành glycerin

Ảnh hưởng gián tiếp: pH làm thay đổi điện tích mặt ngoài của tế bào, ảnh hưởng tới cường độ khuếch tán từ ngoài vào trong của các chất dinh dưỡng.

Vi dụ: Muối chua, ngâm giấm rau quả là các hình thức hạ thấp pH để bảo quản sản phẩm

Tuy nhiên có nhiều vi sinh vật có khả năng tự điều chỉnh pH của môi trường

Trong môi trường acid: enzym decarboxylaza được hoạt hóa, tách nhóm CO₂ của các aminoacid thành các amin có tính bazơ → pH tăng

Trong môi trường kiềm: enzym deaminaza tác động tách nhóm NH₃ của các aminoacid → biến đổi thành các acid hữu cơ, hạ thấp pH

4.2.2. Thế oxy hóa khử

Các vi sinh vật có hô hấp khác nhau thì thích hợp với các thế oxy hóa khử khác nhau

- Nhóm vi sinh vật hô hấp hiếu khí có thể tồn tại trong môi trường có thế oxy hóa khử cao, có khả năng sử dụng oxy phân tử làm chất nhận hydro thải ra trong quá trình phân giải vật chất.
- Nhóm vi sinh vật hô hấp kỵ khí: có thể tồn tại trong môi trường có thế oxy hóa khử thấp.

4.2.3. Các chất độc

Nhiều loại hóa chất có tác dụng sát khuẩn. Tác dụng của nó mạnh hay yếu phụ thuộc vào nồng độ và thời gian tác động.

Các chất độc vô cơ:

- Các muối kim loại nặng: HgCl_2 , AgNO_3 , CuSO_4 ..., các ion của kim loại này thường kết hợp với protein và enzym làm vô hoạt các enzym này
- Các chất có khả năng oxy hóa mạnh: các nguyên tố thuộc nhóm halogen, H_2O_2 , NO , KMnO_4 . Các chất này có khả năng sát khuẩn mạnh và bay hơi nhanh.
- Các loại acid, bazơ: có tác dụng sát khuẩn mạnh, làm tan phần lipoid trong thành tế bào, phân giải protein
- Các khí: CO , NO , SO_2 có khả năng kết hợp với các ion kim loại trong các enzym hô hấp → làm vô hoạt các enzym đó

Các chất độc hữu cơ

- Rượu, aldehyd, phenol là các chất sát khuẩn mạnh, sử dụng để sát trùng, sát thương, ngâm các mẫu vật nghiên cứu.
- Các loại thuốc nhuộm cũng là các chất độc hữu cơ mạnh. Thường sử dụng chất nhuộm màu với nồng độ loãng
- Các sản phẩm trao đổi chất của vi sinh vật: các sản phẩm trao đổi chất sinh ra sẽ quay trở lại ức chế các hoạt động sống của vi sinh vật.

Yêu cầu khi sử dụng các hóa chất tiêu diệt vi sinh vật trong bảo quản thực phẩm là:

- Các chất này phải dễ phân hủy, dễ bay hơi
- Không độc hại hoặc ít độc với người và vật nuôi
- Diệt khuẩn nhanh ở nồng độ nhỏ
- Tan trong nước
- Không phá hủy các dụng cụ chứa

4.3. Các yếu tố sinh học

Trong tự nhiên, các vi sinh vật sống thành tập thể, có quan hệ qua lại với nhau, các quan hệ đó là:

Quan hệ cộng sinh: hai sinh vật cùng sống chung, cùng sinh trưởng, phát triển là không gây ảnh hưởng xấu cho nhau. Sự phát triển của sinh vật này hỗ trợ sự phát triển của sinh vật kia.

Vi dụ: vi khuẩn nốt sần và rễ cây họ đậu; địa y (tảo và nấm); hạt kefir (vi khuẩn lactic và nấm men)

Quan hệ hỗ sinh: hai sinh vật phát triển độc lập, sản phẩm trao đổi chất của loại này là thức ăn cho loại kia

Vi dụ: nấm mốc chuyển tinh bột thành đường, nấm men chuyển đường thành rượu, vi khuẩn acetic chuyển rượu thành acid acetic

Quan hệ ký sinh: Là mối quan hệ giữa hai cơ thể sống. Sự phát triển của loại này là sự suy vong của loài kia

Vi dụ: thực khuẩn thể (virus ký sinh trên vi khuẩn)

Quan hệ đối kháng: là quan hệ đối nghịch, ức chế hoặc tiêu diệt nhau. Thường gặp dưới hình thức cùng tranh giành một nguồn thức ăn. Sản phẩm trao đổi chất của loài này ức chế sự phát triển của loài khác

Ví dụ: Vi khuẩn lactic lên men đường tạo thành acid lactic, acid này ức chế vi khuẩn thối rữa hoạt động. Một số vi sinh vật có khả năng tạo thành kháng sinh để tiêu diệt loại khác.