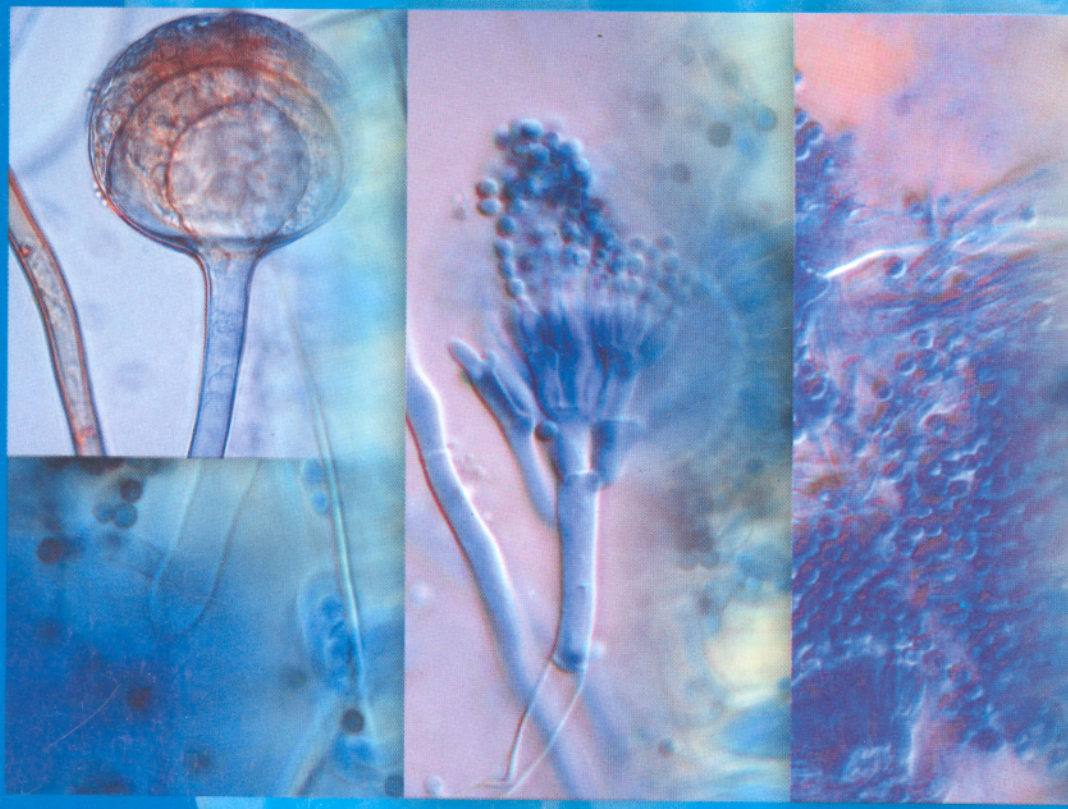
Split Unregistered Version - http://www.simpopdf.com

PGS.TS. NGUYỄN XUÂN THÀNH (Chủ biên)
TS. NGUYỄN BÁ HIÊN - *TS.* HOÀNG HẢI - VŨ THỊ HOAN
PGS.TS. NGUYỄN XUÂN THÀNH

Giáo trình

VI SINH VẬT HỌC CÔNG NGHIỆP



NHÀ XUẤT BẢN GIÁO DỤC

Split Unregistered Version - http://www.simpopdf.com

PGS. TS. NGUYỄN XUÂN THÀNH (Chủ biên)
TS. NGUYỄN BÁ HIÊN - *TS.* HOÀNG HẢI - *GV.* VŨ THỊ HOÀN
PGS. TS. NGUYỄN XUÂN THÀNH

GIÁO TRÌNH
VI SINH VẬT HỌC CÔNG NGHIỆP

(Dùng cho sinh viên các trường Đại học, Cao đẳng, Trung học kĩ thuật và Dạy nghề)

NHÀ XUẤT BẢN GIÁO DỤC

Split Unregistered Version - http://www.simpopdf.com

Lời nói đầu

Công nghệ Sinh học Vi sinh vật (Microbial Biotechnology) là một bộ phận quan trọng trong công nghệ sinh học, là một môn khoa học nghiên cứu về những hoạt động sống của vi sinh vật (VSV), nhằm khai thác tốt nhất khả năng kì diệu của VSV vào quy trình sản xuất ở quy mô công nghiệp. Những tiến bộ của Công nghệ Sinh học VSV ngày càng xâm nhập sâu trong mọi lĩnh vực hoạt động của con người. Vấn đề ở chỗ sự phát triển của Công nghệ Sinh học vi sinh nói riêng và Công nghệ Sinh học nói chung phải thực sự phục vụ cho ấm no, hạnh phúc của toàn nhân loại, và ngăn chặn thảm họa chiến tranh (vũ khí sinh học). Điều này phù hợp với chủ trương chính sách của Đảng Cộng sản Việt Nam và Nhà nước Việt Nam xã hội chủ nghĩa được thể hiện trong nghị quyết 18 CP ngày 11/3/ 1994 của Thủ tướng Chính phủ về *"Phương hướng phát triển Công nghệ Sinh học Việt Nam đến năm 2010"*.

Để góp phần giảng dạy và học tập của các trường Đại học, Cao đẳng, Trung học kĩ thuật và Dạy nghề, chúng tôi biên soạn Giáo trình vi sinh vật học công nghiệp, đồng thời dùng làm tài liệu tham khảo cho các cán bộ kĩ thuật về lĩnh vực VSV.

Giáo trình vi sinh vật học công nghiệp được biên soạn theo sự phân công cho các tác giả :

- PGS. TS Nguyễn Xuân Thành (chương 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 11, thực hành)

Split Unregistered Version - http://www.simpopdf.com

- GV Vũ Thị Hoàn (chương 2, 3, 4, 5, 11, thực hành)

- TS Nguyễn Bá Hiên (chương 9, 10).

- TS Hoàng Hải (chương 3, 10).

Khi biên soạn Giáo trình vi sinh vật học công nghiệp, chúng tôi đã cố gắng thể hiện tính cơ bản, tính khoa học, tính hiện đại và tính hệ thống của môn học, dù vậy cũng không tránh khỏi những sai sót, chúng tôi mong nhận được sự góp ý của các bạn đọc để lần tái bản sau, giáo trình được hoàn thiện hơn.

TẬP THỂ TÁC GIẢ

Split Unregistered Version - http://www.simpopdf.com

PHẦN MỘT : LÍ THUYẾT

Chương 1

MỞ ĐẦU

I - ĐỐI TƯỢNG VÀ NHIỆM VỤ CỦA VI SINH VẬT HỌC CÔNG NGHIỆP

1.1. Khái niệm về vi sinh vật

Chung quanh ta, ngoài các sinh vật lớn mà chúng ta có thể nhìn thấy được, còn có vô vàn các sinh vật nhỏ bé, muốn thấy chúng phải sử dụng kính hiển vi. Người ta gọi chúng là VSV.

Định nghĩa : VSV là những cơ thể vô cùng nhỏ bé, mà mắt thường không nhìn thấy được, chỉ có thể quan sát được VSV bằng kính hiển vi.

- Môn khoa học nghiên cứu về hoạt động sống của VSV được gọi là vi sinh vật học.

- VSV bao gồm nhiều nhóm khác nhau : virus, vi khuẩn, xạ khuẩn, nấm men, nấm mốc, niêm vi khuẩn, vi khuẩn lam, tảo...

- VSV phân bố rất rộng rãi trong tự nhiên : trong đất, trong nước, trong không khí, trong cơ thể các sinh vật khác và trong cả các loại lương thực, thực phẩm, các hàng hóa khác.

1.2. Lĩnh vực và các chuyên khoa vi sinh vật

- Vi sinh vật học phát triển rất nhanh và đã dẫn đến việc hình thành các lĩnh vực khác nhau : Vi khuẩn học (*Bacterriology*) ; Nấm học (*Mycology*), Tảo học (*Phicology*), Virus học (*Virology*) v.v...

- Việc phân chia các lĩnh vực VSV còn dựa vào các hướng ứng dụng, đó là các chuyên khoa : Y vi sinh vật học, thú y vi sinh vật học, vi sinh vật công nghiệp, vi sinh vật nông nghiệp, vi sinh vật không khí, vi sinh vật học nước... Gần đây còn phát triển các lĩnh vực mới như : vi sinh vật học phóng xạ, địa vi sinh vật học, vi sinh vật học vũ trụ v.v...

Ngoài ra, VSV còn được chia theo hệ sinh thái : từ thấp đến cao, từ chua đến kiềm, từ lạnh đến nóng, từ yếm khí đến hảo khí.

Split Unregistered Version - http://www.simpopdf.com

1.3. Nội dung của môn học Vi sinh vật học công nghiệp

- Tìm hiểu các quy luật về sự phát sinh, phát triển và tiến hóa của VSV : về hình thái, cấu tạo, sinh lí, sinh hóa, di truyền... của các nhóm VSV thường gặp trong tự nhiên.

- Nghiên cứu vai trò to lớn về nhiều mặt của các nhóm VSV trong tự nhiên và trong công nghiệp, trên cơ sở đó tìm kiếm các biện pháp, các phương pháp nhằm khai thác một cách đầy đủ nhất những tác động tích cực của VSV và ngăn chặn một cách hiệu quả nhất các tác động có hại của chúng.

- Định hướng trong nghiên cứu về các lĩnh vực của công nghệ VSV, tạo ra nhiều loại chế phẩm VSV hữu ích, ứng dụng trong sản xuất nông, công nghiệp, phục vụ đắc lực cho hoạt động sống của con người.

1.4. Yêu cầu của môn Vi sinh vật học công nghiệp

Sau khi học xong môn học này, học viên phải hình thành được các năng lực cơ bản sau :

1.4.1. Về kiến thức

- Hiểu ý nghĩa, vai trò của VSV trong sản xuất và đời sống xã hội, đặc biệt trong tương lai khi công nghệ sinh học phát triển.

- Nắm vững về đặc điểm hình thái, cấu tạo tế bào và hoạt động sống rất đa dạng của VSV.

- Nắm vững một số nhóm VSV chính có ý nghĩa trong sản xuất công nghiệp, cơ chế hoạt động của chúng, những ứng dụng chính trong sản xuất, chế biến và bảo quản sản phẩm.

1.4.2. Về kĩ năng

Biết liên hệ, vận dụng được vào việc học tập các học phần về kĩ thuật công nghiệp để hiểu được những ứng dụng chính của VSV trong lĩnh vực đó.

1.4.3. Về thái độ

- Yêu thích môn vi sinh vật học với mong muốn khám phá những đặc tính còn tiềm ẩn của thế giới VSV kì diệu.

- Có năng lực tự học, tự nghiên cứu để nâng cao hiểu biết và ứng dụng VSV trong ngành kĩ thuật công nghiệp.

II - VAI TRÒ CỦA VI SINH VẬT

VSV có vai trò thuận và nghịch :

Split Unregistered Version - http://www.simpopdf.com

2.1. Vai trò thuận

- VSV tham gia vào việc khép kín vòng tuần hoàn các vật chất và giữ cân bằng sinh thái trong tự nhiên.

- Một số chủng giống VSV tiết ra chất kháng sinh, vitamin, chất kích thích sinh trưởng. Chính vì vậy nó còn được áp dụng trong các quy trình công nghệ để sản xuất thuốc kháng sinh, vitamin và chất kích thích sinh trưởng v.v...

- Một số chủng, giống VSV trong tế bào có chứa tinh thể diệt côn trùng, người ta dùng các chủng giống VSV này vào trong quy trình công nghệ sản xuất chế phẩm VSV dùng trong bảo vệ thực vật để diệt côn trùng có hại.

- VSV còn phân huỷ các chất độc hại, các phế thải công, nông nghiệp, làm sạch môi trường.

2.2. Vai trò nghịch

- VSV gây ra các bệnh cho người, động và thực vật, chúng phá huỷ mùa màng trong quá trình sản xuất trong chế biến, bảo quản lương thực và thực phẩm.

- VSV còn phá huỷ các công trình xây dựng cầu, cống, các di tích lịch sử, gây nhiều phiền nhiễu trong hoạt động sống của con người.

Như vậy VSV có mặt ở mọi nơi, thâm nhập vào mọi hoạt động sống của chúng ta. Nắm vững hoạt động của chúng, chúng ta có thể đề ra các biện pháp làm cho chúng trở thành vũ khí sắc bén trong công cuộc chinh phục và cải tạo thiên nhiên, để phục vụ con người.

2.3. Ứng dụng vi sinh vật trong cuộc sống và bảo vệ môi trường

2.3.1. Trong lĩnh vực y tế

Tình hình sức khoẻ của con người hiện đang ở trong tình trạng đáng lo ngại. Hầu như lúc nào cũng có khoảng 1/3 dân số đang ở trạng thái đau ốm. Công nghệ vi sinh đã đóng góp trong việc tìm kiếm nhiều loại dược phẩm quan trọng, chẩn đoán và điều trị nhiều loại bệnh hiểm nghèo cho con người, gia súc, gia cầm.

a) *Vacxin*

Trong quá trình tìm kiếm các biện pháp, thuốc phòng và trị các loại bệnh truyền nhiễm. Công nghệ vi sinh đã tạo ra vacxin, nhất là vacxin thế hệ mới. Vacxin thế hệ mới có những ưu điểm là : Rất an toàn cho người sử dụng, vì không chế từ các VSV gây bệnh ; giá thành hạ vì không nuôi

Split unregistered version - http://www.simpopdf.com
cấy virus trên phôi thai gà hay các tổ chức động vật, vốn rất phức tạp và tốn kém.

- Vacxin riboxom : Cấu tạo từ riboxom của từng loại vi khuẩn gây bệnh (thương hàn, tả, dịch hạch..), ưu điểm của loại vacxin này là ít độc, tính miễn dịch cao.

- Vacxin các mảnh của virus : Là vacxin chế tạo từ glicoprotein của vỏ virus gây bệnh như virus cúm.....

-Vacxin kĩ thuật gen : Là vacxin chế tạo từ vi khuẩn hay nấm men tái tổ hợp, có mang gen mã hóa việc tổng hợp protein kháng nguyên của một virus hay vi khuẩn gây bệnh nào đó.

b) *Insulin*

Việc sản xuất insulin ở quy mô công nghiệp ngày càng là một thành công rực rỡ của công nghệ gen.

Insulin là một protein được tuyến tuỵ tiết ra nhằm điều hòa lượng đường trong máu. Cơ thể thiếu hụt insulin trong máu sẽ làm rối loạn hầu hết quá trình trao đổi chất ở cơ thể dẫn đến tích nhiều đường trong nước tiểu. Để điều trị bệnh này, người ta phải tiêm insulin cho người bệnh : Loại insulin chế từ tuyến tuỵ của gia súc, hay người ta tổng hợp insulin bằng con đường hóa học.

Quá trình tổng hợp này rất phức tạp, rất tốn kém. Năm 1978, H. Boger đã chế insulin thông qua kĩ thuật di truyền vi khuẩn *Escherichia coli*.

Cụ thể người ta đã chuyển gen chi phối tính trạng tạo insulin của người sang cho *Escherichia coli*. Với *Escherichia coli* đã tái tổ hợp gen này, qua nuôi cấy trong nồi lên men có dung tích 1000 lít, sau một thời gian ngắn có thể thu được 200 gam insulin, tương đương với lượng insulin chiết rút từ 8000 - 10.000 con bò.

c) *Interferon*

Interferon có bản chất protein, là chất giúp cho cơ thể chống lại được nhiều loại bệnh.

Thông thường người ta muốn thu nhận interferon, phải tách chiết chúng từ huyết thanh của máu nên rất tốn kém. Cũng như insulin, người ta chế interferon thông qua con đường VSV. Năm 1980, Gilbert đã thành công trong việc chế interferon từ *Escherichia coli*, năm 1981, họ thu nhận interferon từ nấm men *Saccaromyces cerevisiae* cho lượng tăng gấp 10.000 lần so với ở tế bào *Escherichia coli*.

Split Unregistered Version - http://www.simpopdf.com

d) *Kích tố sinh trưởng HGH (Human growth homone)*

HGH được tuyến yên tạo nên, thông thường muốn chế được HGH, người ta phải chích từ tuyến yên tử thi, mỗi tử thi cho 4 - 6mg HGH, theo tính toán, muốn chữa khỏi cho một người lùn phải cần 100 - 150 tử thi.

Năm 1983 sự thành công của công nghệ vi sinh đã giúp con người chế được HGH từ VSV. Nếu 1 lít dịch lên men *Escherichia coli*, thu được lượng HGH tương ứng với 60 tử thi.

e) *Chất kháng sinh*

Kháng sinh chế từ VSV được con người đầu tư sản xuất từ lâu. Đến nay người ta đã tìm thấy có tới 2500 loại thuốc kháng sinh với cấu trúc phân tử đa dạng, trong số đó, chủ yếu có nguồn gốc từ VSV.

2.3.2. Trong lĩnh vực nông nghiệp

- Cải tạo giống cây trồng : Thông qua kĩ thuật di truyền với sự hỗ trợ của VSV, con người đã tạo ra được giống cây trồng có nhiều tính ưu việt, đó là cho năng suất cao, chất lượng nông sản tốt, sức đề kháng sâu, bệnh cao v.v...

- Sản xuất chế phẩm (phân bón) VSV làm dinh dưỡng cho cây trồng : Nitragin ; Azotobacterin ; Azospirillum ; Photphobacterin ; Phân hữu cơ vi sinh đa chức năng ; Phân lân vi sinh v.v...

- Sản xuất chất kích thích sinh trưởng Gibberellin ; Aucin từ VSV.

- Sản xuất chế phẩm VSV dùng trong bảo vệ thực vật : BT ; Biospor ; Enterobacterin ; Bathurin v.v...

2.3.3. Vi sinh vật trong vấn đề năng lượng và bảo vệ môi trường

- Sản xuất cồn làm nguồn năng lượng thay xăng dầu chạy xe các loại :

Công nghệ vi sinh lên men nguyên liệu rẻ tiền như rỉ đường để sản xuất cồn chạy xe thay xăng dầu. Năm 1985, ở Brasil đã sản xuất 1 tỉ lít cồn/ năm, dùng để chạy xe hơi.

- Tạo khí sinh học (Biogas) :

Thường biogas chứa khoảng 60 - 80% khí mê tan (CH_4), được sinh ra trong quá trình lên men các phế thải hữu cơ. Nguyên lí của quá trình này là lên men yếm khí của nhóm VSV yếm khí chịu nhiệt. Trong quá trình phân huỷ, chuyển hóa các hợp chất hữu cơ, người ta thu được biogas.

Split Unregistered Version - http://www.simpopdf.com

- Bảo vệ môi trường :

Công nghệ vi sinh đã tham gia tích cực trong việc xử lí phế thải công, nông nghiệp, rác thải sinh hoạt, nước thải, làm sạch môi trường. Đây là vấn đề cấp thiết trên toàn cầu hiện nay.

2.3.4. Trong lĩnh vực bảo quản chế biến

Hệ VSV trong thực phẩm và công nghệ bảo quản chế biến thực phẩm.

2.3.5. Trong lĩnh vực công nghiệp

Ứng dụng công nghệ VSV lên men, nhân sinh khối tạo sản phẩm như : sản xuất protein đơn, sản xuất bột ngọt, bia, rượu, cồn nước ngọt có ga...

HƯỚNG DẪN ÔN TẬP

1. Nắm được thuật ngữ, định nghĩa : VSV ? Vi sinh vật học ?
2. Sự phân bố của VSV trong tự nhiên và các lĩnh vực, chuyên khoa VSV.
3. Nội dung của môn học và yêu cầu của môn học.
4. Vai trò của VSV trong hoạt động sống của con người.

Split Unregistered Version - http://www.simpopdf.com

Chương 2

VIRUS

I - KHÁI NIỆM

1.1. Định nghĩa

Virus là nhóm VSV chưa có tế bào, kể cả tế bào đơn giản nhất cũng không có, chúng tồn tại như là vật chất sống. Kích thước của virus rất nhỏ bé, được tính bằng đơn vị nanomet (nm).

1.2 Tính chất của virus

- Virus có kích thước nhỏ bé từ hàng chục đến hàng trăm nm, 1nm = 10^{-9}m, nhưng vẫn có khả năng biểu hiện những tính chất cơ bản của sự sống, như gây nhiễm cho tế bào và duy trì nòi giống qua các thế hệ, mà vẫn giữ được tính ổn định về mọi đặc tính sinh học của virus trong tế bào cảm thụ.

- Virus không có cấu tạo tế bào, chỉ là vật chất sống đơn giản, chứa một loại axit nucleic (ADN hoặc ARN).

- Khi virus đã xâm nhập vào trong các tế bào, hệ thống thông tin di truyền ở trong axit nucleic của virus điều hành sự tổng hợp các thành phần cấu tạo nên virus.

- Virus không có trao đổi chất, không có enzym hô hấp và enzym chuyển hoá, vì vậy virus bắt buộc phải sống kí sinh nội bào, tách khỏi tế bào chủ, virus không tồn tại được.

- Virus không nhân lên trong môi trường dinh dưỡng bình thường, môi trường dinh dưỡng của virus là : môi trường tế bào tổ chức sống.

- Virus có khả năng tạo thành tinh thể.

- Virus không bị lún hay bị lắng đọng trong quá trình li tâm.

- Tất cả các loại thuốc kháng sinh dù loại gì, liều lượng cao đến đâu đều vô hiệu hoá đối với virus.

II - HÌNH THÁI, KÍCH THƯỚC CỦA VIRUS (xem hình 2.1 và 2.2)

Virus chưa có cấu tạo tế bào, mỗi virus không thể gọi là một tế bào, mà được gọi là một hạt virus hay virion. Đó là một virus thành thục, có cấu trúc hoàn chỉnh.

Virus có nhiều dạng hình thái khác nhau :

Split Unregistered Version - http://www.simpopdf.com

2.1. Dạng hình cầu đối xứng xoắn

Đa số virus gây bệnh cho người và động vật có dạng hình cầu, như : virus cúm, virus quai bị, virus ung thư ở người và động vật, chúng kích thước từ 100 -150nm.

2.2. Dạng hình que đối xứng xoắn

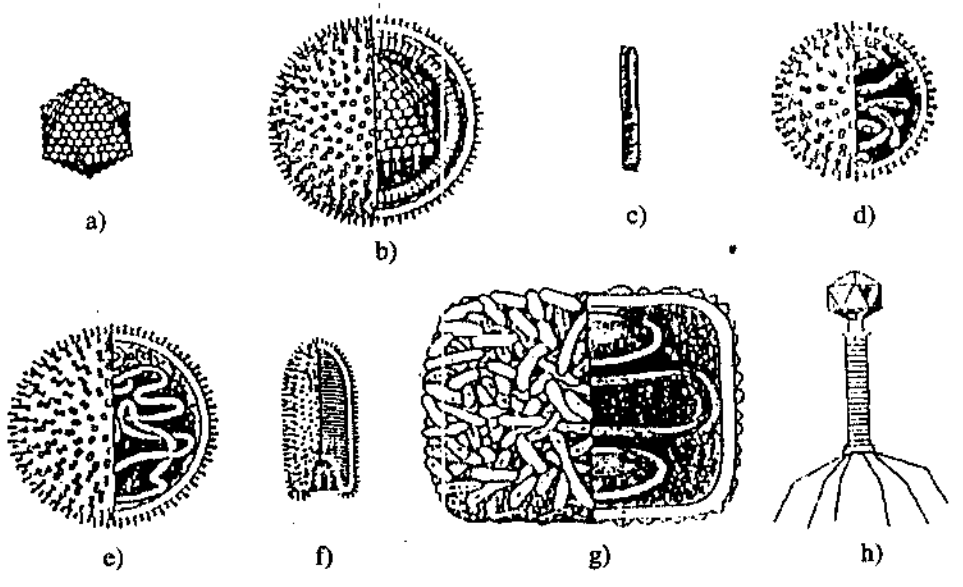
Gồm hầu hết các virus gây bệnh cho thực vật, như : virus đốm lá cây thuốc lá, virus đốm khoai tây, chúng kích thước từ 15nm – 250nm.

2.3. Dạng hình khối đối xứng xoắn

Gồm các virus có nhiều góc cạnh, có cấu tạo phức tạp, như : virus khối u của người và động vật, virus đường hô hấp, chúng kích thước từ 30 - 300nm.

2.4. Dạng hình tinh trùng

Là loại virus có cấu trúc gồm 2 phần : phần đầu có dạng hình khối, phần đuôi có dạng hình que. Những loại virus này được gọi là thực khuẩn thể *(phage, bacteriophage)*, như virus đậu mùa, chúng có kích thước biến động từ 10 - 250nm.



***Hình 2.1.** Hình thái của một số virus*

a) Virus polio, mụn cơm, Adeno, Rota ; b) Herpesvirus ; c) TMV ; d) Virus cúm ; e) Sởi, quai bị, á cúm ; f) Dại ; g) Poxvirus ; h) Các phage T

Split Unregistered Version - http://www.simpopdf.com

III - CẤU TRÚC CỦA VIRUS

Cấu trúc cơ bản của virus bao gồm hai thành phần chính :

3.1. Axit nucleic (phần ruột)

Nằm ở giữa hạt virus tạo thành lõi hay hệ gen của virus, chứa axit nucleic, mỗi loại virus đều phải có một trong hai loại axit nucleic hoặc ADN, hoặc ARN, những virus có cấu trúc ADN phần lớn mang ADN sợi kép, còn virus mang ARN thì chủ yếu ở dạng sợi đơn. Axit nucleic là vật liệu được mã hóa mang thông tin di truyền của virus, hầu hết các virus thực vật chứa ARN, virus gây bệnh cho người và động vật, một số chứa ADN, một số chứa ARN, còn thực khuẩn thể *(phage)* thì luôn luôn chứa ADN.

Trong dạng virus hình que, axit nucleic sắp xếp như một mạch xoắn vòng, giống như hình lò xo xoắn ốc.

Trong dạng virus hình khối, hình cầu và phần đầu của *phage* thì axit nucleic nằm cuộn tròn chính giữa.

Axit nucleic của virus chỉ chiếm từ 1-2% khối lượng của hạt virus, nhưng nó có chức năng đặc biệt quan trọng :

- Các axit nucleic mang mật mã di truyền đặc trưng cho từng virus.
- Axit nucleic quyết định khả năng gây nhiễm của virus trong tế bào cảm thụ.
- Axit nucleic quyết định chu kì nhân lên của virus trong tế bào cảm thụ.

3.2. Capsit (phần vỏ)

Là lớp vỏ trực tiếp bao quanh lõi axit nucleic của virus, có bản chất là protein, gọi là capsit, do nhiều đơn vị capsome tạo thành :

- Capsit bao quanh axit nucleic của virus để bảo vệ không cho enzym nucleaza tác động và sự phá huỷ axit nucleic.
- Capsit giữ cho hình thái và kích thước của virus luôn luôn được ổn định.
- Capsit mang tính kháng nguyên đặc hiệu của virus.

IV - SỨC ĐỀ KHÁNG CỦA VIRUS

- Hoạt tính của virus phụ thuộc rất nhiều vào pH của môi trường, tùy theo từng loại virus mà nó có sức chịu đựng pH khác nhau, đa số virus chịu được ở độ pH từ 5 đến 9.

Split Unregistered Version - http://www.simpopdf.com

- Khả năng chịu nhiệt của virus tùy thuộc vào từng loại. Đa số virus dễ dàng bị mất hoạt tính ở 55- 60^{0}C trong vòng 5-30 phút, ở nhiệt độ -70^{0}C đến -196^{0}C (nitơ lỏng), virus vẫn đảm bảo được hoạt tính, do đó phương pháp bảo quản virus tốt nhất là phương pháp đông khô hay phương pháp làm lạnh đột ngột ở -70^{0}C, sau đó bảo quản ở tủ lạnh -20^{0}C.

- Những tia tử ngoại có thể làm mất hoạt tính của virus.

- Tất cả các chất kháng sinh hầu như không có tác dụng đối với virus, vì vậy người ta không dùng kháng sinh để điều trị các bệnh virus.

- Nếu virus được nuôi cấy vào động vật cảm thụ, virus sẽ nhân lên nhanh, mạnh và độc lực của virus được tăng cường. Nếu virus nuôi cấy vào động vật không cảm thụ thì virus sẽ không nhân lên được hoặc nhân lên rất ít (đối với một số virus), nếu cứ nuôi cấy tiếp đời qua động vật không cảm thụ này thì độc lực của virus tăng dần đối với động vật không cảm thụ này, nhưng độc lực lại giảm dần đối với vật chủ chính, người ta gọi là quá trình làm nhược độc, ứng dụng tính chất này để chế tạo các *vacxin* nhược độc.

V - NUÔI CẤY VIRUS

5.1. Nuôi cấy trên động vật thí nghiệm

Đây là phương pháp cổ điển, đã được sử dụng từ lâu và ngày nay còn được ứng dụng để phân lập virus, nghiên cứu bệnh lí, tác dụng gây bệnh trên cơ thể, trên các tổ chức riêng biệt, và những đặc tính sinh học của virus. Tuy nhiên phương pháp này có nhược điểm : mất nhiều thời gian, không kinh tế, dễ gây ô nhiễm và làm lây lan bệnh.

Phương pháp này dùng huyễn dịch bệnh phẩm nghi có virus tiêm cho động vật cảm thụ, sau một thời gian, động vật cảm thụ sẽ có các biểu hiện lâm sàng. Căn cứ vào bệnh cảnh lâm sàng và mổ khám xem các bệnh tích đặc trưng, có thể kết luận sự có mặt của virus. Nếu trường hợp bệnh cảnh lâm sàng không bộc lộ ra, người ta dùng các phản ứng huyết thanh để xác định hiệu giá kháng thể có trong máu, qua đó chứng minh sự có mặt của virus.

Tùy từng loại virus mà lựa chọn đúng động vật cảm thụ, ví dụ virus toi gà *(Newcastle)* : chọn gà giò ; virus viêm não : dùng chuột nhắt trắng ; virus cúm : dùng sóc ; virus dịch tả lợn : dùng lợn choai.

5.2. Nuôi cấy trên phôi thai gà đang phát triển

Đa số virus có thể phát triển trên phôi gà, do đó phương pháp này được sử dụng để phân lập, kiểm nghiệm, định loại, chế tạo kháng nguyên

Split Unregistered Version - http://www.simpopdf.com

và các loại vacxin. Đây là phương pháp thuận lợi, tiết kiệm và cho kết quả nhanh chóng ; có thể cùng một lúc cấy lên hàng loạt phôi gà và thu được một lượng virus khá lớn.

Tùy thuộc vào loại virus mà chọn tuổi phôi thích hợp và lựa chọn đường tiêm vào các tổ chức khác nhau của phôi.

Với virus cảm nhiễm đường hô hấp, thì tiêm vào túi niệu hoặc túi ối ; với virus hướng da thì tiêm vào màng niệu đệm ; còn đối với virus hướng thần kinh thì tiêm vào túi lòng đỏ, màng niệu đệm hoặc vào não.

5.3. Nuôi cấy trên môi trường tế bào tổ chức

Đây là phương pháp khoa học tiên tiến được sử dụng rộng rãi trong y học và thú y học để nghiên cứu các virus như nuôi cấy phân lập, giám định, chuẩn độ, xác định tính chất huyết thanh học, quan sát hình thái siêu cấu trúc của virus và đặc biệt dùng môi trường tế bào tổ chức để chế tạo các vacxin virus.

5.4. Nuôi cấy virus gây bệnh thực vật

- Để nuôi cấy virus gây bệnh thực vật, người ta dùng các cây cảm thụ trồng riêng trong nhà kính, thường nuôi trên các cây trồng được một năm. Các cây này được trồng theo nhiều đợt và tiến hành cấy truyền virus từ đợt cây đã hết thời kì sinh dưỡng sang đợt cây mới còn non.

- Có nhiều phương pháp nhiễm virus vào cây :

+ Đối với virus đốm lá cây thuốc lá thì ép lá, rồi lọc qua lọc vi khuẩn, lấy dịch lọc tiêm vào cây lành. Đối với cây có nhựa thì lấy nhựa của cây chứa virus, tiêm trực tiếp vào cây lành.

+ Đối với những virus chỉ lan truyền trong thiên nhiên nhờ côn trùng, thì người ta lợi dụng vòi của các côn trùng này chọc thủng màng kitin của tế bào và truyền virus vào trong.

+ Ngoài ra còn dùng phương pháp ghép cành của cây bị bệnh vào gốc cây lành.

VI - QUÁ TRÌNH NHÂN LÊN CỦA VIRUS TRONG TẾ BÀO CẢM THỤ

Virus chỉ có thể nhân lên trong tế bào cảm thụ, nhờ hoạt động của tế bào mà virus thực hiện sự tổng hợp các thành phần của chúng và lắp ráp thành các hạt virus mới.

Quá trình nhân lên bắt đầu từ lúc virus hấp phụ lên bề mặt của tế bào, cho đến lúc virus được trưởng thành chui ra khỏi tế bào. Quá trình nhân lên của virus chia 4 giai đoạn :

Split Unregistered Version - http://www.simpopdf.com

6.1. Giai đoạn hấp phụ của virus lên bề mặt tế bào

Các hạt virus nằm trong dung dịch bao quanh tế bào luôn luôn ở trạng thái chuyển động, chúng va chạm lên bề mặt tế bào và nhờ đó chúng tìm tới tế bào cảm thụ. Trên bề mặt tế bào cảm thụ lại có những thụ thể (receptor) đặc hiệu để cho các vị trí cấu trúc đặc hiệu trên bề mặt hạt virus gắn vào thụ thể.

Quá trình hấp phụ của virus vào tế bào quyết định bởi mối tương tác giữa thụ thể của virus với thụ thể của tế bào. Sự hấp phụ này chỉ xảy ra khi hai thụ thể của virus và tế bào hoàn toàn ăn khớp với nhau. Quá trình này phụ thuộc vào tần số va chạm ngẫu nhiên giữa hạt virus với tế bào thụ cảm, nếu tần số va chạm càng lớn thì sự tiếp xúc càng lớn và ngược lại. Khi đã tiếp xúc trên tế bào kí chủ, thì hạt virus phải tìm đến *điểm thụ cảm* trên thành tế bào kí chủ, điểm thụ cảm này có thành phần hoá học giống hệt như của virus.

6.2. Giai đoạn xâm nhập của virus vào tế bào

Tại điểm thụ cảm, trụ đuôi phaze co lại, cong lên, xuyên qua màng tế bào thụ cảm để bơm axit nucleic vào trong, ở một số loại virus gây bệnh cho động vật, vì không có cơ quan đặc biệt đảm nhận để bơm axit nucleic vào trong, thì bản thân virus phải tiết ra enzym lizozim để dung giải điểm thụ cảm to hơn, lớn hơn, sau đó cả hạt virus chui vào bên trong của tế bào kí chủ. Bên trong của tế bào kí chủ, hạt virus được cởi áo để giải phóng axit nucleic ra ngoài

6.3. Giai đoạn tổng hợp các thành phần của virus

Ngay sau khi virus xâm nhập vào trong tế bào vật chủ, sự tổng hợp protein, ADN hoặc ARN đặc trưng của tế bào bị đình chỉ hoàn toàn và thay vào đó là quá trình sinh tổng hợp các thành phần của virus, dưới sự chỉ huy của mật mã gen virus. Virus có 2 thành phần chính đó là axit nucleic và protein capsit, do đó phải thực hiện hai quá trình sinh tổng hợp axit nucleic để làm nguyên liệu của nhân virus và sinh tổng hợp protein tạo nên vỏ capsit.

Đây là giai đoạn phức tạp nhất của quá trình nhân lên của virus, nó phụ thuộc vào loại axit nucleic của virus và kết quả cuối cùng là để tổng hợp được axit nucleic và các thành phần cấu trúc khác của virus. Người ta thấy rằng có 2 quá trình tổng hợp xảy ra, đó là :

- Quá trình tổng hợp protein sớm, đây là cơ sở, là nền tảng để tạo thành các axit nucleic – ruột của những hạt virus mới.

Split Unregistered Version - http://www.simpopdf.com

- Quá trình tổng hợp protein muộn, đây là cơ sở, là nền tảng để tạo thành các vỏ của hạt virus mới.

6.4. Giai đoạn lắp ráp các thành phần virus mới

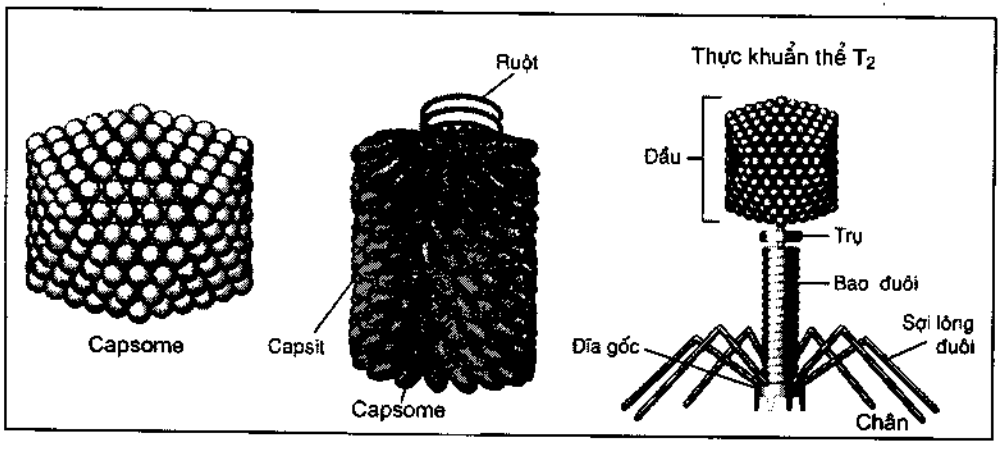
Giai đoạn này thường xảy ra ở gần màng tế bào, axit nucleic và protein được tổng hợp ở các nơi khác nhau trong tế bào, chúng được chuyển dịch lại gần nhau và kết hợp với nhau tạo thành virus hoàn chỉnh.

Nhờ enzym cấu trúc của virus hoặc enzym của tế bào cảm thụ giúp cho các thành phần cấu trúc của virus được lắp ráp theo khuôn mẫu của virus mẹ, tạo thành những hạt virus mới và chui ra khỏi tế bào kí chủ theo hai cơ chế sau :

- Cơ chế nổ tung : Là các hạt virus mới ồ ạt chui ra cùng một lúc.

- Cơ chế từ từ : Là các hạt virus mới lần lượt chui ra khỏi tế bào kí chủ.

- Tuỳ từng loại virus khác nhau, mà có thời kì tiềm tàng hay thời kì ủ bệnh khác nhau.



Hình 2.2. Hình thái và cấu tạo virus hoa, lá cây thuốc lá

VII - PHÂN LOẠI VIRUS

7.1. Dựa vào cơ thể bị bệnh do virus

- Virus thực vật *(phitophagineae).*
- Virus động vật *(zoophagineae).*
- Virus vi khuẩn *(phagineae).*
- Virus côn trùng.

Split Unregistered Version - http://www.simpopdf.com

7.2. Dựa vào tính chất dịch tễ và tính lâm sàng của bệnh

- Bệnh do virus đường hô hấp.
- Bệnh do virus đường ruột.
- Bệnh do virus hướng bì.
- Bệnh do virus hướng thần kinh.
- Bệnh do virus hướng nội tạng.

VIII - VAI TRÒ CỦA VIRUS

- Virus gây lên các bệnh rất hiểm nghèo cho người, động, thực vật, chúng phá hủy mùa màng và nông sản phẩm trong quá trình sản xuất, chế biến, bảo quản lương thực và thực phẩm.

- Dùng virus để chuẩn đoán và chữa bệnh do các VSV khác gây lên, lợi dụng virus để chế vacxin phòng bệnh, áp dụng quy trình công nghệ để sản xuất ra các chế phẩm dùng trong công, nông nghiệp và các lĩnh vực khác phục vụ cho con người.

HƯỚNG DẪN ÔN TẬP

1. Hãy nêu các tính chất chung của virus.
2. Trình bày cấu trúc chung và cấu trúc riêng của virus.
3. Các nhân tố vật lí, hoá học, sinh học có ảnh hưởng tới virus như thế nào và ứng dụng của nó ?
4. Các phương pháp nuôi cấy virus.
5. Các giai đoạn trong quá trình nhân lên của virus.

Split Unregistered Version - http://www.simpopdf.com

Chương 3

CÁC NHÓM VI SINH VẬT

I - VI KHUẨN

1.1. Hình thái của vi khuẩn (hình 3.1)

Vi khuẩn *(Bacteria)* là những VSV đơn bào, không có màng nhân (prokaryote), chúng có cấu trúc và hoạt động đơn giản hơn nhiều so với các tế bào có màng nhân (eukaryote). Kích thước của vi khuẩn được tính bằng đơn vị micromet (μm).

Dựa theo hình thái bên ngoài, có thể chia vi khuẩn làm 5 loại hình khác nhau : cầu khuẩn, trực khuẩn, cầu trực khuẩn, xoắn khuẩn và phẩy khuẩn.

1.1.1. Cầu khuẩn (Coccus, cocci)

- Là những vi khuẩn có hình cầu, tuy nhiên có nhiều loại có thể là hình tròn, hình bầu dục như lậu cầu khuẩn *Neisseria Gonorrhoeae*, hoặc hình ngọn nến như phế cầu khuẩn *Streptococcus pneumoniae*.

Kích thước của cầu khuẩn thay đổi trong khoảng từ 0,5-1,0μm, (μm : micromet hay micron, $1\mu m = 10^{-3}mm$).

- Cầu khuẩn được chia ra thành các giống chính sau đây :

+ Giống đơn cầu khuẩn (*Micrococcus, Monococcus*)

Thường đứng riêng lẻ từng tế bào một, đa số sống hoại sinh trong đất, nước và không khí như *Micrococcus agilis, Micrococcus roseus, Micrococcus luteus.*

+ Giống song cầu khuẩn (*Diplococcus)*

Là những cầu khuẩn đứng thành từng đôi, một số loại *Diplococcus* có khả năng gây bệnh như não mô cầu khuẩn *(Neisseria meningitidis)*, lậu cầu khuẩn *(Neisseria gonorrhoeae).*

+ Giống liên cầu khuẩn (*Streptococcus*)

Là những cầu khuẩn đứng thành từng chuỗi dài như liện cầu khuẩn sinh mủ (*Streptococcus pyogenes).* Trong giống này còn có loại liên song cầu khuẩn (*Streptodiplococcus*), tức song cầu khuẩn tập hợp từng đôi một thành từng chuỗi dài. Đây là loại vi khuẩn gây bệnh thường hay gặp.

Split Unregistered Version - http://www.simpopdf.com

+ Giống tứ cầu khuẩn (*Tetracoccus*)

Là những cầu khuẩn đứng thành từng nhóm bốn tế bào một. Tứ cầu khuẩn thường sống hoại sinh, song cũng có loài có khả năng gây bệnh cho động vật như *Tetracoccus homeri*.

+ Giống bát cầu khuẩn (*Sarcina*)

Là những cầu khuẩn đứng thành những khối gồm 8 hoặc 16 tế bào. Trong không khí thường gặp một số loài như *Sarcina lutea, Sarcina aurantiaca*.

+ Giống tụ cầu (*Staphilococcus, staphilococci*)

Là những cầu khuẩn đứng thành từng đám giống như chùm nho. Đa số tụ cầu sống hoại sinh, một số có thể gây bệnh cho người và động vật như *Staphilococcus aureus, Staphilococcus epidermidis*.

1.1.2. Trực khuẩn (Bacillus)

Là tên chung để chỉ các loài vi khuẩn có hình que, hình gậy, đầu tròn hay đầu vuông, kích thước của trực khuẩn 0,5-1 × 1-5μm. Những trực khuẩn hay gặp thuộc các giống sau :

a) *Bacillus*

Là trực khuẩn gram dương, sống hảo khí, sinh nha bào, chiều ngang của nha bào không vượt quá chiều ngang của vi khuẩn, do đó khi có nha bào, tế bào vi khuẩn không thay đổi hình dạng, ví dụ, trực khuẩn nhiệt thán *(Bacillus anthracis)*.

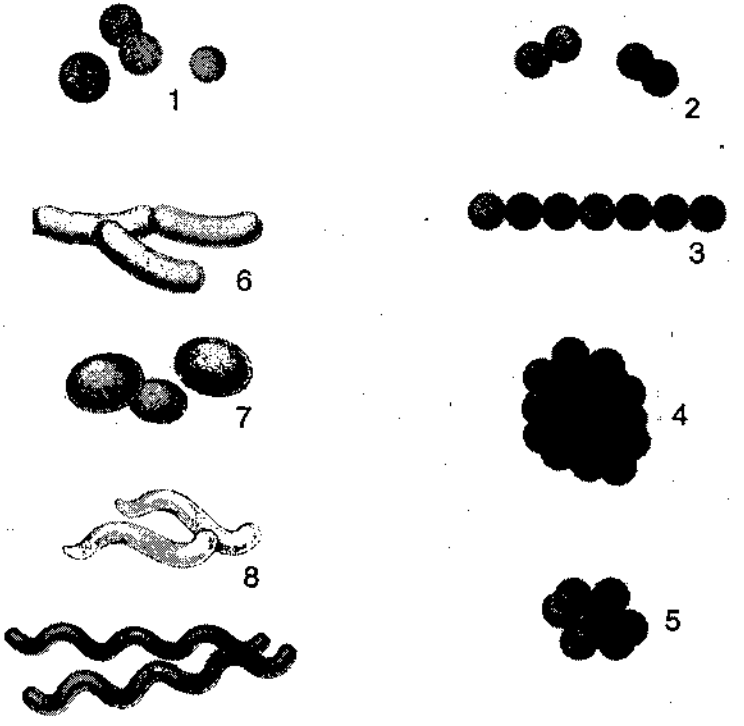
b) *Bacterium*

Là trực khuẩn gram âm, sống hảo khí, không sinh nha bào, thường có lông ở quanh thân vi khuẩn, có nhiều loại *Bacterium* gây bệnh cho người và gia súc như trực khuẩn đường ruột. Ví dụ : *Salmonella, Escherichia, Shigella, Proteus...*

c) *Clostridium*

Là trực khuẩn gram dương hai đầu tròn, sống kị khí, kích thước khoảng 0,4 - 1 × 3 - 8μm, sinh nha bào, chiều ngang của nha bào thường lớn hơn chiều ngang của vi khuẩn, do đó khi mang nha bào thì vi khuẩn bị biến đổi hình dạng như hình thoi, hình vợt, hình dùi trống. Có nhiều loại gây bệnh cho người và động vật như trực khuẩn uốn ván (*Clostridium tetani*), trực khuẩn ung khí thán *(Clostridium chauvoei)*, trực khuẩn gây bệnh ngộ độc thịt (*Clostridium botulinum),* trực khuẩn hoại thư sinh hơi *(Clostridium perfringens)*, nhưng cũng có loài rất có ích như trực khuẩn cố định nitơ (*Clostridium pasteurianum) v.v...*

Split Unregistered Version - http://www.simpopdf.com



Hình 3.1. Hình thái các loại vi khuẩn
1. Đơn cầu ; 2. Song cầu ; 3. Chuỗi cầu ; 4. Tụ cầu ;
5. Bát cầu ; 6. Trực khuẩn ; 7. Cầu trực khuẩn ; 8. Xoắn khuẩn

1.1.3. Cầu trực khuẩn (Cocco-bacillus)

Là loại vi khuẩn trung gian giữa cầu khuẩn và trực khuẩn, có hình bầu dục, hình trứng, có kích thước khoảng 0,25 - 0,3 × 0,4 - 1,5μm, ví dụ : vi khuẩn tụ huyết trùng (*Pasteurella*), vi khuẩn dịch hạch.

1.1.4. Xoắn khuẩn (Spirochaetales)

Là những vi khuẩn có hình sợi lượn sóng, gồm các vi khuẩn có từ hai vòng xoắn trở lên, bắt màu gram dương, di động được nhờ có một hay nhiều tiên mao mọc ở đỉnh. Kích thước của xoắn khuẩn thay đổi trong khoảng 0,5-3,0 × 5-40μm, ví dụ : *Treponemma detina, Spirium rubrum, Leptospira canicola, Leptospira pomona.*

1.1.5. Phẩy khuẩn (Vibrio)

Là tên chung để chỉ các vi khuẩn có hình que uốn cong, có hình giống như dấu phẩy, hình lưỡi liềm.

Phần lớn phẩy khuẩn sống hoại sinh, một số ít có khả năng gây bệnh như phẩy trùng tả, như *Vibrio cholerae.*

Split Unregistered Version - http://www.simpopdf.com

1.2. Cấu tạo tế bào vi khuẩn (xem hình 3.2)

Tính từ ngoài vào trong, cho thấy :

1.2.1. Tiên mao (Flagellum) : Nhờ có tiên mao (roi) mà vi khuẩn di chuyển được. Một tế bào có thể có 1 hoặc vài tiên mao, kích thước dao động 0,01 – 0,03 × 4 – 100μm. Có 3 loại tiên mao : đơn mao, chùm mao và chu mao. Thành phần hóa học của tiên mao chủ yếu là protein, chiếm > 90 %, phần còn lại là các chất vô cơ.

1.2.2. Nhân gốc : Vai trò điều khiển tiên mao di động theo các hướng khác nhau.

1.2.3. Tiêm mao : Đó là các lông tơ phủ ngoài cùng của tế bào vi khuẩn, có tác dụng bảo vệ tế bào và là chỗ bám khi 2 tế bào tiếp hợp với nhau, ở giai đoạn trưởng thành, 1 tế bào có tới vài nghìn tiêm mao. Thành phần hóa học của tiêm mao chủ yếu là protein.

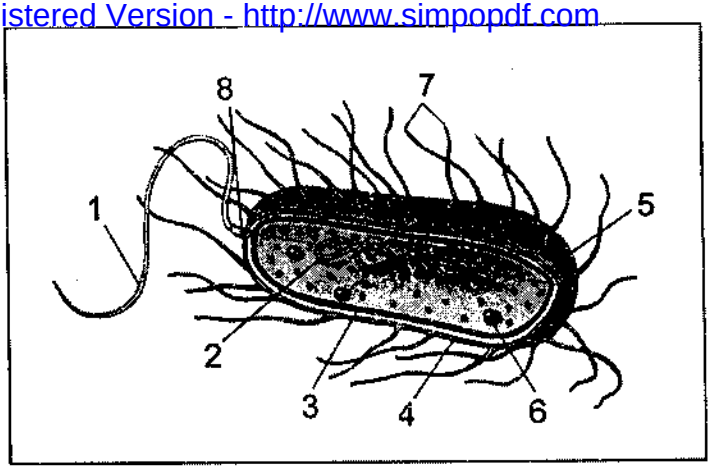
1.2.4. Lớp vỏ nhày (lớp dịch nhày) : Là lớp dịch được phủ phía bên ngoài của tế bào vi khuẩn. Nhờ có lớp vỏ nhày này mà tế bào vi khuẩn mới có khả năng xâm nhập vào tế bào chủ. Thành phần hóa học của lớp vỏ nhày rất khác nhau, phụ thuộc vào từng chủng giống vi khuẩn khác nhau, thậm chí còn phụ thuộc vào từng giai đoạn sinh trưởng, phát triển của vi khuẩn, phụ thuộc vào môi trường sống khác nhau. Nhưng nhìn chung, lớp vỏ nhày được tạo bởi 2 loại như sau : Polisaccarit và polipectit.

1.2.5. Thành tế bào vi khuẩn : Nằm phía trong của lớp vỏ nhày, có vai trò bảo vệ tế bào và luôn luôn giữ cho tế bào ở trạng thái định hình. Thành phần hóa học của thành tế bào rất khác nhau và có cấu trúc vô cùng phức tạp, có thể thành tế bào được cấu trúc bởi hợp chất dị cao phân tử – Heteropolimer, ngoài ra trong thành tế bào vi khuẩn, người ta còn thấy có nhiều hợp chất murein, đây là hợp chất hữu cơ có cấu trúc phức tạp được tạo bởi các dây nối 1.4, 1.6 pectit.

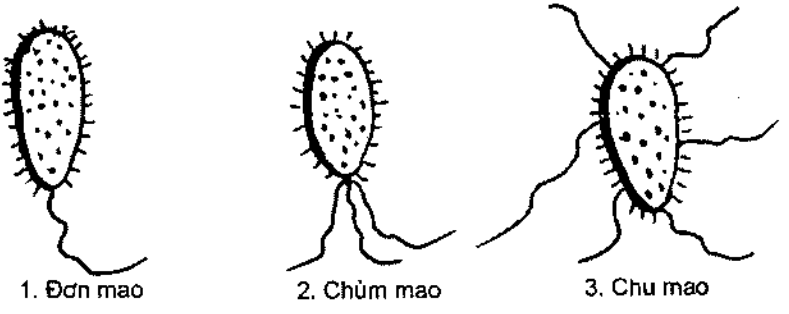
1.2.6. Màng nguyên sinh chất : Nằm phía trong của thành tế bào có vai trò rất lớn trong hoạt động sống của tế bào, đó là : vận chuyển các chất dinh dưỡng vào trong tế bào và bào thải các chất không cần thiết ra ngoài tế bào, ngoài ra còn có chức năng là giữ cho áp suất thẩm thấu trong và ngoài tế bào ổn định, là nơi sinh tổng hợp của lớp vỏ nhày, là nơi dự trữ các chất dinh dưỡng của tế bào.

1.2.7. Riboxom : Trong tế bào vi khuẩn có chứa nhiều riboxom, có hằng số lắng là 50S và 30S. Vi khuẩn có 1 loại riboxom = 70S, có khối lượng mol phân tử = 2,7 × 10^6 đvC. Riboxom có vai trò trong việc tổng hợp protein của tế bào.

Split Unregistered Version - http://www.simpopdf.com



Hình 3.2. Cấu tạo tế bào vi khuẩn
1. Tiên mao ; 2. Nhân ; 3. Màng nguyên sinh chất ; 4. Lớp vỏ nhày, 5. Thành tế bào ; 6. Riboxom ; 7. Tiêm mao ; 8. Nhân gốc



Hình 3.3. Các kiểu tiên mao (flagellum) của vi khuẩn
1. Đơn mao ; 2. Chùm mao ; 3. Chu mao

1.2.8 Mezoxom : Được tạo lên bởi nhiều lớp cuộn lại với nhau hình cầu hoặc hình trứng, vai trò của mezoxom trong sự hình thành vách ngăn ngang trong quá trình phân chia tế bào vi khuẩn.

1.2.9. Nhân : Nhân của vi khuẩn không phải là nhân thật, chỉ tồn tại ở chất nhân, có vai trò rất lớn trong sự tổng hợp protein của tế bào và di truyền các tính trạng cho thế hệ sau.

1.2.10. Các hạt dữ trữ khác : Trong tế bào vi khuẩn còn có rất nhiều các chất, các hạt dự trữ và sắc tố, các loại vitamin đóng vai trò quan trọng trong hoạt động sống của vi khuẩn.

Split Unregistered Version - http://www.simpopdf.com

1.2.11. Nha bào (xem hình 3.4)

Nha bào có sức đề kháng cao đối với các nhân tố vật lí và hóa học như nhiệt độ, tia cực tím, áp suất và các chất sát trùng.

Ở nhiệt độ 180^0C, nha bào của *Clostridium botulinum* chịu được 10 phút. Trong điều kiện nhiệt độ thấp và sự khô cạn, nha bào có thể sống được một thời gian rất dài. Nha bào vi khuẩn nhiệt thán *(Bacillus anthracis)* có thể sống tới 18 năm hoặc lâu hơn nữa ở trạng thái tiềm sinh. Dưới tác động của các loại hóa chất cũng như các loại tia bức xạ, cùng một nồng độ, cùng một thời gian tác động, có thể dễ dàng giết tế bào vi khuẩn, nhưng không giết được nha bào.

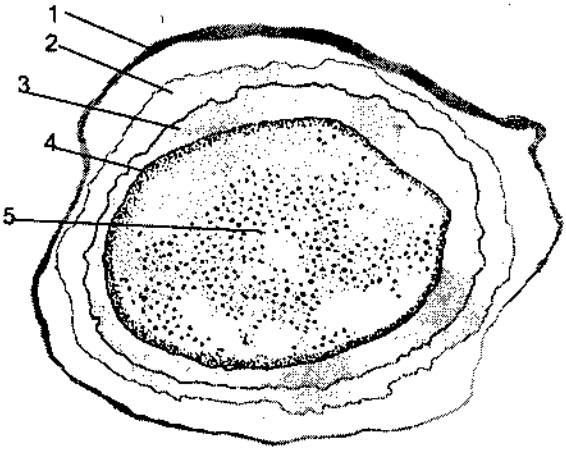
Ví dụ : Trong dung dịch phenol 5%, vi khuẩn chết rất nhanh, nhưng nha bào có thể sống tới 25 ngày, hoặc trong dung dịch $HgCl_2$ 1%, vi khuẩn chết ngay, còn nha bào thì sống được trên 2 giờ.

Sự tồn tại của nha bào trong tự nhiên của những vi khuẩn gây bệnh là nguồn lây lan bệnh nguy hiểm. Sở dĩ nha bào có sự đề kháng cao và sống lâu là do các yếu tố sau :

- Nước trong nha bào phần lớn ở trạng thái liên kết, do đó không có khả năng làm biến tính protein khi tăng nhiệt độ.

- Do trong nha bào có một lượng lớn ion Ca^{++} và axit dipicolinic.

Protein trong nha bào kết hợp với dipicolinat canxi thành một phức chất có tính ổn định cao đối với nhiệt độ.



Hình 3.4. *Cấu trúc nha bào*
1. Vỏ ; 2. Màng nha bào ; 3. Vách nha bào ;
4. Nhân ; 5. Nguyên sinh chất.

- Các enzym và các hoạt chất sinh học khác trong nha bào đều tồn tại dưới dạng không hoạt động làm hạn chế sự trao đổi chất của nha bào đối với môi trường bên ngoài.

- Sự có mặt của các axit amin có chứa lưu huỳnh, đặc biệt là xystin giúp nha bào đề kháng với tia cực tím.

- Với cấu trúc có nhiều màng bao bọc và tính ít thẩm thấu của các lớp màng, làm cho các chất hóa học và các chất sát trùng khó có thể tác động tới nha bào.

Split Unregistered Version - http://www.simpopdf.com

1.3. Phân loại vi khuẩn

Đơn vị cơ bản trong phân loại VSV nằm trong hệ thống phân loại của sinh vật gồm :

- Giới (kingdom) : Ví dụ : giới động vật, giới thực vật. Tên gọi lấy theo đặc điểm chính của giới bằng chữ Hi Lạp hoặc Latinh.

- Ngành (division hoặc philum), dưới ngành (subdivision).

- Lớp (class), dưới lớp (subclass).

- Bộ (order) : tên gọi lấy tên họ chính và tận cùng bằng *ales*. Ví dụ : *Pseudomonadales*.

- Bộ phụ (Suborder) hay dưới bộ, có tên tận cùng bằng *ineae*. Ví dụ : *Rhodobacteriineae*.

- Họ (famili) thường có tên tận cùng bằng *aceae*. Ví dụ : *Enterobacteriaceae*.

Dưới họ (subfamili) : thường tận cùng bằng *oideae*.

- Tộc (tribe) : thường có tên tận cùng bằng *eae*. Ví dụ : *Escherichieae*.

Dưới tộc (subtribe) thường tận cùng bằng *inae*.

- Giống (genus hoặc genera). Ví dụ : *Staphilococcus, Salmonella*.

- Loài (species).

Đây là đơn vị phân loại cơ bản nhất, tên khoa học của loài thường đặt kép, tên *giống* trước và tên *loài* sau. Mỗi loài vi khuẩn đều mang một tên khoa học riêng, tên này được đặt theo nguyên tắc "danh pháp kép" của Linne, gồm hai từ : từ thứ nhất chỉ tên giống (viết hoa) còn từ thứ hai chỉ tên loài (viết thường).

Ví dụ : *Staphilococcus aureus*, trong đó *Staphilococcus* chỉ tên giống, *aureus* chỉ tên loài.

1.4. Vai trò của vi khuẩn

- Vi khuẩn tham gia tích cực vào việc khép kín vòng tuần hoàn các vật chất trong tự nhiên.

- Vi khuẩn phân hủy và chuyển hóa các chất trong đất và trong môi trường thành các chất dễ tiêu cung cấp dinh dưỡng cho cây trồng, làm sạch môi trường.

- Một số loại vi khuẩn làm giàu dinh dưỡng nitơ cho đất, một số khác có khả năng tiết ra các enzym quý để sử dụng vào quy trình công nghệ sản xuất chế phẩm, dùng trong hoạt động sống của con người.

Split Unregistered Version - http://www.simpopdf.com

- Vi khuẩn gây lên nhiều loại bệnh cho người và động, thực vật, chúng phá hủy các công trình xây dựng, mùa màng và nông sản phẩm trong quá trình sản xuất, chế biến, bảo quản lương thực và thực phẩm.

II - XẠ KHUẨN

2.1. Đặc điểm của xạ khuẩn

Xạ khuẩn (*Actinomycetes*) là một nhóm vi khuẩn thật (*Eubacteria*), có cấu tạo sợi như nấm, nhưng lại có kích thước và cấu tạo tế bào gần giống với vi khuẩn, chúng phân bố rộng rãi trong tự nhiên : trong đất, trong nước và trong các cơ chất hữu cơ.

- Những đặc điểm giống vi khuẩn như :

+ Kích thước của xạ khuẩn nhỏ bé tương tự như kích thước của vi khuẩn.

+ Nhân của xạ khuẩn cùng loại nhân của vi khuẩn.

+ Màng tế bào xạ khuẩn không chứa xenlulo hay kitin.

+ Sự phân chia tế bào của xạ khuẩn theo kiểu của vi khuẩn.

+ Xạ khuẩn không có giới tính.

- Tuy vậy xạ khuẩn lại có hình thái giống nấm ở chỗ có cấu tạo sợi, phát triển bằng phân nhánh thành những sợi nhỏ, dài gọi là khuẩn ti (hipha), mỗi khuẩn ti do một tế bào hình thành, tập hợp của các khuẩn ti này gọi là hệ khuẩn ti. Về phân loại, xạ khuẩn thuộc *procaryota*, nhóm nhân giả.

2.2. Hình dạng, kích thước

Xạ khuẩn có hệ khuẩn ti phát triển tốt, khuẩn ti không có vách ngăn và không tự đứt đoạn, bắt màu gram dương, hảo khí, hoại sinh, không hình thành nha bào, không có lông và giáp mô, đa hình thái như dạng hình chuỳ, dạng phân nhánh hay dạng sợi dài gọi là khuẩn ti (hipha) hay phân nhánh thành chùm, thành bó gọi là khuẩn ti thể (mycelium), đường kính của khuẩn ti từ 0,2 - 2,5µm, kích thước và khối lượng của khuẩn ti thể thường không ổn định, chúng phụ thuộc vào từng loại và từng điều kiện nuôi cấy.

Các khuẩn ti non và các khuẩn ti có mang bào tử thường lớn hơn so với các khuẩn ti già và không mang bào tử.

Khi già xạ khuẩn thay đổi hình dạng rõ rệt, chúng trở nên giòn và dễ gãy thành từng đoạn nhỏ có kích thước khác nhau.

Xạ khuẩn có nhiều dạng hình khác nhau : Chân chim, rễ cây, hình xoắn chùm quả, hình xoắn cành lá, hình xoắn ốc, hình đốt thưa, hình đốt dày, hình đốt xoắn (hình 3.4).

Split Unregistered Version - http://www.simpopdf.com

2.3. Cấu tạo tế bào

2.3.1. Vách tế bào xạ khuẩn

- Cấu tạo gồm lớp ngoài, lớp trong và lớp giữa tương đối dày và khá vững chắc, đó là nguyên nhân làm cho khuẩn lạc xạ khuẩn rắn chắc hơn khuẩn lạc vi khuẩn.

- Vách tế bào xạ khuẩn có cấu tạo hóa học là protein, lipit, mucopolisaccarit, ngoài ra còn chứa cả các hợp chất phốt pho và axit teictioic, nhiều men và các loại men này tham gia vào quá trình trao đổi chất của tế bào.

- Vách tế bào xạ khuẩn có nhiều chức năng như :

+ Cho phép các chất kháng sinh, axit amin, men, nhiều hợp chất khác kể cả hợp chất hoá học có kích thước lớn như dextran, protein chui qua một cách dễ dàng.

+ Cho phép các chất dinh dưỡng từ môi trường bên ngoài cũng được thẩm thấu có chọn lọc qua màng.

Bên ngoài màng tế bào có thể có vỏ nhày (capsule), lớp vỏ này cấu tạo từ polisaccarit và thường rất mỏng, ở một số xạ khuẩn lớp vỏ nhày được tạo thành trong quá trình hình thành bào tử.

2.3.2. Màng nguyên sinh chất của xạ khuẩn

Bên trong vách tế bào là một lớp màng mỏng bao phủ trực tiếp nguyên sinh chất, gọi là màng nguyên sinh chất. Màng này dày khoảng 7,5 - 10,0nm, chúng có cấu tạo tương tự như màng nguyên sinh chất của vi khuẩn. Chức năng chủ yếu của màng nguyên sinh chất xạ khuẩn là điều hoà hấp thu các chất dinh dưỡng vào tế bào và tham gia vào quá trình hình thành bào tử.

2.3.3. Nguyên sinh chất và nhân của xạ khuẩn

Cũng tương tự như nguyên sinh chất và nhân của vi khuẩn, do đó người ta cho rằng xạ khuẩn cùng loài với vi khuẩn. Trong nguyên sinh chất của xạ khuẩn có chứa :

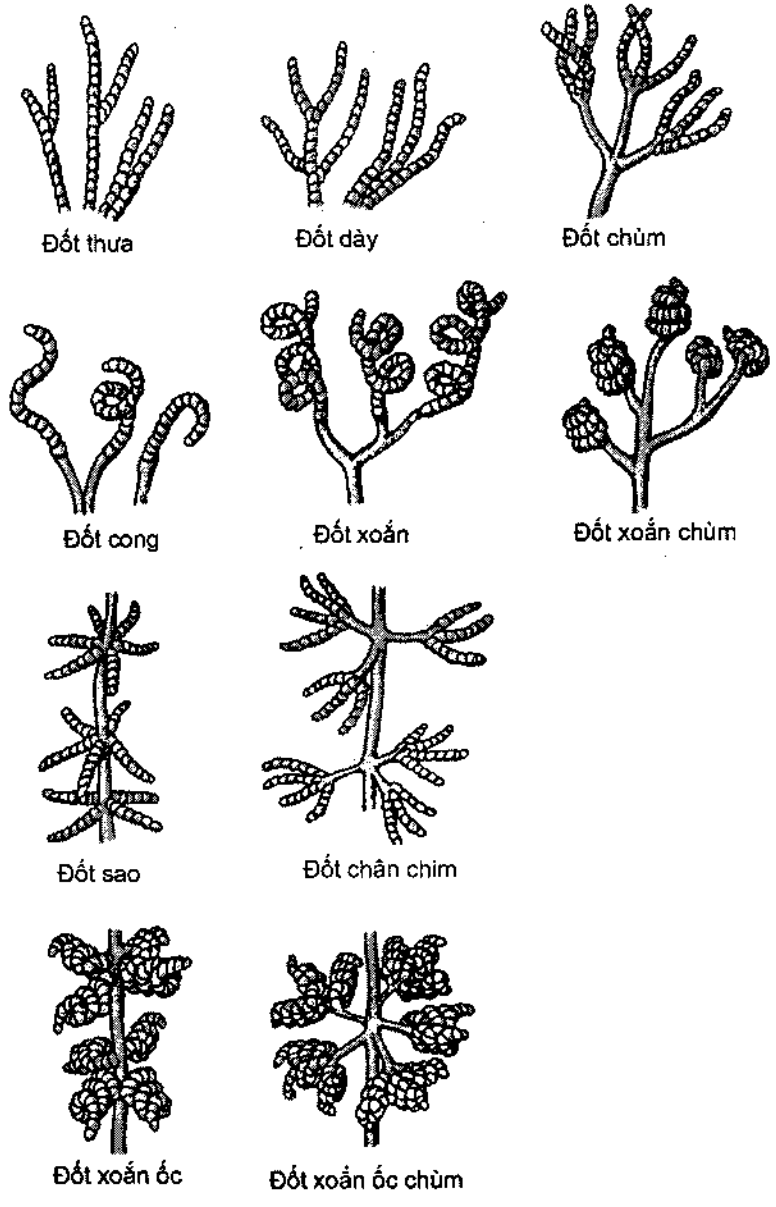
Mezoxom : có hình bọng hay hình ống, chức năng của mezoxom là làm tăng diện tiếp xúc của màng nguyên sinh chất, do đó làm tăng hoạt tính của enzym, tăng chuyển điện tử.

Riboxom : Như của vi khuẩn.

Các vật thể khác : Các vật thể ẩn nhập gồm có các hạt poliphotphat hình cầu, bắt màu thuốc nhuộm Soudan III, các hạt polisaccarit bắt màu dung dịch lugol.

Split Unregistered Version - http://www.simpopdf.com

2.4. Bào tử và sự hình thành bào tử



***Hình 3.5.** Hình thái các loại khuẩn ti xạ khuẩn*

2.4.1. Bào tử được hình thành trên đỉnh khuẩn ti khí sinh, sợi bào tử có thể có nhiều loại hình dạng khác nhau như thẳng, lượn sóng, xoắn, mọc vòng, một số xạ khuẩn có nang bào tử bên trong có chứa bào tử nang.

Split Unregistered Version - http://www.simpopdf.com

Bào tử trần (conidiospore) của xạ khuẩn có thể có hình tròn, hình bầu dục, hình que, hình trụ... Hình dạng và kích thước của bào tử có vai trò quan trọng trong định tên xạ khuẩn.

2.4.2. Sự hình thành bào tử

Bào tử trần là cơ quan sinh sản chủ yếu của xạ khuẩn, bào tử được hình thành theo cách :

- Vách ngăn được hình thành từ phía trong của màng nguyên sinh chất và tiến dần vào trong tạo ra vách ngăn không hoàn chỉnh, sau đó sợi bào tử mới phân cắt thành các bào tử trần.

- Vách tế bào và màng nguyên sinh chất đồng thời xuất hiện vách ngăn tiến dần vào phía trong và làm cho sợi bào tử phân cắt tạo thành một chuỗi bào tử trần.

2.5. Vai trò của xạ khuẩn trong tự nhiên

- Xạ khuẩn có vai trò quan trọng trong quá trình hình thành đất và tạo ra độ phì nhiêu của đất, chúng đảm nhiệm nhiều chức năng khác nhau trong việc làm mầu mỡ thêm cho đất.

- Xạ khuẩn tham gia tích cực vào các quá trình chuyển hoá và phân giải nhiều hợp chất hữu cơ phức tạp và bền vững như xenlulo, chất mùn, kitin, keratin, lignin, v.v...

- Hầu hết các xạ khuẩn thuộc giống *Actinomyces*, có khả năng hình thành chất kháng sinh như streptomixin, oreomixin, tetraxiclin, teramixin... đây là một đặc điểm quan trọng nhất của xạ khuẩn nên được sử dụng rộng rãi trong y học, thú y học và trong bảo vệ thực vật.

- Trong quá trình trao đổi chất, xạ khuẩn còn có thể sinh ra các chất hữu cơ như các loại vitamin nhóm B (B_1, B_2, B_6, B_{12}) ; một số axit hữu cơ như axit lactic, axit axetic và nhiều axit amin như axit glutamic, axit metiomin, tritofan, lizin.

- Xạ khuẩn được dùng rộng rãi trong các ngành công nghiệp lên men, chế tạo các chế phẩm men hoặc ứng dụng các men do một số xạ khuẩn có khả năng sinh ra nhiều như : proteinaza, amylaza, xenlulaza, kitinaza...

- Một số khác còn có khả năng tạo thành những chất kích thích sinh trưởng của thực vật.

- Tuy nhiên bên cạnh những xạ khuẩn có ích, một số xạ khuẩn lại sinh ra các chất độc, kìm hãm sự sinh trưởng, phát triển của cây trồng, cũng như sự phát triển của khu hệ VSV có ích trong đất ; một số khác lại là nguyên nhân gây ra một số bệnh khó chữa ở người và gia súc. Các bệnh này được gọi tên chung là *Actinomycose*.

Split Unregistered Version - http://www.simpopdf.com

2.6. Phân loại xạ khuẩn

Theo bảng phân loại của Becgây (1984), thì xạ khuẩn gồm 11 họ :

- *Actinomycetaceae*
- *Streptomycetaceae*
- *Celluomonadaceae*
- *Dermatophilaceae*
- *Frankiaceae*
- *Actinophanaceae*
- *Micromonosporaceae*
- *Caryophanaceae*
- *Nocardiaceae*
- *Pseudonocardiaceae*
- *Mycobacteriaceae*

2.7. Vai trò của xạ khuẩn

- Xạ khuẩn có vai trò rất lớn trong việc phân hủy, chuyển hóa các chất trong môi trường, làm cho môi trường sạch.

- Một số loại xạ khuẩn có khả năng tiết ra chất kháng sinh, vitamin. Người ta áp dụng vào quy trình công nghệ để sản xuất thuốc kháng sinh ; vitamin thuộc nhóm B và các chế phẩm phục vụ đắc lực cho hoạt động sống của con người.

III - NẤM

3.1. Nấm men

3.1.1. Hình thái, kích thước nấm men

- Nấm men là VSV điển hình cho nhóm nhân thật, tế bào nấm men thường lớn gấp 10 lần so với vi khuẩn.

- Nấm men có cấu tạo đơn bào, hình thái thay đổi tuỳ thuộc vào từng loại, tuỳ điều kiện nuôi cấy và trao đổi của ống giống, do đó nấm men có hình thái đa dạng : hình trứng, hình bầu dục, hình tròn, hình ống dài, hình quả dưa chuột, hình thoi, hình bình hành, hình tam giác, hình chai, hình lưỡi liềm và một số hình đặc biệt khác.

Một số loại nấm men có tế bào hình dài nối tiếp nhau thành những sợi nấm gọi là khuẩn ti thể (mycelium) hoặc khuẩn ti giả (pseudomycelium). Sợi nấm chia thành 2 loại khác nhau : sợi cơ chất hay sợi dinh dưỡng giúp nấm bám chặt vào cơ chất, hấp thu các chất dinh dưỡng chứa trong cơ chất và sợi khí sinh phát triển trong không khí, trên bề mặt của cơ chất.

Kích thước tế bào nấm men thay đổi rất nhiều tuỳ thuộc vào từng giống, từng loài, nói chung kích thước trung bình khoảng từ 3 - 5 × 5 - 10μm.

Split Unregistered Version - http://www.simpopdf.com

3.1.2. Cấu tạo của tế bào nấm men

a) *Vách tế bào*

Khi còn non, vách tế bào nấm men tương đối mỏng, tuỳ theo thời gian nuôi dưỡng mà vách tế bào dày lên. Thành phần hoá học chủ yếu của vách tế bào là glucan và mannan. Phần còn lại là protein, một ít lipit, đôi khi còn có poliphotphat, enzym, sắc tố và một ít ion vô cơ, đặc biệt vách tế bào còn có chứa chất kitin.

b) *Màng nguyên sinh chất*

Màng nguyên sinh chất có chiều dày khoảng 7 - 8μm cấu tạo chủ yếu là protein, chiếm 50% khối lượng khô, còn lại là lipit 40% và một ít polisaccarit. Chức năng của màng cũng giống như màng nguyên sinh chất vi khuẩn.

c) *Ti thể (mitochondria)*

- Là những thể hình cầu, hình que, hình sợi, kích thước khoảng từ 0,2 - 0,5 × 0,4 - 1μm. Ti thể gồm 2 lớp màng : màng trong và màng ngoài. Màng trong có hình lượn sóng hay hình răng lược, để tăng diện tích tiếp xúc, giữa 2 màng có các hạt nhỏ gọi là hạt cơ bản, bên trong ti thể là chất dịch hữu cơ.

- Chức năng của ti thể được coi là trạm năng lượng của nấm men.

+ Nó tham gia thực hiện các phản ứng oxi hoá giải phóng năng lượng ra khỏi cơ chất, làm cho năng lượng được tích luỹ dưới dạng ATP.

+ Giải phóng năng lượng khỏi ATP và chuyển dạng năng lượng đó thành dạng năng lượng có ích cho hoạt động sống của tế bào.

+ Tham gia vào việc tổng hợp nên một số hợp chất protein, lipit, hidrat cacbon, những hợp chất này tham gia vào cấu tạo màng tế bào.

+ Ngoài ra ti thể còn chứa nhiều loại men khác nhau như : oxidaza, xitocromoxidaza, peoxidaza, photphataza...

d) *Riboxom*

Số lượng riboxom thay đổi phụ thuộc vào từng loài, từng giai đoạn phát triển và từng điều kiện nuôi cấy. Có 2 loại riboxom : loại riboxom 70S và loại 80S.

e) *Các vật thể ẩn nhập khác*

- Không bào có chứa các enzym thuỷ phân, poliphotphat, lipoit, ion kim loại, các sản phẩm trao đổi chất, ngoài tác dụng là kho dự trữ, không bào còn tham gia vào quá trình trao đổi chất và điều hoà các quá trình sinh trưởng và phát triển của tế bào nấm men.

Split Unregistered Version - http://www.simpopdf.com
- Ngoài ra còn chứa một số hạt dự trữ khác như : hạt lipit dưới dạng các hạt nhỏ, các hạt glucogen, một ít hạt tinh bột.

g) *Nhân*

Nhân tế bào nấm men là nhân thật, nhân có sự phân hoá, có kết cấu hoàn chỉnh và ổn định, có khả năng biểu hiện của tế bào tiến hoá, đó là sự phân chia tế bào theo hình thức gián phân.

3.1.3. Sinh sản của nấm men

a) *Sinh sản vô tính*

- Sinh sản bằng nảy chồi :

Phương pháp nảy chồi là hình thức sinh sản phổ biến của nấm men. Khi nấm men trưởng thành sẽ nảy ra một chồi nhỏ, chồi lớn dần lên, một phần nhân của tế bào mẹ được chuyển sang chồi, sau đó tách ra thành một nhân mới, rồi hình thành vách ngăn để ngăn cách với tế bào mẹ, tạo nên một tế bào mới. Tế bào con được tạo thành có thể tách khỏi tế bào mẹ hoặc dính trên tế bào mẹ và tiếp tục nảy sinh tế bào mới.

- Sinh sản bằng phân cắt :

Một số ít nấm men có thể sinh sản bằng phương pháp phân cắt giống như vi khuẩn, tế bào dài ra rồi sau đó sinh ra những vách ngăn đặc biệt và phân cắt thành nhiều tế bào.

b) *Sinh sản hữu tính*

Tế bào nấm men có thể sinh sản bằng túi hay nang bào tử, trong mỗi túi có từ 2 đến 4 hoặc 8 bào tử. Túi bào tử được sinh ra do sự tiếp hợp của hai tế bào nấm men.

Khi 2 tế bào khác giới đứng gần nhau, ở mỗi đầu của 2 tế bào sẽ mọc ra mấu lồi và tiến sát vào nhau, 2 tế bào sẽ tiếp hợp với nhau và hình thành một hợp tử, sau đó sẽ có quá trình phối chất nguyên sinh và phối nhân. Nhân của hợp tử phân chia làm 2 hoặc 4 hoặc 8 nhân mới, và mỗi nhân con cùng với một phần nguyên sinh chất tạo thành một túi bào tử. Túi bào tử gặp điều kiện thích hợp sẽ phát triển thành một tế bào nấm men mới.

3.1.4. Vai trò của nấm men

- Nấm men phân bố rất rộng rãi trong tự nhiên, trong đất, trong nước, trong không khí, nhất là trong môi trường có chứa đường, có pH thấp như trong lương thực, thực phẩm, hoa quả, rau dưa, mật mía, rỉ đường, trong đất ruộng mía, đất vườn cây ăn quả, trong các đất có nhiễm dầu mỏ.

Split Unregistered Version - http://www.simpopdf.com

- Nhiều loại nấm men đã được ứng dụng rộng rãi để nấu rượu, nấu bia, sản xuất cồn, glixerin và điều chế một số hoá chất khác.

- Nấm men sinh sản nhanh chóng, sinh khối của chúng lại giàu protein và chứa nhiều loại vitamin, vì vậy nó được sử dụng rộng rãi trong ngành công nghiệp sản xuất thức ăn bổ sung cho người và gia súc.

- Nấm men còn được sử dụng làm nở bột mì, gây hương vị nước chấm, sản xuất một số dược phẩm.

- Tuy nhiên bên cạnh những nấm men có ích, cũng còn có một số nấm men gây hại cho người và gia súc, hoặc cũng có thể làm hư hỏng lương thực, thực phẩm.

3.2. Nấm mốc

Nấm mốc hay còn gọi là nấm sợi *(molds, moulds)*, là tên chung để chỉ tất cả các nhóm nấm không phải là nấm men và cũng không phải là các nấm lớn có mũ nấm như nấm rơm. Nấm mốc phát triển trên thực phẩm, trên giầy dép, trên quần áo, trên dụng cụ, vật liệu, chúng phát triển rất nhanh trên nhiều nguồn cơ chất hữu cơ khi gặp khí hậu nóng ẩm.

3.2.1. Hình thái, kích thước nấm mốc

Nấm mốc có cấu tạo hình sợi phân nhánh, những sợi này sinh trưởng ở đỉnh và phát triển rất nhanh, tạo thành một đám chằng chịt các sợi, từng sợi được gọi là các khuẩn ti hay sợi nấm (hipha), còn cả đám sợi thì được gọi là khuẩn ti thể hay hệ sợi nấm.

Nấm mốc có cấu tạo gồm khuẩn ti và bào tử.

a) *Khuẩn ti (hipha)*

- Là những sợi nấm phân nhánh, phát sinh từ bào tử mà ra, chiều ngang của khuẩn ti khoảng từ 3-10μm, chúng có hình thái khác nhau như hình lò xo, hình xoắn ốc, hình cái vợt, hình sừng hươu, hình cái lược, hình lá dừa.

- Một số sợi nấm phát triển sâu vào cơ chất và hấp thu các loại thức ăn chứa trong đó, gọi là sợi nấm cơ chất hay sợi nấm dinh dưỡng. Một số nấm phát triển trên bề mặt cơ chất gọi là sợi nấm khí sinh. Từ sợi nấm khí sinh này sẽ có một số sợi nấm phát triển thành những cơ quan sinh sản đặc biệt, mang bào tử.

Phần lớn các loài nấm mốc, sợi nấm có vách ngăn, nên cơ thể của chúng có cấu tạo đa bào, do có vách ngăn nên khuẩn ti không thông nhau, ngắt ra nhiều tế bào riêng biệt, nên gọi là đa bào.

nd Split Unregistered Version - http://www.simpopdf.com

b) *Bào tử (spore)*

Bào tử là cơ quan sinh sản chủ yếu của nấm mốc. Khi nấm mốc trưởng thành sẽ xuất hiện các khuẩn ti khí sinh, từ khuẩn ti khí sinh sẽ sinh sản ra các bào tử.

3.2.2. Sinh sản của nấm mốc

a) *Sinh sản vô tính*

- Bào tử đốt : Từ khuẩn ti sinh sản có sự ngắt đốt, mỗi đốt được coi như một bào tử, rơi vào môi trường sẽ nhanh chóng phát triển thành khuẩn ti mới.

- Bào tử mang dày (chlamydospore) : Trên các đoạn khuẩn ti sinh sản xuất hiện những tế bào có hình tròn hoặc gần tròn, có màng dày bao bọc tạo thành bào tử. Bào tử có khả năng đề kháng với điều kiện bất lợi của ngoại cảnh.

- Bào tử nang (sporangiospore) : Đầu một khuẩn ti sinh sản phình to dần, hình thành một cái bọc gọi là nang (sporangium). Khi nang vỡ, các bào tử được giải phóng ra ngoài.

- Bào tử đính hay bào tử trần (conidium) : Đa số các bào tử đính là bào tử ngoại sinh, nhiều loại nấm mốc có hình thức sinh sản này, các bào tử được hình thành tuần tự, liên tiếp từ khuẩn ti sinh sản, nghĩa là được sinh ra bên ngoài các tế bào sinh bào tử, một số khác sinh ra bên trong của các tế bào sinh bào tử (nội sinh).

Các bào tử đính mới sinh ra sẽ đẩy các bào tử đính cũ ra ngoài. Các bào tử đính được sinh ra trên khuẩn ti đặc biệt gọi là cuống bào tử đính (conidiophore).

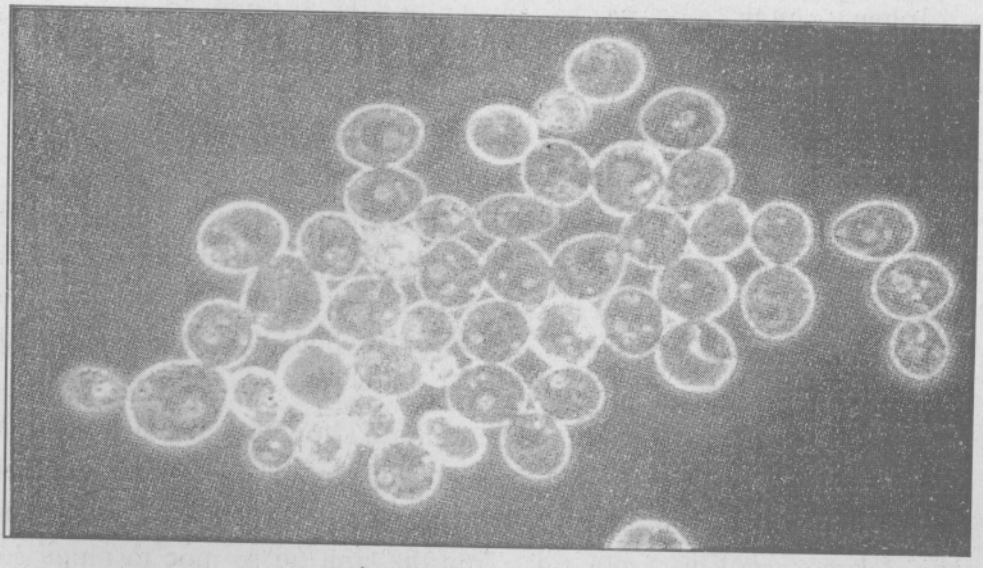
Bào tử đính có hình dạng và màu sắc khác nhau tuỳ theo loài nấm mốc, có thể là hình cầu, hình trứng, hình bầu dục, hình kim, có thể không màu, hoặc nhiều màu khác nhau (nâu, xanh lục, xám, vàng, đen...). Bào tử đính có thể là đơn bào hoặc đa bào. Chúng có thể đứng riêng từng cái hoặc xếp thành từng chuỗi, từng khối.

b) *Sinh sản hữu tính*

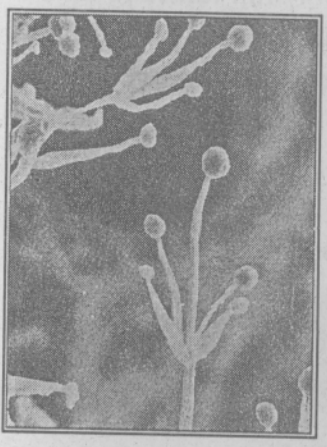
Nấm mốc cũng có quá trình sinh sản hữu tính, bao gồm các hiện tượng chất giao, nhân giao và phân bào giảm nhiễm như ở các sinh vật bậc cao.

Split Unregistered Version - http://www.simpopdf.com

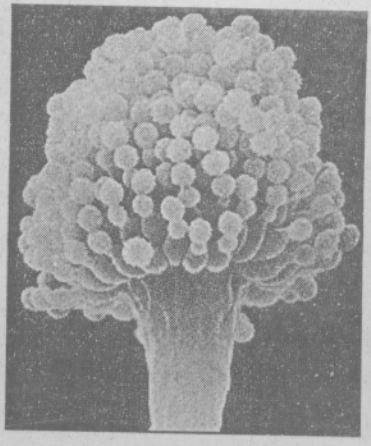
Căn cứ vào các hình thức sinh sản mà chia ra :



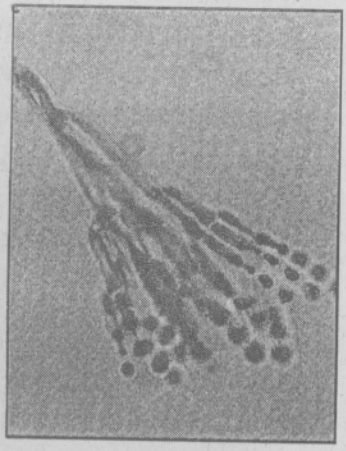
Nấm men – *Saccaromyces*



Nấm mốc - *Mucor*



Nấm mốc bậc cao - *Aspergillus*



Nấm mốc bậc cao -*Penicilium*

Hình 3.6. *Hình thái của một số nấm*

- Bào tử noãn (oospore) : Các noãn khí được sinh ra trên đỉnh các sợi nấm sinh sản. Khi noãn khí chín có chứa một hay nhiều noãn cầu. Hùng khí (cơ quan giao tử đực) được sinh ra ở gần noãn khí. Khi tiếp xúc với noãn khí, hùng khí sẽ tạo ra một hoặc vài ống xuyên chứa một nhân và một phần nguyên sinh chất thụ tinh cho một noãn cầu để tạo thành một noãn bào tử. Noãn bào tử được bao bọc bởi một lớp màng dày, sau một thời gian phân chia giảm nhiễm, sẽ phát triển thành khuẩn ti mới.

Split Unregistered Version - http://www.simpondf.com

- Bào tử tiếp hợp (zygospore) : Khi hai khuẩn ti khác giống tiếp giáp với nhau, chúng mọc ra hai mấu lồi gọi là nguyên phối nang (progametangia), các mấu lồi này tiến dần lại gặp nhau, mỗi mấu sẽ xuất hiện một vách ngăn phân tách hai phần đầu của hai mấu lồi thành hai tế bào đa nhân. Hai tế bào này sẽ tiếp hợp với nhau và tạo thành một hợp tử đa nhân, có màng dày bao bọc gọi là bào tử tiếp hợp.

- Bào tử túi (ascospore) : Trên khuẩn ti sinh ra hai cơ quan sinh sản là túi giao tử đực nhỏ hình ống được gọi là hùng khí (antheridium) và túi giao tử cái gọi là thể sinh túi (ascogonium). Thể sinh túi có hình cầu hoặc hình viên trụ, đầu kéo dài ra thành một ống gọi là sợi thụ tinh (trichogyne).

Khi hùng khí tiếp xúc với sợi thụ tinh thì khối nguyên sinh chất chứa nhiều nhân của hùng khí sẽ chui qua sợi thụ tinh để đi vào thể sinh túi, sau đó xảy ra quá trình phối hợp với nhau. Các nhân sắp xếp với nhau từng đôi một (một đực, một cái). Trên thể sinh túi sẽ mọc ra nhiều sợi sinh túi, các nhân kép được chuyển vào trong các sợi sinh túi, từng nhân phân chia nhiều lần và xuất hiện vách ngăn làm cho sợi sinh túi bị phân chia thành nhiều tế bào chứa nhân kép. Tế bào ở cuối sợi uốn cong lại, nhân kép phân chia một lần tạo thành 4 nhân. Sau đó tế bào này tách ra thành 3 tế bào, tế bào giữa chứa 2 nhân, tế bào ngọn và gốc chứa 1 nhân. Tế bào giữa sẽ phát triển thành túi bào tử ; tế bào ngọn và gốc sau này cũng có sự tiếp hợp thành một tế bào hai nhân, sau đó phát triển thành một túi mới.

- Bào tử đảm (basidiospore) : là bào tử ngoại sinh, khi 2 khuẩn ti khác tính tiếp giáp với nhau thì trên một khuẩn ti sẽ sinh ra một ống nối sang khuẩn ti kia, nhân và nguyên sinh chất sẽ chui sang khuẩn ti kia để tạo thành khuẩn ti thứ cấp chứa 2 nhân.

Bào tử đảm được sinh ra ở đầu những khuẩn ti thứ cấp. Tế bào 2 nhân sẽ phát triển thành đảm còn hai tế bào kia về sau sẽ tiếp hợp với nhau để tạo thành tế bào hai nhân khác.

Khi hình thành đảm, hai nhân của tế bào ở đỉnh sẽ kết hợp với nhau, sau đó phân chia liên tiếp hai lần (lần đầu giảm nhiễm) để tạo thành 4 nhân con. Tế bào phình to ra, phía trên tạo thành 4 cuống nhỏ hay còn gọi là thể bình (Sterigmata). Mỗi nhân con sẽ chui vào trong một cuống nhỏ và phát triển dần thành một bào tử đảm.

Split Unregistered Version - http://www.simpopdf.com

Đảm có thể sinh ra trực tiếp trên đám khuẩn ti thể hoặc cũng có thể sinh ra trên những cơ quan đặc biệt gọi là quả đảm (basidiocarps).

3.2.3. Vai trò của nấm mốc

Nấm mốc phân bố rộng rãi trong tự nhiên : đất, nước, không khí, nguyên, vật liệu, lương thực, thực phẩm.

- Nấm mốc góp phần quan trọng trong việc khép kín các vòng tuần hoàn vật chất trong tự nhiên, chúng có khả năng phân giải mạnh mẽ các hợp chất hữu cơ phức tạp.

- Sử dụng nấm mốc để sản xuất tương, đậu phụ, các loại enzym như : amilaza, proteinaza.

- Nhiều loại nấm mốc có khả năng tích luỹ vitamin, các chất sinh trưởng và nhiều loại ancaloit có giá trị chữa bệnh.

- Nấm mốc có khả năng tiết chất kháng sinh có giá trị như : penixilin, xephalosporum, fuzidin, fumagilin, tripaxidin.

- Bên cạnh đó nấm mốc cũng là nguyên nhân gây ra nhiều tổn thất to lớn cho việc bảo vệ mùa màng, lương thực, thực phẩm, hàng hoá, vải vóc, khí tài, dụng cụ quang học, phim ảnh, sách vở.

Nhiều loại nấm mốc gây nên những bệnh khá phổ biến và khó điều trị ở người, gia súc, cây trồng, các bệnh nấm ở người như hắc lào, nấm vảy rồng, nấm kẽ chân, nấm phổi, nấm tóc, nấm mào gà. Đặc biệt những loài nấm mốc tiết độc tố gây ngộ độc thức ăn như *Aspergilus*, gây tổn thất lớn trong chăn nuôi.

3.2.4. Phân loại nấm

- Nấm men : *Saccaromyces cerevisia ; Sacc. uvarum ; Sacc. schi ro ; Sacc. vini v.v...*

- Nấm mốc : Nấm bậc thấp : *Mucor mucedo ; Rhizopus nignicans v.v...*

Nấm bậc cao : *Aspergillus niger ; Penicillium notatum v.v...*

IV - TẢO

Tảo là những thực vật bậc thấp, quang tự dưỡng (abtotrophe) sống chủ yếu ở trong nước và những nơi có độ ẩm của nước, có ánh sáng (trên mặt đất, trong đất ở trạng thái ngủ, trên đồi núi, thân cây, tường ẩm, băng tuyết...).

Split Unregistered Version - http://www.simpopdf.com

4.1. Phân loại tảo

(Theo bảng phân loại của Liên Xô cũ (1978)).

4.1.1. Cyanophita - Tảo lam : Được phân bố chủ yếu ở vùng nước ngọt, ngoài diệp lục tố A còn chứa sắc tố b, sản phẩm quang hợp là glucogen. Loại tảo này có khả năng đồng hóa nitơ không khí do cộng sinh với bèo hoa dâu (*Anabaena azola*).

4.1.2. Chlorophita - Tảo lục : Được phân bố chủ yếu ở vùng nước ngọt, ngoài diệp lục tố A còn chứa sắc tố a, b, sản phẩm quang hợp là tinh bột.

4.1.3. Xanthophita - Tảo vàng (còn được gọi là tảo roi lệch) : Được phân bố chủ yếu ở vùng nước lợ, ngoài diệp lục tố A còn chứa sắc tố a, b, sản phẩm quang hợp là leucosin, màng tế bào có chứa pectin.

4.1.4. Bacillariophita - Tảo cát : Được phân bố chủ yếu ở vùng nước mặn, nước lợ, ngoài diệp lục tố A còn chứa sắc tố b, sản phẩm quang hợp là chất dầu.

4.1.5. Phacophita - Tảo nâu : Được phân bố chủ yếu ở vùng nước lợ, nước ngọt và một phần ở nước mặn, ngoài diệp lục tố A còn chứa sắc tố b, sản phẩm quang hợp là chất dầu và mannit.

4.1.6. Rhodophita - Tảo đỏ : Được phân bố chủ yếu ở nước mặn, nước lợ, ngoài diệp lục tố A còn chứa sắc tố a, b, sản phẩm quang hợp là tinh bột.

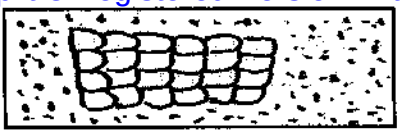
4.1.7. Euglenophita - Tảo mắt : Được phân bố chủ yếu ở nước mặn, nước lợ, ngoài diệp lục tố A còn chứa sắc tố a, b, sản phẩm quang hợp là paramilon.

4.1.8. Chrysophita - Tảo ánh vàng : Được phân bố chủ yếu ở nước mặn, nước lợ, ngoài diệp lục tố A còn chứa sắc tố a, b, sản phẩm quang hợp là leucosin.

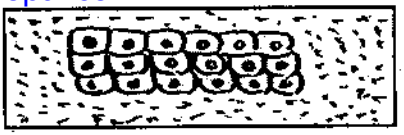
4.1.9. Pyrrophita - Tảo giáp : Được phân bố chủ yếu ở nước mặn, nước lợ, ngoài diệp lục tố A còn chứa sắc tố a, b, sản phẩm quang hợp là tinh bột.

4.1.10. Charophita - Tảo vòm (vòng) : Được phân bố chủ yếu ở nước mặn, nước lợ tạo thành bụi giống như lùm cây, ngoài diệp lục tố A còn chứa sắc tố a, b, sản phẩm quang hợp là tinh bột.

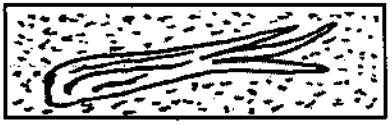
Split Unregistered Version - http://www.simpopdf.com



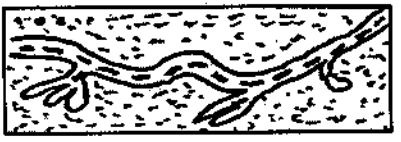
Cyanophita - Tảo lam



Chlorophita - Tảo lục

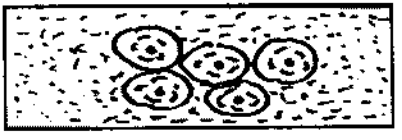


Bacillariophita - Tảo cát



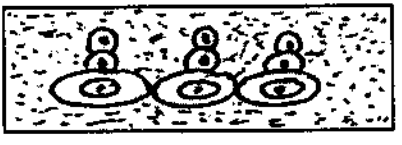
Rhodophita - Tảo đỏ

Euglenophita - Tảo mắt

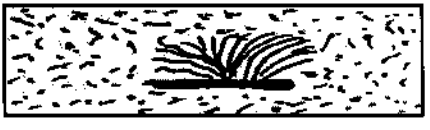


Phaeophita - Tảo nâu

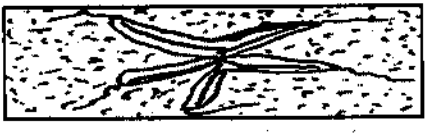
Chrysophita - Tảo ánh vàng



Pyrrophita - Tảo giáp



Charophita - Tảo vòng



Xanthophita - Tảo vàng

Hình 3.7. *Hình thái của tảo (Theo phân loại của Liên Xô cũ. 1978)*

4.2. Hình thái và cấu tạo tế bào tảo

4.2.1. Hình thái

Tảo có cơ thể là một tế bào riêng rẽ hoặc dính với nhau thành tập đoàn, chuyển động hoặc không chuyển động, cơ thể có roi chuyển động được. Roi có thể có 1 hoặc 2, đơn giản hoặc phân nhánh. Đặc điểm cấu trúc roi và số lượng roi là những tiêu chuẩn để phân loại.

Có những cơ thể tảo là dạng tản, không phân hoá thành thân, rễ, lá, không có rãnh dẫn. Tản có thể là những dạng sợi, dạng bản gồm nhiều tế bào cấu trúc nên.

Split Unregistered Version - http://www.simpopdf.com

4.2.2. Cấu tạo

- Tảo có cấu trúc 1 tế bào thực vật gồm màng bao bọc, bên trong là nguyên sinh chất, có nhân điển hình (chất nhân, màng nhân và hạch nhân). Màng có cấu trúc bằng xenlulo hoặc hemixenlulo, một số tảo, màng có nhiễm thêm chất $SiO_2.nH_2O$. Cấu trúc màng là một vỏ bao, bao có thể gồm 2 hoặc nhiều tấm hợp lại như ở *Bacillariophita* (màng gồm 2 tấm) và *Dinophita* (màng gồm nhiều tấm). Đặc điểm cấu trúc vỏ là tiêu chuẩn để phân loại tảo.

- Trong nguyên sinh chất chứa lục lạp (Chloroplast) gồm các thilakoit riêng rẽ hoặc liên kết với nhau. Trên các thilakoit mang các sắc tố (pigments). Màng lục lạp là một đặc điểm rất quan trong để phân loại các ngành tảo.

- Các sắc tố của tảo rất khác nhau, nhưng tất cả các ngành tảo đều có diệp lục a, ngoài ra ở các ngành tảo khác có thể có diệp lục b hoặc c, carotenoit và phicobiliprotein. Tuỳ theo tế bào chứa loại sắc tố nào mà chia thành : Tảo đỏ, ngoài diệp lục tố a có sắc tố đỏ phicocrytrin ; tảo vàng có sắc tố vàng xanthophin ; tảo mắt có sắc tố chlorophin a, b. Dựa vào sắc tố mà tảo có sự phân bố khác nhau so với độ sâu của nước. Hình dạng của lục lạp là chỉ tiêu để nhận dạng tảo.

- Bên trong nguyên sinh chất còn thấy các chất dự trữ như ở tảo đỏ, sản phẩm dự trữ là Floridin ; tảo lục là tinh bột, tảo lam là glucogen ; tảo mắt là paramilon. Điều đó cho thấy các ngành tảo khác nhau có chất dự trữ khác nhau.

- Ngoài ra trong nguyên sinh chất còn chứa các thể ribo, các hạt cơ thể, lipit, không bào, ở ngành tảo mắt còn có các điểm mắt (stigura), nhờ đó tế bào di chuyển về phía ánh sáng.

4.2.3. Sinh sản của tảo

Tảo có 3 cách sinh sản :

- Sinh sản dinh dưỡng : Bằng hình thức phân đôi hoặc bằng đứt đoạn khúc của cơ thể.

- Sinh sản vô tính : Bằng bào tử (spore).

- Sinh sản hữu tính : Theo 3 kiểu bằng các giao tử (gmet) : sinh sản hữu tính đẳng giao, sinh sản hữu tính dị giao, sinh sản hữu tính noãn giao.

Kết quả của quá trình sinh sản hữu tính là hình thành hợp tử (zygot).

4.3. Vai trò và giá trị dinh dưỡng của vi khuẩn lam và tảo

- Tảo và vi khuẩn lam phân bố rất rộng rãi trong tự nhiên, đa số sống trong nước ngọt và tạo thành năng suất sơ cấp của các thuỷ vực ; tảo silic

lit Unregistered Version - http://www.simpopdf.com
và tảo đỏ phân bố trong vùng nước mặn hoặc trong nước lợ, một số khác sống cộng sinh trong bèo hoa dâu.

- Tảo có ý nghĩa rất quan trọng trong quá trình hình thành và cải tạo đất, tảo tham gia vào việc khép kín vòng tuần hoàn các chất trong tự nhiên.

- Một số loại tảo lam có khả năng đồng hoá nitơ phân tử, làm giầu dinh dưỡng nitơ cho đất và cung cấp nitơ cho cây trồng.

- Tảo còn là nguồn thức ăn tốt nhất cho các loại thuỷ sản.

Tuy nhiên bên cạnh những loại tảo có giá trị dinh dưỡng, một số loại tảo lại sinh ra các chất độc, gây độc cho nguồn nước, gây độc cho các động vật thuỷ sinh, qua đó có thể gây độc cho người, nếu người ăn phải các loại thuỷ sản này ; một số ít loại tảo tiết ra độc tố, gây độc trực tiếp cho các sinh vật tiêu thụ chúng.

HƯỚNG DẪN ÔN TẬP

1. Hình thái, cấu tạo, đặc tính sinh học của vi khuẩn.
2. Hình thái, cấu tạo, đặc tính sinh học của xạ khuẩn.
3. Hình thái, cấu tạo, đặc tính sinh học của nấm.
4. Hình thái, cấu tạo, đặc tính sinh học của tảo.

Split Unregistered Version - http://www.simpopdf.com

Chương 4

SINH LÍ HỌC VI SINH VẬT

I - DINH DƯỠNG CỦA VI SINH VẬT

1.1. Dinh dưỡng các bon

- Căn cứ vào nguồn cacbon, nguồn năng lượng và nguồn chất nhận electron cuối cùng, người ta chia VSV ra thành các kiểu dinh dưỡng sau :

+ Căn cứ vào nguồn cacbon : Tự dưỡng cacbon ; Dị dưỡng cacbon.

+ Căn cứ nguồn năng lượng : VSV quang năng ; VSV hóa năng.

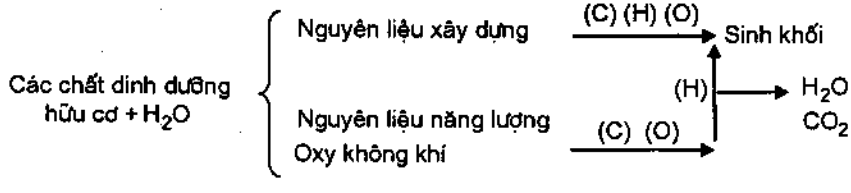
+ Căn cứ nguồn năng lượng và nguồn cacbon : VSV tự dưỡng quang năng ; VSV dị dưỡng quang năng ; VSV tự dưỡng hóa năng ; VSV dị hóa năng.

- Cacbon chiếm tỉ lệ trên 50% vật chất khô của VSV. Cacbon là yếu tố đặc biệt quan trọng trong cấu trúc tất cả các hợp chất có mặt trong tế bào VSV. Hợp chất cacbon là nguồn năng lượng quan trọng trong hoạt động sống. Trong tự nhiên có hai dạng hợp chất cacbon cơ bản : Cacbon vô cơ và cacbon hữu cơ.

- Loại hình VSV khác nhau sử dụng các nguồn cacbon sẽ không giống nhau. Có thể phân loại VSV theo nguồn dinh dưỡng cacbon sau :

1.1.1. Dị dưỡng cacbon

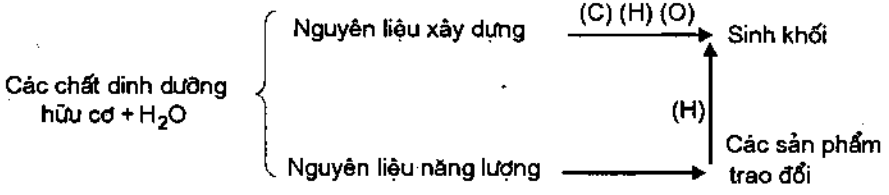
a) *VSV dị dưỡng cacbon là những VSV sử dụng nguồn dinh dưỡng cacbon trong tự nhiên từ các hợp chất hữu cơ.* Từ hợp chất hữu cơ này, ngoài nguồn cacbon ra, VSV còn thu được năng lượng cần thiết cho hoạt động sống của mình. Số năng lượng trong quá trình chuyển hóa và hấp thụ sẽ khác nhau tuỳ loại VSV. Đối với VSV dị dưỡng hảo khí quá trình oxi hóa sinh năng lượng (hô hấp) xảy ra kèm theo việc liên kết hidro với oxi của không khí.



Hình 4.1. Sơ đồ dị dưỡng cacbon trong điều kiện hảo khí

Split Unregistered Version - http://www.simpopdf.com

Đối với VSV dị dưỡng yếm khí, thì quá trình oxi hóa sinh năng lượng không kèm theo việc liên kết với oxi của không khí. Có thể chia làm hai loại : lên men và hô hấp nitrat hay hô hấp sunfat.



Hình 4.2. Sơ đồ dị dưỡng cacbon trong điều kiện yếm khí

b) *VSV dị dưỡng cacbon có thể chia thành 2 nhóm :*

- Nhóm Prototroph : VSV thuộc nhóm này có thể phát triển được trong những môi trường có chứa một nguồn cacbon duy nhất (thường là đường đơn) và các muối khoáng cần thiết (NH_4^+, PO_4^{-3}, SO_4^{-2}, K^+, Ca^{++}, Mg^{++}, Mn^{++}, Fe^{++} v.v...).

- Nhóm Auxotroph : Phần lớn các VSV dị dưỡng thuộc nhóm này. Các VSV này phát triển được trong môi trường tổng hợp đơn giản, muốn phát triển tốt, chúng còn đòi hỏi phải cung cấp thêm những chất sinh trưởng nhất định.

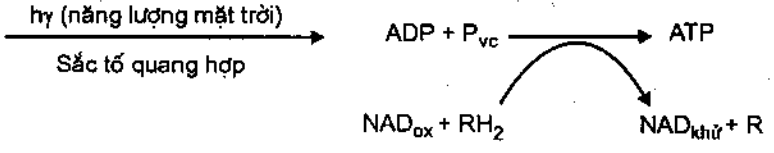
1.1.2. Tự dưỡng cacbon

- VSV tự dưỡng cacbon là loại VSV sử dụng nguồn cacbon trong tự nhiên từ hợp chất cacbon vô cơ như CO_2 hoặc muối cacbonat.

- VSV có thể sử dụng hai nguồn năng lượng khác nhau : Sử dụng trực tiếp năng lượng của ánh sáng mặt trời ; Sử dụng năng lượng hóa học nhờ sự oxi hóa hợp chất vô cơ.

1.2. Dinh dưỡng quang năng

VSV dinh dưỡng quang năng nhờ có sắc tố quang hợp mà có khả năng hấp thụ năng lượng ánh sáng mặt trời và chuyển hóa thành năng lượng hóa học (tích luỹ trong ATP). Quá trình tạo thành trong ATP gắn liền với vận chuyển ADP từ dạng oxi hóa khử sang dạng khử.



Hình 4.3. Sơ đồ tự dưỡng cacbon

Split Unregistered Version - http://www.simpopdf.com

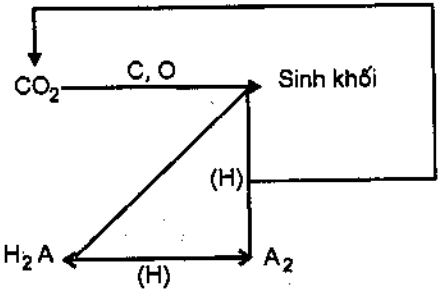
hγ : Năng lượng mặt trời ; ADP : adenozindiphotphat.

ATP : adenozintriphotphat ; P_{vc} : photphat vô cơ.

NAD_{ox} : Nicotinamit adenin dinucleotit oxi hóa.

$NAD_{khử}$: Nicotinamit adenin dinucleotit khử.

Ở cây xanh, sắc tố quang hợp là chlorophin (chlorophille), RH_2 là H_2O và R là O_2. Ở vi khuẩn quang hợp RH_2 không bao giờ là H_2O và R không bao giờ là O_2.



Hình 4.4. Sơ đồ tổng quát tự dưỡng quang năng

H_2A là chất cung cấp H_2 để khử CO_2 thành hợp chất hữu cơ của tế bào. H_2A có thể là chất vô cơ hoặc hữu cơ. VSV sử dụng hai hợp chất này thuộc về hai nhóm khác nhau :

a) *Nhóm dinh dưỡng quang năng vô cơ* (photolitotroph) : sử dụng chất vô cơ ngoại bào làm nguồn cung cấp điện tử (H). Ví dụ : vi khuẩn lưu huỳnh màu lục (họ *Cholorobiaceae* hay *Cholorobacteriaceae*). Ở vi khuẩn lưu huỳnh màu tía (họ *Chromotiaceae* hay *Thiorhadaceae*).

b) *Nhóm dinh dưỡng quang năng hữu cơ* (photoorgantroph) : dùng chất hữu cơ ngoại bào để làm nguồn cung cấp điện tử. Trong trường hợp này H_2A là các axit hữu cơ hay rượu.... Nhóm này bao gồm một số vi khuẩn trong họ *Rhodosperillaceae* hay *Arthiorhodaceae*, ví dụ *Rhodospirillum rubrum* (xoắn khuẩn màu hồng hay đỏ tía) có thể sử dụng chất hữu cơ làm chất cung cấp hidro. Loại này khi phát triển cần yếu tố sinh trưởng.

1.3. Dinh dưỡng hóa năng

$$2CO_2 + H_2S + 2H_2O \xrightarrow{h\gamma} \frac{1}{3}(C_6H_{12}O_6) + H_2SO_4$$

VSV dinh dưỡng hóa năng sử dụng năng lượng chứa trong các hợp chất hóa học. Tùy thuộc vào hợp chất hóa học khác nhau mà người ta chia VSV ra làm 2 nhóm :

Split Unregistered Version - http://www.simpopdf.com

1.3.1. Dinh dưỡng hóa năng vô cơ

Trong trường hợp này chất cho điện tử là chất vô cơ, còn chất nhận điện tử là oxi hoặc một chất vô cơ khác :

$$CO_2 + 4H + Q \longrightarrow \frac{1}{6}(C_6H_{12}O_6) + H_2O$$

Vi khuẩn chuyển hoá S *Beggiator* có thể tiến hành quá trình như sau :

$$2H_2S + O_2 \longrightarrow 2H_2O + 2S + Q$$

$$CO_2 + H_2 + Q \longrightarrow \frac{1}{6}(C_6H_{12}O_6) + O_2$$

Phương trình tổng quát quá trình dinh dưỡng hoá năng vô cơ có thể trình bày như sau :

$$\text{Hợp chất vô cơ} + O_2 \longrightarrow \text{Chất oxi hoá} + 4H + Q$$

$$CO_2 + 4H + Q \longrightarrow \frac{1}{6}(C_6H_{12}O_6) + H_2O$$

1.3.2. Dinh dưỡng hóa năng hữu cơ

Trong trường hợp này chất cho điện tử là một hợp chất hữu cơ. Phần lớn các loài VSV có kiểu dinh dưỡng này. Tuỳ theo chất nhận điện tử mà chia thành ba kiểu trao đổi chất khác nhau : lên men, hô hấp hảo khí, hô hấp yếm khí.

Chú ý về dinh dưỡng cacbon :

- Sự phân loại hình dinh dưỡng không phải là tuyệt đối. Giữa loại hình dị dưỡng và tự dưỡng, giữa loại hình quang năng và hóa năng đều có các loại hình trung gian.
- Số lượng hợp chất hữu cơ mà VSV có thể sử dụng rất lớn.
- Mức độ sử dụng các hợp chất hữu cơ của các loại VSV rất khác nhau, phụ thuộc một phần vào đặc tính sinh lí của VSV, một phần khác phụ thuộc vào đặc tính lí hóa học của bản thân chất hữu cơ.
- Ngoại cảnh ảnh hưởng không nhỏ đến quá trình đồng hóa của các loại VSV.

Do đó trong quá trình nuôi cấy vi khuẩn, chúng ta phải chú ý đầy đủ đến đặc tính sinh lí, tính chất lí hoá của nguồn cacbon và cả điều kiện ngoại cảnh, những chất sinh trưởng nhất định.

1.4. Nguồn thức ăn nitơ

- Các nguồn nitơ có ý nghĩa rất quan trọng đối với sự phát triển của VSV. Nguồn nitơ dễ hấp thụ nhất là ion NH_4^+ và NO_3^-, chúng thâm nhập vào tế bào dễ dàng và ở đó chúng tạo nên các nhóm imin và amin.

Các muối amôn của axit hữu cơ thích hợp đối với dinh dưỡng của VSV hơn là muối amôn vô cơ.

Split Unregistered Version - http://www.simpopdf.com

Các muối NO_3^- không có độ chua sinh lí, sau khi sử dụng NO_3^- sẽ còn các ion kim loại (K^+, Na^+, Mg^{++} ...), vì vậy làm kiềm hóa môi trường.

- Nguồn nitơ khó hấp thụ hơn cả là nitơ trong không khí. Để sử dụng được nguồn nitơ này, VSV phải có khả năng cố đinh nitơ, nghĩa là chuyển hóa N phân tử thành NH_3. Người ta đã xác định được khả năng cố định nitơ của nhiều loài VSV. Cùng với nguồn N vô cơ, đa số VSV có khả năng sử dụng nitơ trong các hợp chất hữu cơ. Sự sử dụng các nguồn nitơ hữu cơ thường gắn liền với sự tách nhóm NH_3 ra, sau đó sẽ thấm vào tế bào VSV.

Như vậy NH_3 là trung tâm điểm của tất cả các con đường dinh dưỡng nitơ. Tuỳ theo nguồn nitơ được sử dụng, người ta chia VSV ra làm hai nhóm :

1.4.1. VSV tự dưỡng amin

Là những VSV tổng hợp nguồn nitơ vô cơ hay hữu cơ, sau đó chuyển thành dạng NH_3 để xây dựng cơ thể.

1.4.2. VSV dị dưỡng amin

Xây dựng protein, nguyên sinh chất của mình từ axit amin có sẵn. Axit amin được sử dụng một cách nguyên vẹn không bị phân giải thành NH_3. Protein là hợp chất cao phân tử không thâm nhập vào được tế bào VSV. Vì vậy chỉ có VSV nào có khả năng tiết vào môi trường men proteinaza (thuỷ phân phân tử protein thành các peptit và axit amin) mới có khả năng đồng hóa protein. Rất nhiều VSV dị dưỡng và kí sinh có khả năng này, đặc biệt thường gặp ở nhóm vi khuẩn gây thối hảo khí.

1.5. Dinh dưỡng khoáng

Ngoài nước, các chất hữu cơ ..., trong tế bào VSV còn chứa nhiều chất khoáng. Lượng chất khoáng trong tế bào VSV thường thay đổi tuỳ loài, tuỳ từng giai đoạn và điều kiện sinh trưởng, phát triển của VSV. Mỗi nguyên tố đều có tác dụng nhất định đối với sự sinh trưởng, phát triển của tế bào VSV, mà các nguyên tố khác không thể thay thế được.

- Các nguyên tố đa lượng gồm có P, K, Ca, S, Mg, Fe, Na, Cl v.v...
- Các nguyên tố vi lượng gồm có Mn, Cu, Co, B v.v...

1.6. Cơ chế vận chuyển thức ăn vào tế bào vi sinh vật

Trong quá trình sống và phát triển, tế bào VSV thường xuyên hấp thụ thức ăn từ môi trường xung quanh và thải ra ngoài các sản phẩm trao đổi

Split Unregistered Version - http://www.simpopdf.com
chất của tế bào. Màng tế bào chất có khả năng điều chỉnh sự ra vào của các chất khác nhau. VSV có khả năng nhận và thải các chất một cách chọn lọc. Các chất qua lại màng tế bào chất theo một trong hai cơ chế sau :

1.6.1. Khuếch tán thụ động

Theo cơ chế khuếch tán thụ động, thì các chất được đi qua màng tế bào chất nhờ sự chênh lệch nồng độ đối với các chất không điện phân hoặc sự chênh lệch điện thế đối với các ion giữa hai phía của màng. Sự vận chuyển này không đòi hỏi bất kì một sự chi phí năng lượng nào của tế bào VSV. Người ta thấy có rất ít chất qua màng tế bào theo cơ chế khuếch tán thụ động này, chỉ có H_2O, CO_2 và một số ít axit béo.

1.6.2. Cơ chế vận chuyển tích cực

Theo cơ chế vận chuyển tích cực, các chất muốn qua lại được màng tế bào chất cần phải liên kết với phân tử vận chuyển đặc biệt nằm trong màng. Phân tử này có tên gọi là pecmeaza (protein thấm) hay men cảm ứng chọn lọc. Người ta đã chứng minh được rằng, tế bào VSV có khả năng tổng hợp một số lượng lớn các pecmeaza ứng với nhiều loại hidrat cacbon hay hợp chất axit amin.

Việc vận chuyển nhờ pecmeaza có thể là thụ động (không tiêu tốn năng lượng của tế bào) hoặc có thể là chủ động (cần tiêu tốn năng lượng của tế bào).

- Cơ chế vận chuyển tích cực thụ động hay còn gọi là xuôi dòng :

Theo cơ chế này, các chất khi đã liên kết được với men cảm ứng chọn lọc (pecmeaza) phải có sự chêch lệch nồng độ đối với các chất không điện phân, hoặc sự chênh lệch điện thế đối với các ion giữa hai phía của màng, thì thấm qua được màng tế bào chất.

- Cơ chế vận chuyển tích cực chủ động hay còn gọi là ngược dòng :

Theo cơ chế này, các chất khi đã liên kết được với men cảm ứng chọn lọc (pecmeaza), mặc dù đã có sự chêch lệch nồng độ, nhưng vẫn không qua được màng tế bào, khi đó tế bào buộc phải tiêu tốn một số năng lượng nhất định để chuyển các chất này vào trong tế bào. Năng lượng này được lấy ở ATP (kho dự trữ năng lượng của tế bào VSV).

II - HÔ HẤP VÀ QUÁ TRÌNH LÊN MEN

2.1. Hô hấp ở vi sinh vật

Tuỳ từng chủng, giống VSV khác nhau mà oxi hóa, phân huỷ các hợp chất khác nhau thu được năng lượng khác nhau. Đối với VSV hảo khí, chúng sử dụng oxi của không khí để oxi hóa các hợp chất hữu cơ và vô cơ

olit Unregistered Version - http://www.simpopdf.com
giải phóng năng lượng. Sự oxi hóa trong điều kiện hảo khí thực chất là quá trình vận chuyển hidro từ cơ chất đến vật tiếp nhận cuối cùng là oxi, thông qua cả một chặng đường nhờ hệ thống vận chuyển xitocrom (cytochrome). H^+ được vận chuyển đến O^- để tạo thành H_2O và giải phóng năng lượng, phục vụ cho hoạt động sống của VSV.

Đối với chủng giống VSV yếm khí, quá trình oxi hóa sinh năng lượng không kèm theo việc liên kết với oxi của không khí. Trong điều kiện yếm khí, nếu là hợp chất hữu cơ, thì chất hữu cơ vừa làm nhiệm vụ chất nhận vừa làm nhiệm vụ chất cho electron. Kết quả một phần cơ chất bị khử và một phần khác bị oxi hóa.

2.1.1. Cơ chế của hô hấp hảo khí ở vi sinh vật

Hô hấp hảo khí ⟶ O_2, H_2O

$$N_2 + 8H^+ + 8\,e^- + 16\ MgATP + 16\ O \rightarrow 2NH_3 + 16\ ADP + 16P + Q$$

VSV hô hấp hảo khí : *Azotobacter, Rhizobium, Micrococcus v.v...*

2.1.2. Cơ chế của hô hấp yếm khí ở vi sinh vật

Lên men ⟶ chất hữu cơ; chất hữu cơ khác chưa bão hòa

$$C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2C_2H_5OH + 2CO_2 + Q$$

$$2C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2CH_3CHOHCOOH + 3CH_3COOH + Q$$

$$2C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2CH_3CH_2CH_2COOH + 4CO_2 + Q$$

VSV : *Saccaromyces, Lactobacillus, Streptobacterium, Streptococcus v.v...*

Hô hấp nitrat ⟶ NO_3^-, $N_2\uparrow$

$$HNO_3 \rightarrow HNO_2 \rightarrow HNO \rightarrow N_2O \rightarrow N_2\uparrow$$

VSV : *Nitrosomonas, Nitrobacter, Thiobacillus denitrificans v.v...*

Hô hấp sulphat ⟶ SO_4^-, $H_2S\uparrow$

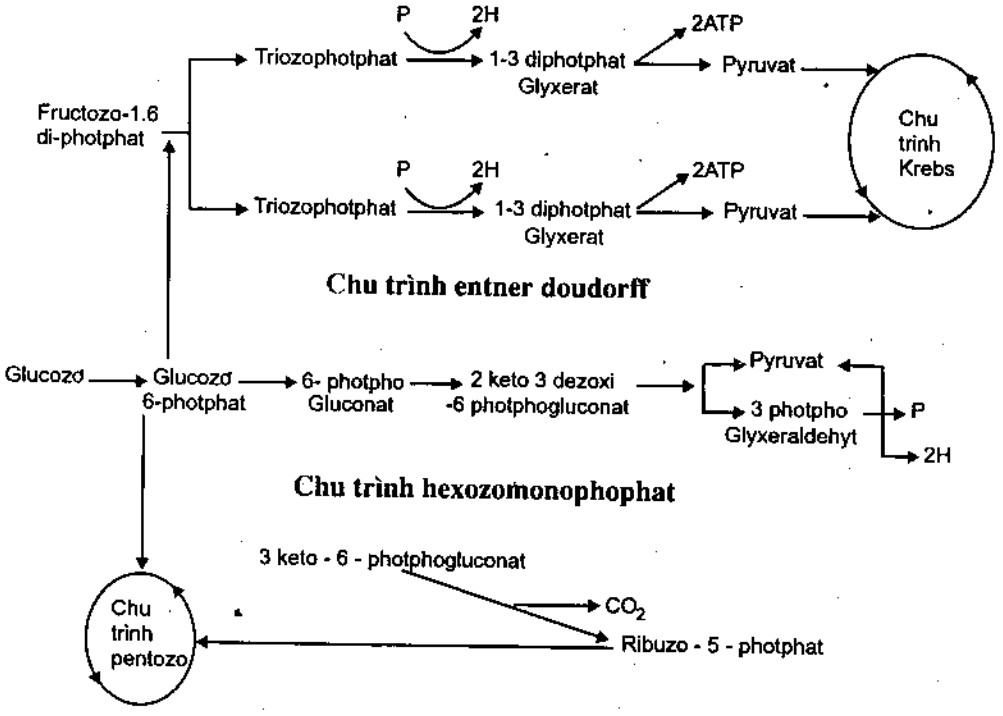
$$C_6H_{12}O_6 + 3H_2SO_4 \rightarrow 3H_2S + 6CO_2 + 6H_2O + Q$$

VSV : *Vibrio denitrificans, Chlorobium, Spirillum denitrificans v.v...*

Split Unregistered Version - http://www.simpopdf.com

III - QUÁ TRÌNH LÊN MEN

Chu trình embden - meyerhf parnas



Hình 4.5. Sơ đồ các chu trình lên men

3.1. Quá trình lên men Etilic (ethilique)

3.1.1. Định nghĩa

Dưới tác dụng của một số loại VSV trong điều kiện yếm khí, đường glucozơ chuyển hóa thành rượu etilic và CO_2 đồng thời giải phóng năng lượng. Quá trình này gọi là quá trình lên men rượu etilic hay còn gọi là quá trình lên men rượu.

3.1.2. Vi sinh vật chủ yếu

Saccaromyces cerevisiae, Sac. vinii, Sac. uvarum v.v...

Trong công nghiệp bia người ta thường sử dụng loài *Sac. bergensis.*

Rượu rum thường được lên men nhờ nấm men thuộc giống *Sac. schizo v.v...*

3.1.3. Cơ chế

$$C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2C_2H_5OH + 2CO_2 + Q$$

Split Unregistered Version - http://www.simpopdf.com

3.1.4. Điều kiện môi trường lên men

Nếu cơ chất là các sản phẩm phức tạp khác như tinh bột, xenlulo thì quá trình sẽ có hai giai đoạn. Giai đoạn đầu các hợp chất hữu cơ phức tạp này bị các loại VSV khác phân giải thành các dung dịch đường, sau đó dưới tác dụng của nấm men mới biến thành rượu.

- pH = 4 - 6 (môi trường chua). Nếu pH = 8, thì ngoài rượu còn thu được axit axetic hoặc một số axit hữu cơ khác.

- Nhiệt độ 3 - 45^{0}C. Nếu dưới 10^{0}C gọi là lên men lạnh, trên 10^{0}C gọi là lên men nóng.

3.1.5. Ứng dụng quá trình lên men rượu

Sản xuất rượu, bia, các loại nước giải khát, lên men làm nở bột mì, Sản xuất glixerin, ủ men thức ăn gia súc v.v...

3.2. Lên men lactic

3.2.1. Định nghĩa

Quá trình chuyển hóa từ đường glucozơ dưới tác dụng của VSV trong điều kiện yếm khí thành axit lactic và một số axit hữu cơ khác và giải phóng năng lượng, được gọi là lên men lactic.

3.2.2. Cơ chế

Có hai quá trình lên men lactic khác nhau là : lên men lactic đồng hình và lên men lactic dị hình.

- Trong quá trình lên men lactic đồng hình, glucozơ sẽ được chuyển hoá theo chu trình Emden-Meyerhof để tạo thành axit pyruvic và NAD-H^+. Axit pyruvic sẽ tiếp tục khử thành axit lactic :

$$C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2CH_3COCOOH + 4H$$

$$2CH_3COCOOH + 4H \rightarrow 2CH_3CHOHCOOH + Q$$

- Trong quá trình lên men lactic dị hình, ngoài axit lactic còn tạo thành các sản phẩm khác như axit axetic, CO_2, etanol, glixerin.

$$2C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2CH_3CHOHCOOH + CH_3\,COOH + CH_3CH_2OH + 2CO_2$$

Lên men lactic đồng hình được thực hiện bởi nhóm vi khuẩn : *Lactobacterium, Thermobacterium, Streptobacterium và Streptococcus.*

Vi khuẩn lên men lactic dị hình thuộc họ *Streptococcaceae, Lactobacillaccae*. Vi khuẩn lactic thuộc giống *Lactobacillus*, chúng đều là vi khuẩn không sinh bào tử, gram dương (trừ loài *Lactobacillus inulinus*), thường không di động. Khác với các vi khuẩn thuộc họ *Enterobacteraceae* (cũng có khả năng sản sinh axit lactic), *Lactobacillus*

Split Unregistered Version - http://www.simpopdf.com
không chứa các loại hemoprotein (như xitocrom catalaza), chúng thuộc loại yếm khí hoặc vi hảo khí (*Microaerophil*).

3.2.3. Điều kiện lên men lactic

Vi khuẩn lactic thường ở nhiệt độ cao thì phát triển tốt. Tuỳ loại, yêu cầu nhiệt độ có khác nhau nhưng để thuận lợi cho quá trình lên men, nhiệt độ thường từ 20^0C đến 45^0C, pH = 4 - 8. Vi khuẩn lactic thường ít gặp trong đất và trong nước. Chúng thường phát triển ở những nơi có chứa nhiều chất hữu cơ phức tạp, như trên xác thực vật, sữa...

3.2.4. Ứng dụng

Sản xuất axit lactic, chế biến sữa chua, ủ thức ăn cho gia súc.

3.3. Lên men butiric

3.3.1. Định nghĩa

Trong tự nhiên, đường glucozơ dưới tác dụng của một số VSV yếm khí được chuyển hoá để cho axit butiric, gọi là quá trình lên men butiric.

3.3.2. Cơ chế

$$2C_6H_{12}O_6 \xrightarrow{\text{Yếm khí}} 3CH_3CH_2CH_2COOH + CO_2 \ldots\ldots + Q$$

3.3.3. Vi sinh vật lên men butiric

Chủ yếu thuộc giống *Clostridium*. Đây là loại vi khuẩn gram dương, chu mao, di động, sinh bào tử. Bào tử thường có kích thước lớn hơn chiều ngang của tế bào. Do đó khi mang bào tử, cơ thể thường có hình thoi hay hình dùi trống. Phần lớn các loài *Clostrium butiriccum, Cl. pasteurianum, Cl. lactoacetophilum* đòi hỏi cao đối với điều kiện yếm khí, trừ một số loài như *Cl.pectinovorum, Cl.histoliticum.*

3.3.4. Ứng dụng

Vi khuẩn lên men butiric tham gia tích cực vào quá trình phân giải các xác hữu cơ trong tự nhiên. Nhưng nếu quá trình này quá mạnh thì lượng axit butiric tích luỹ lại trong đất sẽ có ảnh hưởng bất lợi đối với sự phát triển của cây trồng. Quá trình lên men butiric cũng gây ảnh hưởng xấu trong quá trình bảo quản hoa quả, thực phẩm và các quá trình muối dưa, ủ chua thức ăn trong chăn nuôi.

Một số loài *Clostridium* được ứng dụng trong công nghiệp để sản xuất các loại hóa chất quan trọng như : axetôn, butanol, axit butiric, izopropanol...

3.4. Lên men propionic

3.4.1. Định nghĩa

Quá trình chuyển hóa từ đường glucozơ trong điều kiện yếm khí thành axit propionic, axit axetic, CO_2 dưới tác dụng của một số chủng VSV.

Split Unregistered Version - http://www.simpopdf.com

3.4.2. Cơ chế lên men propionic

$$2C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2CH_3CH_2COOH + 2CH_3COOH + 2CO_2 + 2H_2O + Q$$

3.4.3. Vi sinh vật

Các vi khuẩn thực hiện quá trình lên men propionic được gọi là vi khuẩn propionic. Chúng thuộc giống *Propioni bacterium*. Đó là những vi khuẩn gram dương, yếm khí, không di động, không sinh bào tử.

Vi khuẩn propionic phân bố rộng rãi trong tự nhiên. Người ta thường gặp chúng trong dạ dày cỏ và trong đường tiêu hoá các loại động vật nhai lại.

3.4.4. Ứng dụng

Vi khuẩn propionic đóng vai trò quan trọng trong việc chế tạo phomat.

3.5. Lên men mêtan

3.5.1. Định nghĩa

Dưới tác dụng của một số VSV, một số hợp chất hữu cơ sẽ bị chuyển hoá để cho khí CH_4, gọi là quá trình lên men mêtan.

3.5.2. Cơ chế

Quá trình này có thể chia làm hai giai đoạn. Giai đoạn đầu là giai đoạn phân giải các hợp chất hữu cơ phức tạp thành các axit hữu cơ, axit béo, rượu, CO_2.

Giai đoạn hai là giai đoạn chuyển hoá rượu, CO_2 thành CH_4.

$$CH_3COOH \rightarrow CH_4 + CO_2$$

$$4CH_3OH \rightarrow 3CH_4 + CO_2 + 2H_2O$$

$$2CH_3CH_2OH + CO_2 \rightarrow 2CH_3COOH + CH_4$$

$$2C_5H_7CH_2OH + CO_2 \rightarrow C_3H_7COOH + CH_4$$

Hai quá trình này đều do Stadman và Barket chứng minh năm 1949. Mêtan còn có thể được hình thành do khử CO_2 của *Methanobacterium* (một hỗn hợp chung mà trước đây thường gọi là *Methanobacterium omelianskii*). Trong trường hợp này chất cho hidro là H_2.

$$CO_2 + 4H_2 \rightarrow CH_4 + 2H_2O$$

Như vậy, sự hình thành CH_4 theo nhiều đường hướng khác nhau.

3.5.3. Vi sinh vật lên men mêtan

VSV phân giải xenlulo.VSV phân giải pectin. VSV phân giải protein. VSV phân giải lipit. VSV phân giải các hidrat cacbon khác.

Từ những sản phẩm của các loại VSV này, một số VSV như *Methanobacterium sochngeni, Saricina methanica, Micrococcusnazei*... có thể chuyển hóa thành CH_4. VSV lên men mêtan là VSV tuyệt đối yếm

Split Unregistered Version - http://www.simpopdf.com
khí, ưa nhiệt độ trung bình, một số thích nhiệt độ cao, pH trung tính hoặc hơi kiềm, cơ chất có thể là hợp chất hữu cơ.

3.5.4. Ứng dụng

Điều chế khí mêtan làm khí đốt. Vi khuẩn lên men mêtan có khả năng tích luỹ khá nhiều vitamin B_{12}.

Do đó người ta đã sử dụng bã rượu hay bùn ao nuôi cấy các vi khuẩn này để sản xuất vitamin B_{12} thô dùng trong chăn nuôi.

IV - SINH TRƯỞNG, PHÁT TRIỂN CỦA VI KHUẨN

4.1. Khái niệm

4.1.1. Sinh trưởng

Chỉ sự tăng về kích thước tế bào, là biểu hiện của sự tăng trưởng có quy tắc của tất cả các thành phần tổ hợp vật chất tế bào.

4.1.2. Phát triển (hoặc sinh sản)

Chỉ sự tăng về số lượng của tế bào.

Sinh trưởng và phát triển của VSV phụ thuộc vào : Chất và lượng dinh dưỡng cung cấp ; Các yếu tố ngoại cảnh có quan hệ đến quá trình đồng hoá và dị hoá của VSV như : pH, nhiệt độ, độ ẩm, áp suất v.v...

Do đó trong thực tế, sinh trưởng (tăng về khối lượng) tế bào không phải bao giờ cũng diễn ra song song với sự tăng về số lượng tế bào. Ví dụ : giai đoạn đầu lượng sinh khối tế bào tăng nhưng số lượng tế bào không thay đổi. Ở pha tàn, số lượng tế bào không giảm, nhưng kích thước tế bào nhỏ đi.

4.2. Lí thuyết về sinh trưởng, phát triển của vi khuẩn

4.2.1. Tính số lượng tế bào vi khuẩn sau số lần phân chia thế hệ n

Ví dụ trong một môi trường dinh dưỡng, ta cấy vào một tế bào vi khuẩn. Nếu thành phần môi trường hoàn toàn phù hợp với nhu cầu của tế bào, vi khuẩn sẽ sinh trưởng, tăng kích thước và khối lượng, tổng hợp các thành phần tế bào cho đến khi kích thước tăng gấp đôi. Rồi vi khuẩn phân chia cho 2 tế bào. Hai tế bào này lại tiếp tục sinh trưởng và phân chia để cho 4, 8, rồi 16 tế bào.

Số lần phân chia (thế hệ) : 0 ; 1 ; 2 ; 3 ; 4..... ; n

Số tế bào : $1 = 2^0$; $2 = 2^1$; $4 = 2^2$; $8 = 2^3$; $16 = 2^4$ .....2^n

Nếu số tế bào ban đầu không phải là 1 mà là N_0 thì sau n lần phân chia ta sẽ có số tế bào là :

$$N = N_0 2^n. \qquad (1)$$

Split Unregistered Version - http://www.simpopdf.com

Các giá trị N và N_0 có thể xác định nhờ phòng đếm hoặc tính số lượng khuẩn lạc trên môi trường đặc. Còn giá trị n (số thế hệ) có thể tính nhờ lôgarit thập phân :

$$\log N = \log N_0 + n\log 2$$

Từ đó : $$\Rightarrow n = \frac{1}{\log 2}(\log N - \log N_0) \qquad (2)$$

4.2.2. Tính thời gian thế hệ g

Ví dụ, vi khuẩn phân chia n lần sau thời gian t, khoảng thời gian giữa hai lần phân chia liên tiếp (hoặc thời gian cho việc tăng đôi số tế bào) gọi là thời gian thế hệ và biểu thị bằng công thức sau :

$$g = \frac{t}{n} = \log 2 \frac{t_2 - t_1}{\log N - \log N_0} \qquad (3)$$

Ở đây t_2 - t_1 biểu thị sự sai khác giữa thời gian đầu (t_1) và thời gian cuối (t_2) tính bằng giờ, trong đó N, N_0 được xác định.

4.2.3. Hằng số tốc độ phân chia C

Giá trị đảo nghịch của thời gian thế hệ hay số lần phân chia sau một đơn vị thời gian (tức 1 giờ) gọi là hằng số tốc độ phân chia C :

$$C = \frac{1}{g} = \frac{n}{t} = \frac{1}{\log_2} \cdot \frac{\log N - \log No}{t_2 - t_1} \qquad (4)$$

Thời gian thế hệ càng ngắn, vi khuẩn sinh trưởng và sinh sản càng nhanh.

$$\text{Vì : } C = \frac{n}{t} \quad \text{nên } n = Ct. \qquad (5)$$

Thay giá trị n vào phương trình (1) ta có :

$$N = N_0.2^{ct}$$

Hằng số tốc độ phân chia C phụ thuộc vào một số điều kiện :

Loài vi khuẩn ; Nhiệt độ nuôi cấy ; Môi trường nuôi cấy.

4.3. Biểu đồ sinh trưởng của vi khuẩn

Một số tế bào vi khuẩn nếu được cấy vào môi trường thích hợp sẽ có thời gian thế hệ là 30 phút. Tế bào có khối lượng khô khoảng $2{,}5.10^{-13}$g và thể tích khoảng $10^{-12}cm^3$, nếu có thời gian thế hệ là 30 phút thì 48 giờ đã có một quần thể vi khuẩn chừng 10^{29} tế bào với khối lượng khô chừng 10^{10} tấn và thể tích $10^{11}m^3$. Sự bất hạnh này không thể xảy ra được vì sinh trưởng, phát triển của VSV luôn luôn nằm trong hệ số đúng. Nghĩa là : *Đồ thị biểu diễn sự phụ thuộc logarit của số lượng tế bào theo thời gian gọi là đường cong sinh trưởng*. Gồm 4 pha chủ yếu sau :

Split Unregistered Version - http://www.simpopdf.com
Pha mở đầu, pha luỹ thừa, pha ổn định và pha tử vong.

4.3.1. Pha mở đầu

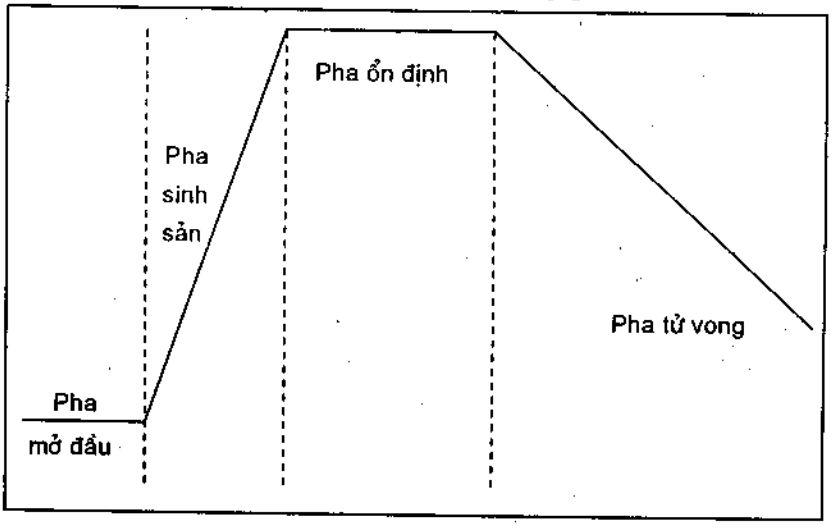
Pha này tính từ lúc bắt đầu cấy đến khi vi khuẩn đạt được tốc độ sinh trưởng cực đại. Trong này vi khuẩn chưa phân chia, nhưng thể tích và khối lượng tế bào tăng lên rõ rệt. Thời gian của pha này phụ thuộc vào tuổi của ống giống và thành phần môi trường.

4.3.2. Pha sinh sản

Trong pha này, vi khuẩn sinh trưởng, phát triển theo luỹ thừa. Nếu số tế bào ban đầu là N_0 thì sau n lần phân chia, sẽ có số tế bào tổng cộng là $N = N_0 .2^n$, hay $N = N_0 . 2^{ct}$.

4.3.3. Pha ổn định

Trong pha này, số lượng tế bào mới sinh ra bằng số tế bào cũ chết đi. Số tế bào và cả sinh khối không tăng, cũng không giảm.



***Hình 4.6.** Sơ đồ sinh trưởng, phát triển của vi khuẩn*

4.3.4. Pha tử vong

Trong pha này, số lượng tế bào giảm theo luỹ thừa, mặc dù số lượng tế bào tổng cộng có thể không giảm. Nguyên nhân của pha tử vong rất phức tạp. Tuy nhiên có thể nêu ra đây một số nguyên nhân thường gặp : Điều kiện ngoại cảnh bất lợi của môi trường ; Sự tự phân huỷ của tế bào vi khuẩn. Nhưng chủ yếu vẫn phải tuân theo quy luật của sự sống.

4.4. Ứng dụng sinh trưởng, phát triển của vi khuẩn

Nghiên cứu quá trình sinh trưởng, phát triển của vi khuẩn, giúp chúng ta có cơ sở lí luận để vận dụng vào thực tiễn.

Split Unregistered Version - http://www.simpopdf.com

Trong hoạt động sống, để thích ứng với môi trường mới, vi khuẩn thường sản sinh ra một số enzym (men) mới. Thời gian thích ứng này nhanh hay chậm và vi khuẩn này có phát triển được hay không tuỳ thuộc một phần ở bản thân vi khuẩn và một phần khác phụ thuộc điều kiện môi trường nuôi cấy, cũng như các yếu tố ngoại cảnh khác. Dựa vào quá trình này để chữa bệnh cho người, gia súc, cây trồng. Người ta thường khống chế sự phát triển của vi khuẩn gây hại ngay từ khi vi khuẩn mới xâm nhập vào cơ thể. Ngược lại, nếu là vi khuẩn có lợi, thì có phương pháp tác động rút ngắn pha mở đầu, tạo điều kiện cho vi khuẩn sinh trưởng và phát triển nhanh.

Ở pha sinh sản, vi khuẩn sinh trưởng, phát triển rất nhanh, ở pha này hình thái và các đặc tính sinh lí của vi khuẩn thể hiện điển hình nhất. Nên người ta thường chú ý đến công tác cấy truyền giống và bảo quản giống ở giai đoạn này. Trong pha này quá trình trao đổi chất mạnh, sinh khối vi khuẩn và các sản phẩm của hoạt động vi khuẩn tích luỹ nhiều. Trong quá trình lên men, người ta sẽ thu sinh khối cao nhất ở pha này. Khi sản xuất đối với vi khuẩn có lợi, người ta thường tạo điều kiện cho pha này tiến hành thuận lợi. Ngược lại đối với vi khuẩn có hại, thì chẳng những phải ức chế ngay từ pha tiềm tàng, mà phải tuyệt đối không cho chúng có điều kiện đi vào pha sinh sản.

Sau pha ổn định là pha tử vong : Ở pha này, vì môi trường dinh dưỡng thường đã cạn, vi khuẩn không sinh trưởng, phát triển bình thường. Nếu tình trạng này kéo dài sẽ có hại cho vi khuẩn. Do đó để sinh trưởng, phát triển bình thường trở lại, phải cấy truyền vào môi trường dinh dưỡng mới.

Trong pha tử vong, số tế bào sống giảm nhanh, số lượng bào tử (đối với vi khuẩn có sinh bào tử) hình thành ngày càng nhiều. Ở giai đoạn bào tử, vi khuẩn không hoạt động hay nếu có cũng ở mức độ không đáng kể. Lợi dụng đặc tính này, người ta đã sản xuất những chế phẩm sinh học quý (ví dụ chế phẩm diệt sâu hại) có thể dễ dàng bảo quản và bảo quản trong thời gian dài.

HƯỚNG DẪN ÔN TẬP

1. Các kiểu dinh dưỡng của VSV (dinh dưỡng quang năng, hoá năng, các bon, nitơ, dinh dưỡng khoáng).
2. Cơ chế vận chuyển thức ăn vào tế bào VSV.
3. Hô hấp của VSV có mấy loại cơ chế của từng loại.
4. Các quá trình lên men (etilic, lactic,butiric, propionic, mêtan).
5. Thuyết sinh trưởng, phát triển của VSV (cách tính số lượng tế bào VSV ở thế hệ n ? thời gian thế hệ ? hằng số tốc độ phân li ? biểu đồ sinh trưởng và ứng dụng thuyết sinh trưởng phát triển ?).

Split Unregistered Version - http://www.simpopdf.com

Chương 5

DI TRUYỀN VI SINH VẬT

I - NHỮNG ĐẶC ĐIỂM VÀ NHÂN TỐ DI TRUYỀN CỦA VI KHUẨN

1.1. Đặc điểm di truyền vi khuẩn

- Vi khuẩn có cấu tạo đơn giản cho nên di truyền của nó ít nhiều có khác với sinh vật bậc cao.

- Từ di truyền vi khuẩn (cơ thể bậc thấp) đến di truyền các sinh vật bậc cao cho ta thấy sự tiến hoá về di truyền của sinh vật.

- Tế bào vi khuẩn đơn bội một hệ gen, sinh sản rất nhanh, do đó nghiên cứu di truyền vi khuẩn ta có thể biết được kết quả một cách nhanh chóng.

- Vi khuẩn cũng như sinh vật bậc cao, các phân tử mang thông tin di truyền chứa trong một vùng xác định của tế bào, không phân bố một cách ngẫu nhiên mà theo một trình tự mạch thẳng và ở dạng đó chúng được truyền từ tế bào nọ sang tế bào kia trong khi tiếp hợp. Vi khuẩn chưa có nhiễm sắc thể thực sự như những vi sinh vật bậc cao.

Nghiên cứu di truyền vi khuẩn chúng ta cũng gặp phải những khó khăn, chủ yếu là do kích thước nhỏ bé của chúng, nhiều cấu trúc tế bào gần như ra ngoài phạm vi khả năng phân biệt của máy móc và có thể còn do cấu tạo giản đơn của những phần tử cấu trúc chứa đựng các phân tử mang thông tin.

1.2. Nhân tố di truyền của vi khuẩn

- Nhân tế bào vi khuẩn chứa yếu tố cấu trúc duy nhất là ADN, có khối lượng từ 2% đến 4% khối lượng khô của vi khuẩn.

Vai trò chủ yếu của nhân vi khuẩn là chuyển thông tin di truyền mà nó chứa và tham gia vào sự phân chia của tế bào bằng cách khởi phát quá trình này. Nó cũng là cái khung của những đột biến hoặc biến dị di truyền học.

Hơn nữa trước những điều kiện không thuận lợi cho vi khuẩn, nhân là khởi điểm của sự xuất hiện những dạng không bình thường của vi khuẩn.

- Vậy nhân tố di truyền ở vi khuẩn cũng như ở các sinh vật khác là axit nucleic (ADN và ARN).

+ Nguyên liệu di truyền sơ cấp mà từ đó trực tiếp cấu tạo nên các nhiễm sắc thể và các gen cũng như các plasmit vi khuẩn và nhiều virus của vi khuẩn (phage) là ADN.

Split Unregistered Version - http://www.simpopdf.com

+ ARN là nguyên liệu di truyền thứ cấp và tham gia vào quá trình phiên mã thông tin di truyền. Sự tham gia của ARN trong các giai đoạn khác nhau của quá trình truyền thông tin di truyền được xác định nhờ sự tồn tại của axit nucleic này dưới dạng : ARN thông tin hay ARN khuôn (ARN- t) ; ARN vận chuyển (ARN- v) và ARN ribôxôm (ARN - r).

+ Cấu trúc hiện đại bậc 2 của ADN được phản ánh trong mô hình của Watson và Crick (1953). ADN có 3 kiểu sao chép lại :

* Sao chép theo kiểu bảo toàn (conservative).
* Sao chép theo kiểu nửa bảo toàn (halfconservative).
* Sao chép theo kiểu phân tán (disperse).

II - CƠ CHẾ CHUYỂN NGUYÊN LIỆU DI TRUYỀN Ở VI KHUẨN

Hiện nay có 3 con đường cơ bản truyền nguyên liệu di truyền đã được biết ở vi khuẩn, đó là các quá trình biến nạp, tiếp hợp và tải nạp.

2.1. Biến nạp (transformation)

2.1.1. Định nghĩa

Biến nạp là sự biến đổi genotip của vi khuẩn thể nhận dưới ảnh hưởng của ADN nhận được từ vi khuẩn cho. ADN dưới thể dung dịch do một vi khuẩn thể cho giải phóng ra, được truyền đi không có sự can thiệp của một nhân tố cấu trúc nhiễm sắc thể hoặc epixôm, hoặc của phagiơ vi khuẩn vectơ. Như thế một nòi vi khuẩn bị biến đổi về mặt di truyền do tiếp thu axit nucleic của vi khuẩn thuộc nòi khác.

2.1.2. Những thí nghiệm của Grifith về sự biến nạp

- Đối tượng nghiên cứu của ông là vi khuẩn : *Diplococcus pneumoniae*, là một song cầu khuẩn Gram dương có giáp mô gây bệnh viêm phổi. Khả năng gây bệnh của vi khuẩn này phụ thuộc vào vỏ nhày. Phế cầu khuẩn tồn tại dưới hai kiểu hình là : dạng bóng láng (S) và dạng nhám (R) khi nuôi cấy trên môi trường đặc.

- Những tế bào S (nòi dại) có độc hại được bao bọc bằng lớp giáp mô cấu tạo bằng polisaccarit, hình thành những khuẩn lạc bóng láng (S = smooth). Những tế bào không độc không có giáp mô, hình thành những khuẩn lạc nhám (R = rough). Có rất nhiều típ vi khuẩn S (S_{II}, S_{III} ...) khác nhau do tính chất hoá học của giáp mô. Vi khuẩn nhân lên bằng sinh dưỡng và bảo tồn những tính đặc hiệu trong rất nhiều thế hệ.

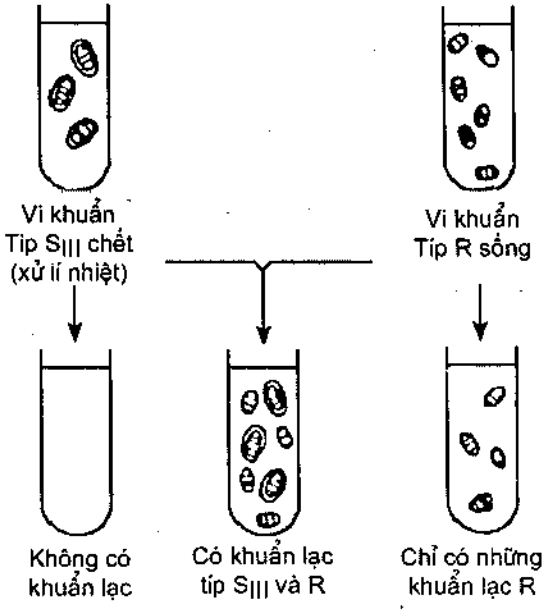
- Trong những thí nghiệm của mình Giffith đã dùng những vi khuẩn S và R. Ông đã tiêm cho mỗi chuột nhắt một lượng nhỏ phế cầu khuẩn R nghĩa là không độc, cũng đồng thời ông tiêm cho chuột này một lượng lớn vi khuẩn tip S_{III} đã bị giết chết bằng nhiệt. Một sự bất ngờ xảy ra cho ông là phần lớn chuột bị chết do viêm phổi. Nghiên cứu máu của những

Split Unregistered Version - http://www.simpopdf.com

con chuột này thấy không những có vi khuẩn R mà cũng có nhiều vi khuẩn S sống, có giáp mô, có độc lực và thuộc tip S_{III}.

Nhiều nhà nghiên cứu sau đó đã xác minh những kết quả của Grifith. Quan trọng nhất là sự biến nạp invitro (trong ống nghiệm) của những tế bào R thành S.

Người ta nuôi cấy những tế bào R trong một ống chứa tế bào S của típ nhất định bị giết bằng nhiệt. Sau đấy trong canh khuẩn người ta tìm thấy những tế bào S sống cùng típ với những tế bào chết cho vào lúc đầu, như vậy là, một chất chứa trong những tế bào S chết có khả năng làm biến đổi những thể năng di truyền của những tế bào R. Người ta gọi chất này là nhân tố biến nạp.

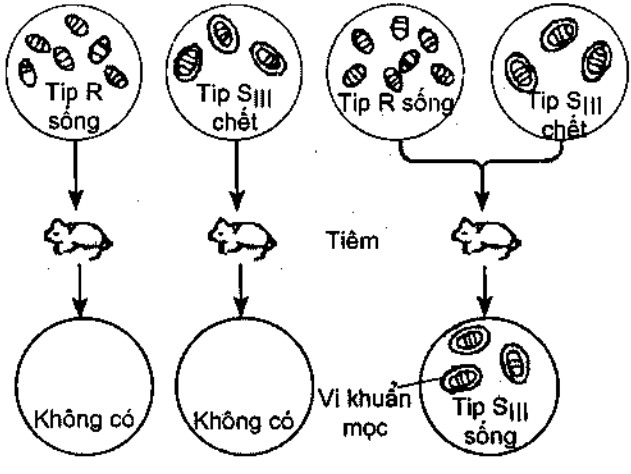


Hình 5.1. Sơ đồ thí nghiệm biến nạp invivo của phế cầu khuẩn trên chuột nhắt (theo Surtton 1961)

2.1.3. Bản chất của nhân tố biến nạp

Avery Macleot và Maccathi (1944) đã chứng minh rằng nhân tố biến nạp chính là axit dezoxiribonucleic (ADN).

Người ta dùng chất tinh chế từ ADN của những vi khuẩn típ S_{III} cho tác động đến những vi khuẩn R thấy một số ít vi khuẩn R biến thành vi khuẩn típ S_{III}. Nếu cho những vi khuẩn típ S_{III} vào những tế bào xử lí bằng dezoxyribonucleaza (enzim làm tan rã ADN) thì không thấy hiện tượng biến nạp.



Hình 5.2. Thí nghiệm về sự biến nạp của phế cầu khuẩn dùng ADN chiết ra từ những tế bào bóng láng S bị giết bằng nhiệt

Split Unregistered Version - http://www.simpopdf.com

Như vậy ADN là vật chất di truyền có hoạt động đặc hiệu. Chỉ cần một nồng độ cực kì nhỏ (vài milimicrogam/ml) của ADN tinh khiết để tiến hành sự biến nạp. Người ta chứng minh rằng số lượng vi khuẩn thể biến nạp tỉ lệ thuận với nồng độ của ADN cho đến khi có một nồng độ bão hoà. Người ta có thể chuẩn độ ADN biến nạp.

Trong những canh khuẩn chứa vi khuẩn biến nạp, hoạt động biến nạp tăng với lượng ADN tổng hợp trong quá trình sinh trưởng. Như thế những canh khuẩn này tổng hợp ADN biến nạp, ADN của vi khuẩn là chất được biến nạp trước tiên :

$$R + ADN\ S_{III} \rightarrow S_{III}\ \text{biến nạp}$$

Như thế ADN có đặc tính di truyền, đó là nguyên liệu vectơ của những tính trạng di truyền. Cấu trúc thứ cấp của ADN cho thấy rõ tính đặc hiệu di truyền này ở trình tự các bazơ bố trí theo chiều dài của mạch ADN.

2.1.4. Điều kiện cần thiết cho biến nạp

- Chất hoạt hoá cảm ứng sinh lí.

- Kích thước và số lượng ADN : nếu phân tử lượng của ADN biến nạp giảm thì hoạt tính của nó cũng giảm. Nếu làm giảm khả năng thấm của ADN vào tế bào thì cũng làm mất hoạt tính biến nạp của nó.

- Số lượng tính trạng được truyền đi tuỳ thuộc vào sự bố trí của gen tương đương trên nhiễm sắc thể. Mỗi mảnh ADN có phân tử lượng 1×10^7 chứa vài chục gen khác nhau và vi khuẩn chứa vài nghìn gen.

- Thành phần của môi trường cũng ảnh hưởng đến tần số của biến nạp. Ví dụ anbumin và phốt phát trong môi trường làm tăng tần số biến nạp, trái lại cazein làm giảm tần số này.

- Nhiệt độ của môi trường trong biến nạp cũng ảnh hưởng đến tần số biến nạp. Nhiệt độ thích hợp là từ 29^0C đến 32^0C.

2.1.5. Các giai đoạn của quá trình biến nạp

Sự thâm nhập của mạch ADN ngoại lai vào hệ gen của vi khuẩn tiến hành ngay trong vài phút (độ 3 – 6 phút). Sự tái tổ hợp tiến hành, sau khi hệ gen của vi khuẩn bị đứt, hai ADN kết hợp lại với sự tham gia của một enzym thuỷ phân những mạch nối photpho dieste trên hai mạch.

Sự phân tách các phần tử nhân biến nạp tiến hành qua các thế hệ liên tục, thường qua hai thế hệ vi khuẩn chứa 4 nhân.

Sự hình thành phenotip của tính trạng biến nạp đòi hỏi sự tổng hợp những enzym đặc hiệu dưới sự kiểm soát của ADN thâm nhập vào.

Split Unregistered Version - http://www.simpopdf.com

2.1.6. Ứng dụng biến nạp trong nghiên cứu cấu trúc gen

Hiện tượng biến nạp là một phương tiện phân tích di truyền. Nó cho phép định vị trí trên bản đồ di truyền của một nòi vi khuẩn trên những vùng rất nhỏ hoặc của một gen quyết định một tính trạng. Nó cho phép phân tích những đặc tính và chức năng của vi khuẩn không thể nghiên cứu bằng sự tiếp hợp được, phát hiện những gen kiểm soát sự hình thành giáp mô ; sự đề kháng với kháng sinh ; nghiên cứu quá trình nha bào hoá ; đặc tính cố định nitơ phân tử trên những vi khuẩn của *Rhizobium* v.v...

- Hiện tượng biến nạp có một tầm quan trọng to lớn trong sinh học vì nó cho phép xác định rằng sự tổng hợp protein được đặt dưới sự kiểm soát của ADN. Nó mở đường cho di truyền học hoá học. Nó cho thấy rằng khi có một đột biến thì có một biến đổi của ADN.

- Nhờ hiện tượng biến nạp mà người ta nghiên cứu về cấu trúc gen và chúng ta biết được rằng : gen chưa phải là đơn vị nhỏ nhất của vật chất di truyền. Trong gen còn có các locus khác, những locus này đều xác định dấu hiệu mà gen xác định, tuy nó ở vị trí khác nhau của gen. Từng locus này có thể xảy ra tái tổ hợp trong các quá trình biến nạp.

2.2. Tải nạp (Di nạp) –Transduction

2.2.1. Định nghĩa

Tải nạp là sự truyền đi một mảnh nhỏ nguyên liệu di truyền từ một vài vi khuẩn cho, đến một vi khuẩn nhận qua trung gian là một phagiơ vi khuẩn (thực khuẩn thể : *Bacteriophage*), gọi là phagiơ vectơ hoặc phagiơ tải nạp.

2.2.2. Hiện tượng tải nạp và nhân tố tải nạp

- Trong hiện tượng tải nạp, phagiơ của vi khuẩn đóng vai trò vectơ. Nó cùng với ADN của nó (trong đó có mảnh ADN của vi khuẩn cho mà nó đã tiếp nhận trong tế bào vật chủ) vào tế bào vi khuẩn nhận. Do ảnh hưởng của mảnh nhỏ này của hệ gen của vi khuẩn ngoại lai mà có những biến đổi trong những đặc tính di truyền của vi khuẩn nhận.

Hiện tượng tải nạp được Zinder và Lederberg phát hiện năm 1952 trong khi nghiên cứu lai các loài *Salmonella*. Các tác giả đã dùng một ống thuỷ tinh hình chữ U có hai nhánh ngăn cách bởi một miếng lọc bằng thuỷ tinh xốp. Một nhánh cho canh khuẩn nước thịt cấy *Salmonella* (A) vào một nhánh cho canh khuẩn cấy *Salmonella* (B).

Vi khuẩn *Salmonella* (A) không bị đột biến mang kí hiệu 2A, có genotip T^+ (có khả năng tổng hợp triptophan).

Split Unregistered Version - http://www.simpopdf.com

Nòi *Salmonella* (B) đột biến mang kí hiệu 22A, có genotip T⁻ (không có khả năng tổng hợp triptophan).

Sau một thời gian ủ chung, người ta mang nòi 22A có gen genotip T⁻ cấy trên môi trường không có triptophan. Qua thời gian nuôi cấy trong tủ ấm, người ta đã nhận thấy ở các đĩa hộp lồng nuôi cấy nòi 22A đã xuất hiện khuẩn lạc. Như vậy là có một số tế bào của nòi 22A đã mang đặc điểm của nòi 2A. Vậy thì nhân tố gì đã truyền đặc điểm 2A cho 22A ? trong khi chúng không tiếp xúc với nhau (vì đã bị ngăn cách bằng màng thuỷ tinh lọc vi khuẩn).

Người ta giả thiết rằng có thể do đột biến tự nhiên. Nhưng ta thấy đột biến tự nhiên ở vi khuẩn *Salmonella* thường xảy ra với tần số rất thấp (10^{-9}), mà những tế bào có khả năng tổng hợp triptophan ở đây xuất hiện với tần số 10^{-5} (nghĩa là trong 10^5 tế bào thì mới có một tế bào có khả năng tổng hợp triptophan), như vậy không phải là do đột biến.

Người ta giả thiết rằng nhân tố đó là nhân tố biến nạp. Nhưng điều này cũng không đúng vì trong ống chữ U, người ta không tìm thấy một đoạn ADN tự do nào.

Vậy thì phải có một vật trung gian nào đó đã thấm qua màng lọc vi khuẩn mang thông tin di truyền của nòi vi khuẩn này truyền cho nòi vi khuẩn kia. Nhân tố đó chính là nhân tố tải nạp, chính là thực khuẩn thể ôn hoà PTL22 (hay p_{22}) có khả năng làm tan các tế bào nòi 2A. Sau khi lọt qua màng lọc thuỷ tinh, thực khuẩn thể này làm tan các tế bào nòi 2A và giải phóng ra một tác nhân FA, tác nhân đó thấm qua màng lọc. Dưới ảnh hưởng của FA, một số tế bào của nòi 22A nhận được những tính chất di truyền đặc hiệu, đặc trưng cho nòi 2A.

- Cơ chế chung của tải nạp được tóm tắt như sau :

+ Tải nạp là quá trình truyền những đoạn ADN từ tế bào cho sang tế bào nhận nhờ thực khuẩn thể.

+ Thực khuẩn thể và vi khuẩn cho tiếp xúc với nhau, virus phá vỡ màng tế bào và đi vào trong tế bào chất của vi khuẩn cho. Lấy cắp ADN của vi khuẩn cho và chui ra. Đem ADN của vi khuẩn cho đến vi khuẩn nhận.

+ Mỗi loại phagio có đặc hiệu riêng với một loại vi khuẩn.

+ Đoạn ADN của tế bào cho được gắn lên ADN của thực khuẩn thể và đoạn ADN của vi khuẩn cho nằm trên ADN của thực khuẩn thể được gắn lên ADN của vi khuẩn nhận bằng trao đổi chéo.

2.2.3. Ứng dụng của quá trình tải nạp

- Tải nạp đã giúp ích rất nhiều cho việc phân tích bản chất phức tạp của những vùng ADN mà người ta quy ước gọi là gen, tức là những vùng

Split Unregistered Version - http://www.simpopdf.com

riêng biệt kiểm soát một tính trạng (hay nói đúng hơn kiểm soát việc tạo thành một enzym).

- Tải nạp là một phương pháp phân tích di truyền học có hai ưu điểm lớn như sau :

+ Phát hiện được những hiện tượng như tái tổ hợp xảy ra giữa hai thể dị dưỡng không giống hệt nhau, thậm chí trong trường hợp tải nạp được thực hiện với tần số rất thấp.

+ Trong tải nạp ngừng trệ có tính trạng giống như trạng thái dị hợp tử ở sinh vật bậc cao, nghĩa là trong cùng một tế bào có thể có những gen giống hệt nhau mang những biến đổi khác nhau.

2.3. Sự tiếp hợp và tái tổ hợp của vi khuẩn, giới tính của vi khuẩn

2.3.1. Hiện tượng tiếp hợp và tái tổ hợp di truyền

Hiện tượng truyền một phần vật chất di truyền theo một chiều từ một vi khuẩn cho (thể cho là vi khuẩn đực) đến một vi khuẩn nhận (thể nhận là vi khuẩn cái) gọi là hiện tượng tiếp hợp.

2.3.2. Nhân tố giới tính trong tiếp hợp

Người ta nhận thấy rằng tính đực của một vi khuẩn tuỳ thuộc vào một yếu tố độc lập đối với nhiễm sắc thể của vi khuẩn, gọi là yếu tố giới tính F.

Vi khuẩn đực F^+ và vi khuẩn cái F^- :

- Khả năng hoạt động của một vi khuẩn thể cho không tuỳ thuộc vào một hoặc nhiều gen của nhiễm sắc thể mà có liên quan đến sự có mặt trong tế bào một tác nhân "gây nhiễu" gọi là yếu tố giới tính, hoặc yếu tố hữu tính (F). Yếu tố này cấu tạo bởi một phân tử ADN có kích thước gần giống ADN của một phagiơ vi khuẩn, có kích thước trung bình dài bằng 2% chiều dài nhiễm sắc thể của vi khuẩn, nghĩa là tương ứng với số tổ hợp nucleotit có khả năng tự tái tạo.

- Có thể coi yếu tố F là một epixôm vì nó có những tính chất của epixôm, có thể tồn tại trong tế bào tuần tự dưới hai trạng thái khác nhau : hoặc ở trạng thái độc lập trong tế bào chất trong đó nó được sao lại một cách độc lập, hoặc ghép vào nhiễm sắc thể của vi khuẩn như một tiền phagiơ và tự sao lại với nhiễm sắc thể. Yếu tố này không giết chết vi khuẩn vật chủ. Những vi khuẩn đực F^+ chứa yếu tố này. Có thể loại trừ nó bằng cách xử lí với acridin vàng cam và biến vi khuẩn đực thành vi khuẩn cái.

Những vi khuẩn đực có yếu tố F được gọi là F^+. Những vi khuẩn cái trước tiếp hợp không có yếu tố này, gọi là F^-.

- Yếu tố F kích thích sự tiếp hợp, nó hoạt động bằng cách làm biến đổi bề mặt vi khuẩn đực. Nó làm hình thành một kháng nguyên mới và

Split Unregistered Version - http://www.simpopdf.com
biến đổi điện tích của vi khuẩn, tạo điều kiện cho vi khuẩn đực tiếp xúc với một vi khuẩn cái.

- Việc truyền yếu tố này từ một vi khuẩn này sang một vi khuẩn khác đòi hỏi một sự tiếp xúc trực tiếp giữa hai tế bào.

2.3.3. Cơ chế của tiếp hợp

- Cách truyền vật chất di truyền từ vi khuẩn đực sang vi khuẩn cái được làm sáng tỏ do những công trình của Wollman và Jacob (1958 –1960) về động lực của sự hình thành những thể tái tổ hợp. Những thí nghiệm này đã phát hiện trạng thái của yếu tố giới tính F trong những vi khuẩn đực Hfr và vai trò của nó trong những quá trình truyền dẫn.

- Quá trình truyền vật chất di truyền trong tiếp hợp diễn ra theo các giai đoạn sau :

+ Giai đoạn đầu là sự tiếp xúc ngẫu nhiên xuất hiện vài phút sau khi trộn vi khuẩn với nhau. Xác suất của sự tiếp xúc phụ thuộc vào nồng độ vi khuẩn của 2 giới.

+ Giai đoạn 2 là sự liên kết cặp giữa tế bào nhận và tế bào cho. Tế bào nhận đóng vai trò thụ động, màng tế bào của nó bị hoà tan, tại chỗ tiếp xúc tạo thành những cầu nguyên sinh chất có đường kính 10-30μm. Quá trình này phụ thuộc vào pH làm biến đổi tỉ lệ tiếp xúc kèm theo một sự kết hợp, điều kiện dinh dưỡng.

+ Giai đoạn 3 là giai đoạn mà các chrômôxôm của tế bào cho được chuyển sang tế bào nhận theo cấu trúc thẳng, mỗi gen phân bố ở một vị trí xác định. Số lượng gen được chuyển sang phụ thuộc vào thời gian tiếp hợp.

+ Giai đoạn 4 là quá trình tái tổ hợp giữa các nhiễm sắc thể của thể nhận và đoạn chất di truyền của thể cho.

Cuối cùng là sự tái tạo nhiễm sắc thể trong những thế hệ sau, thể lai được hình thành.

III - SỰ BIẾN DỊ CỦA VI SINH VẬT – SỰ ĐỘT BIẾN

Những đặc tính của vi khuẩn cũng như những VSV khác có thể bị biến đổi trong quá trình phát triển. VSV phải thích nghi với những điều kiện thay đổi của ngoại cảnh mà chúng được tiếp xúc.

3.1. Các loại biến dị

3.1.1. Biến dị phenotip

Là những biến dị kiểu hình, tạm thời và thuận nghịch, không ổn định của toàn bộ quần thể vi khuẩn, gây ra do những điều kiện của môi trường

Split Unregistered Version - http://www.simpopdf.com
trong đó vi khuẩn bắt buộc phải sống và sinh sản. Những biểu hiện này xuất hiện chậm và mất đi với sự biến mất của yếu tố làm xuất hiện chúng, chúng không phải là sinh ra do di truyền.

a) *Biến dị của hình thái vi khuẩn*

Hình thái của vi khuẩn không phải là cố định. Những biến dị về hình thái có thể sinh ra dưới ảnh hưởng của những yếu tố khác nhau có liên quan đến tuổi của vi khuẩn và của môi trường xung quanh.

- Biến dị trong quá trình sinh sản, thường xảy ra những biến dị về kích thước tế bào. Ví dụ : Một tế bào vi khuẩn *E.coli* nuôi cấy được 5 –6 giờ trong môi trường thích hợp sẽ dài ra trước khi sinh sản. Trái lại, sẽ nhỏ lại khi nó ở thời kì sinh sản tối đa và kích thước tối thiểu, khi nó hết khả năng sinh sản. Những tỉ lệ giữa kích thước tối đa và tối thiểu thường không quá 1/3 hoặc 1/5 tuỳ theo loài vi khuẩn.

Những biến đổi này kèm theo một sự thay đổi trong hàm lượng axit nucleic của vi khuẩn.

- Biến dị về hình thái dưới ảnh hưởng của ngoại cảnh : tất cả những điều kiện sống đều có thể làm biến đổi hình thái của vi khuẩn như :

+ Cấu tạo hoá học của môi trường.

+ Những điều kiện lí, hoá không thuận lợi của môi trường (pH, sức căng bề mặt, nhiệt độ v.v...).

+ Những chất tiêu độc, sát trùng, kháng sinh, hoá trị liệu.

b) *Biến dị về dạng của khuẩn lạc*

Những biến dị về dạng của khuẩn lạc (khuẩn lạc ướt, nhày, bóng láng hoặc nhám) hiện nay được coi như những biến dị gây ra do ngoại cảnh.

Khi một canh khuẩn thuần khiết được đem nuôi cấy trong một môi trường đặc, xuất hiện nhiều loại hình khuẩn lạc thuộc hai dạng chính là dạng S bóng láng và dạng R nhám xù xì, giữa hai dạng có dạng trung gian O không ổn định, trong một số trường hợp, có thể hình thành những khuẩn lạc con, hoặc một số khuẩn lạc khác như khuẩn lạc D (dwart : lùn nhỏ) v.v...

3.1.2. Biến dị genotip - Đột biến

a) *Những tính chất chung của biến dị genotip*

- Biến dị genotip là những biến dị đột ngột, một cách ngẫu nhiên không dự định trước được và không liên tục ở một số cá thể hiếm hoi (1×10^{-5} đến 1×10^{-8}) trong một quần thể vi khuẩn. Chúng tương đối độc lập với môi trường xung quanh, có tính chất cố định, vĩnh cửu di truyền.

Split Unregistered Version - http://www.simpopdf.com

Những tác nhân gây đột biến vật lí (tia phóng xạ) hoặc tác nhân hoá học làm tăng gấp bội tần số của đột biến.

- Những vi khuẩn bị biến đổi một số hoặc nhiều đặc tính sẽ thành những thể đột biến. Những thể đột biến này ít khi có tính chất thuận nghịch trở lại chủng vi khuẩn ban đầu (đột biến đảo nghịch). Nếu một sự đảo nghịch này phát sinh ra, nó sẽ được di truyền. Tần số xuất hiện của những thể đột biến hoặc tỉ lệ các thể đột biến ở một thời điểm nhất định trong một quần thể vi khuẩn rất thấp và phụ thuộc vào hai yếu tố là : tần số đột biến và khả năng chọn lọc của những thể đột biến này :

+ Tần số đột biến là xác suất mà một đột biến sinh ra trong hệ gen của một vi khuẩn trong một thế hệ. Ví dụ : 10^{-4} và 10^{-5} là tần số đột biến của tính chất a và tính chất b (đột biến đơn). Tần số đột biến (ab) là 10^{-9} (đột biến kép), liên quan đến hai tính chất.

+ Tần số đột biến đối với một đặc tính không thay đổi trong nhiều thế hệ tiếp và những thế hệ đột biến này phân chia ở một tốc độ giống như tế bào bố mẹ.

+ Trong một quần thể vi khuẩn, tỉ lệ thể đột biến không thể tăng một cách vô tận, một sự thăng bằng đột biến được lập ra do hiện tượng đột biến ngược (mutation reverse) xuất hiện khi tỉ lệ thể đột biến trở nên quá lớn so với những vi khuẩn bình thường. Ở mỗi thế hệ, sẽ sinh ra một số đột biến ngược tương tự như số lượng đột biến trực tiếp, để giữ cố định tỉ lệ đột biến.

b) *Những biểu hiện của sự đột biến ở vi khuẩn*

Ở tất cả các loại vi khuẩn và tất cả các đặc tính mà người ta biết đều có thể phát sinh đột biến.

Một đặc tính có thể do đột biến mà có nhiều biến đổi. Sau đây là những đặc tính phát sinh đột biến được nghiên cứu nhiều :

1. Dạng khuẩn lạc phát triển trên môi trường dinh dưỡng đặc, ví dụ : *Serratea marcescens* phát triển những khuẩn lạc có màu sắc trên một số môi trường chọn lọc.

2. Sự hình thành sắc tố trên môi trường chọn lọc (khả năng sinh sắc).

3. Sự hình thành nội nha bào (sự nha bào hoá), người ta chọn những thể đột biến của trực khuẩn sinh nha bào bằng cách đun ở 80^0C trong 30 phút.

4. Khả năng tổng hợp một chất chuyển hoá hoặc một yếu tố sinh trưởng (thể đột biến sinh hoá). Ví dụ : *Salmonella typhi* mầm bệnh thương hàn của người không mọc được trong môi trường khoáng và có

Split Unregistered Version - http://www.simpopdf.com

glucozơ, nhưng khi cho vào môi trường L⁻ triptophan, người ta làm cho vi khuẩn này có thể sinh trưởng được. Hoặc *Eberthella typhosa* nuôi cấy trong môi trường tổng hợp không có triptophan.

5. Khả năng lên men đường : ví dụ *E.coli mutabile* trên môi trường chọn lọc có lactozơ và chỉ thị màu.

6. Động lực của chủng vi khuẩn kiểm tra bằng cách tiêm nhiễm qua động vật thí nghiệm.

7. Tính kháng nguyên (các loại kháng nguyên thân, giáp mô, tiên mao), kiểm tra bằng cách cấy trên môi trường có huyết thanh đặc hiệu.

8. Sự mẫn cảm đối với kháng sinh, phagiơ đặc hiệu và tia tử ngoại, kiểm tra bằng cách cấy trên môi trường có kháng sinh, có phagiơ hoặc cho tác động tia tử ngoại.

3.2. Các loại thể đột biến

3.2.1. Biến dị của khuẩn lạc vi khuẩn

Trong quá trình phát triển của một loài vi khuẩn, một số đột biến có thể cảm ứng do ngoại cảnh trong tự nhiên. Đó là những biến dị xuất hiện trên những khuẩn lạc phát triển tách biệt trên môi trường đặc, dẫn đến sự hình thành những khuẩn lạc có bề mặt bóng láng (khuẩn lạc dạng S = Smooth) ; khuẩn lạc có bề mặt nhám (khuẩn lạc dạng R = Rough) và những khuẩn lạc có bề mặt nhày (khuẩn lạc dạng M= Mucoid).

3.2.2. Thể đột biến hoá sinh, dinh dưỡng, thể đột biến sinh trưởng

- Sự nhiễu loạn trong hệ thống điều chỉnh sự chuyển hoá của vi khuẩn trong một quần thể vi khuẩn, gây ra sự hình thành những thể đột biến hoá sinh. Mỗi phản ứng chuyển hoá được xúc tác bằng một enzym mà sự tổng hợp và tác động lên nó do những gen có chức phận khác nhau kiểm soát và điều chỉnh (như đã nói ở phần trên).

- Sự mất đi hoặc tổn thương của một chức năng men thường làm mất đi một khả năng tổng hợp ở một khâu của chuỗi nhỏ chuyển hoá và do đó gây ra những đòi hỏi mới về dinh dưỡng (thể đột biến dinh dưỡng hoặc thể đột biến sinh trưởng).

- Có rất nhiều loại thể đột biến sinh trưởng giám định bằng nhu cầu dinh dưỡng mà chúng đã tiếp thu (ví dụ : một axit amin, một bazơ puric, một coenzim nào đó).

+ Dàn mỏng canh khuẩn ban đầu của những vi khuẩn dại (10^6) trong thạch nước thịt trên đĩa petri và chiếu bằng tia phóng xạ trong 3 giờ. Sau

Split Unregistered Version - http://www.simpopdf.com
đó cấy lại trên nước thịt dinh dưỡng để cho những vi khuẩn còn sống sót sinh sản, những vi khuẩn này đã đột biến hoặc không.

+ Vi khuẩn được cấy trên môi trường tối thiểu có thêm penixilin với lượng nhỏ, sau vài giờ nuôi ở nhiệt độ 37^0C. Vi khuẩn bị tiêu diệt, chỉ còn tồn tại những vi khuẩn đột biến thích ứng với môi trường có penixilin.

Cấy lại những vi khuẩn này trong môi trường đặc, sau khi trung hòa penixilin bằng cách cho thêm pelixilinaza, cho phép phân lập được khuẩn lạc của thể đột biến.

3.2.3. Những thể đột biến đề kháng

- Những thể đột biến đề kháng là những vi khuẩn có một sức đề kháng với một số tác nhân kháng khuẩn mà hầu hết tế bào vi khuẩn cùng loại hoặc cùng nòi rất mẫn cảm.

- Các thể đột biến đề kháng với :

+ Tia phóng xạ. Ví dụ : tia tử ngoại.

+ Phagiơ của vi khuẩn.

+ Những chất kháng sinh và những tác nhân hoá trị liệu khác (sunfamit và những chất dẫn xuất tổng hợp khác).

IV - ỨNG DỤNG CỦA DI TRUYỀN HỌC VI KHUẨN

Việc sử dụng VSV phục vụ sản xuất, phục vụ con người càng được mở rộng và có tầm quan trọng to lớn trong y học, thú y và nông nghiệp. Việc sử dụng rộng rãi VSV, bắt buộc phải chọn lọc các nòi sinh vật hữu ích cho năng suất cao. Có hai phương pháp chính để chọn giống VSV là phương pháp không dùng tác nhân gây đột biến và phương pháp dùng các tác nhân gây ra đột biến, biến dị.

4.1. Các phương pháp chọn lọc giống không dùng tác nhân gây đột biến

4.1.1. Phương pháp chọn lọc tự nhiên

Trong phương pháp này người ta chọn lọc những giống chuẩn đáp ứng với yêu cầu sản xuất bằng cách nuôi cấy có thay đổi, cải tiến (như thay đổi nhiệt độ, độ pH...).

Ví dụ : chọn nòi nấm men *Saccharomyces cerevisiae* có khả năng lên men đường ở 45^0C (mà ban đầu chỉ lên men đường ở 30^0C) bằng cách cấy trong tủ ấm ở nhiệt độ tăng dần từ 30^0C đến 45^0C.

Split Unregistered Version - http://www.simpopdf.com

4.1.2. Phương pháp chọn lọc nhân tạo

Trong phương pháp này, người ta tách những nòi vi khuẩn mang những dấu hiệu hữu ích từ quần thể vi khuẩn nuôi cấy trên môi trường đặc, môi trường phân lập thạch đĩa hoặc thạch phân lập đặc biệt và chọn lọc những khuẩn lạc điển hình, đáp ứng với yêu cầu sản xuất. Ví dụ : trong việc tạo giống vi khuẩn đóng dấu lợn giảm độc để chế vacxin là việc nuôi cấy phân lập những chủng vi khuẩn trên thạch đĩa từ những tuyến hạch nhân của những lợn mổ ở nhiều lò sát sinh thuộc nhiều vùng khác nhau.

Căn cứ vào tính chất của khuẩn lạc mọc trên thạch mà tách ra những chủng không có độc lực hoặc độc lực thấp. Sau đó người ta kiểm tra độc lực của những chủng đã chọn lọc được trên thạch đĩa bằng cách tiêm truyền qua chuột bạch non, một động vật thí nghiệm rất mẫn cảm với vi khuẩn đóng dấu lợn (vi khuẩn không có độc lực không giết chuột).

Qua nhiều lần thử nghiệm và kiểm tra độc lực, người ta tiến hành chế vacxin và đem thử an toàn trên động vật (chuột bạch, bồ câu, lợn). Nếu vacxin gây miễn dịch tốt, vững chắc và lâu dài thì nòi vi khuẩn phân lập được bằng phương pháp chọn lọc nhân tạo có thể đem dùng trong sản xuất.

4.1.3. Sử dụng cơ chế lai

Trong phương pháp này người ta phối 2 dạng vi khuẩn bố, mẹ để tạo thể lai có những dấu hiệu trội của vi khuẩn bố, mẹ (lai lưỡng bội) hoặc có thể kết hợp các tính trạng của bố, mẹ (tái tổ hợp).

4.2. Các phương pháp chọn lọc giống dùng tác nhân gây đột biến

Có 3 loại tác nhân gây đột biến là : tác nhân sinh vật học, hoá học và vật lí học.

4.2.1. Tạo giống VSV bằng tác nhân sinh học gây đột biến

Như dùng thỏ, chuột nhắt trắng, chuột lang, chồn, dê, bồ câu, phôi gà, vịt, ngỗng, ngan, môi trường tế bào sống... để tạo ra những giống vi khuẩn giảm độc hoặc không gây ra bệnh hoặc gây bệnh nhẹ cho gia súc.

Dùng virus không gây bệnh để chế vacxin sống cần thiết.

4.2.2. Tạo giống VSV bằng tác nhân hoá học gây đột biến

Người ta dùng CO_2, kháng sinh, các môi trường có mật bò và một số môi trường đặc biệt khác để giảm độc vi khuẩn, tạo những nòi vi khuẩn giảm độc để chế vacxin hoặc dùng trong công nghiệp.

Split Unregistered Version - http://www.simpopdf.com

Ví dụ : Bằng cách nuôi cấy vi khuẩn nhiệt thán (*Bacillus anthracis*) trên môi trường dinh dưỡng đặc biệt là thạch huyết thanh, trong không khí có 10 - 30% CO_2 đã chọn được khuẩn lạc không có giáp mô. Nòi này hiện nay được dùng rộng rãi trên thế giới để phòng trừ bệnh nhiệt thán cho gia súc.

4.2.3. Tạo giống VSV bằng tác nhân vật lí gây đột biến

Có thể dùng nhiệt của các tia phóng xạ (tia X, tia tử ngoại, tia γ) để giảm độc VSV hoặc để tạo ra nòi *Bacillus anthracis* ở nhiệt độ cao 42-43^{0}C trong 12 đến 24 ngày, làm cho vi khuẩn mất khả năng gây bệnh cho gia súc khi tiêm thêm dưới da nhưng giữ được tính miễn dịch (vacxin chống bệnh nhiệt thán).

Trong miễn dịch học, người ta dùng tia tử ngoại chiếu vào canh khuẩn tụ huyết trùng gà để tạo nòi giảm độc.

HƯỚNG DẪN ÔN TẬP

1. Những đặc tính trong di truyền của VSV.
2. Cơ chế chuyển nguyên liệu di truyền ở VSV.
3. Hiện tượng biến nạp.
4. Hiện tượng tiếp hợp.
5. Hiện tượng tải nạp.
6. Các kiểu biến dị ở VSV.

Split Unregistered Version - http://www.simpopdf.com

Chương 6

ẢNH HƯỞNG CỦA ĐIỀU KIỆN NGOẠI CẢNH ĐẾN VI SINH VẬT VÀ SỰ PHÂN BỐ CỦA VI SINH VẬT TRONG TỰ NHIÊN

I - ẢNH HƯỞNG CỦA ĐIỀU KIỆN NGOẠI CẢNH ĐỐI VỚI VI SINH VẬT

Cơ thể và môi trường là một khối thống nhất, nên sự phát triển của VSV có quan hệ chặt với các yếu tố ngoại cảnh. Tác động của các yếu tố ngoại cảnh có thể đẩy mạnh hay ức chế hoặc đình chỉ quá trình sinh trưởng, phát triển của VSV. Các yếu tố ngoại cảnh gồm 3 yếu tố sau : vật lí, hóa học, sinh học.

1.1. Ảnh hưởng của các nhân tố vật lí

1.1.1. Ảnh hưởng độ ẩm

- Hoạt động sống của VSV đều liên quan đến nước, tỉ lệ nước trong tế bào VSV khá cao, nước trong vi khuẩn chiếm từ 75 - 85%, nấm men 78 - 82%, nấm mốc 84 - 90%.

VSV cần nước ở trạng thái tự do, do đó quá trình trao đổi chất, nếu thiếu nước sẽ có hiện tượng loại nước ra khỏi tế bào, làm cho tế bào có thể bị chết.

- Sức đề kháng của các VSV ở trạng thái khô là khác nhau :

+ Sức đề kháng của VSV không khí > VSV đất > VSV nước.

+ Sức đề kháng của xạ khuẩn > vi khuẩn > nấm mốc.

+ Sức đề kháng của bào tử (nha bào) > tế bào sinh dưỡng.

- Nhu cầu về nước đối với tế bào VSV được tính bằng công thức :

$$aw = P/P_0$$

aw – nhu cầu về nước, P – nồng độ hơi nước trong môi trường.

P_0 – nồng độ hơi nước nguyên chất.

Để VSV có thể tồn tại và phát triển, thì aw giao động từ 0,93 – 0,99.

Mặt khác aw liên quan rất chặt với nồng độ muối trong môi trường.

Như vậy nồng độ muối NaCl % nằm trong khoảng 0,9 – 15,0% là phù hợp cho VSV.

Split Unregistered Version - http://www.simpopdf.com

1.1.2. Nhiệt độ

Nhiệt độ thấp dưới 3^0C làm ngừng quá trình sinh trưởng, phát triển của VSV. VSV được phân thành 3 nhóm theo nhiệt độ :

- Nhóm VSV ưa lạnh : Được phân bố ở vùng hàn đới, nhiệt độ thấp nhất 5^0C, nhiệt độ cao nhất chịu được ở 15^0C, nhiệt độ tối thích ở 10^0C.

- Nhóm VSV ưa ấm : Được phân bố ở vùng nhiệt đới và á nhiệt đới, nhiệt độ thấp nhất 15^0C , nhiệt độ cao nhất chịu được ở 35^0C, nhiệt độ tối thích ở 25^0C.

- Nhóm VSV ưa nóng : Được phân bố ở vùng xứ nóng, sa mạc và xung quanh đường xích đạo, nhiệt độ thấp nhất 35^0C, nhiệt độ cao nhất chịu được ở 85^0C, nhiệt độ tối thích ở 60 ^{0}C.

Ứng dụng : Để khử trùng dụng cụ, nguyên liệu trong các lĩnh vực chế biến thực phẩm, y tế, VSV học... bằng việc sử dụng nhiệt độ cao hơn nhiệt độ sinh trưởng cực đại.

1.1.3. Áp suất thẩm thấu

- Màng tế bào chất là một màng bán thấm, nồng độ các chất hoà tan trong dung dịch mà VSV tồn tại quyết định áp suất thẩm thấu.

Trong môi trường có nồng độ chất tan thấp (môi trường nhược trương (hipotonic)), tế bào hút nước mạnh, áp lực tế bào tăng gây ra hiện tượng trương nguyên sinh.

Trong môi trường có nồng độ chất tan cao, môi trường ưu trương (hipertonic), nước trong tế bào bị thấm ra ngoài, gây ra teo nguyên sinh chất, tế bào bị khô sinh lí, kéo dài sẽ bị chết.

Ứng dụng : Thường dùng muối, đường nồng độ cao trong bảo quản và chế biến thực phẩm.

1.1.4. Các tia bức xạ

- Đa số VSV sinh trưởng không cần ánh sáng (trừ nhóm VSV quang hợp). Các tia bức xạ có chiều dài bước sóng khoảng 10.000 A^0 có thể gây hại đối với VSV, đó là ánh sáng mặt trời, tia tử ngoại, tia α, β, δ tia X.

+ Tác động của ánh sáng mặt trời có thể trực tiếp làm phá huỷ tế bào, hoặc gián tiếp tạo ra các chất độc trong môi trường gây hại cho VSV.

+ Tia tử ngoại, tia δ kìm hãm sự sinh trưởng, gây đột biến gen, giết chết VSV.

+ Tia X phá huỷ độc tố của vi khuẩn như độc tố dung huyết, độc tố thương hàn do tạo thành gốc oxi hoá hoạt động, nên có tác dụng oxi hoá mạnh làm phá huỷ độc tố.

Split Unregistered Version - http://www.simpopdf.com

- *Ứng dụng* : Các tia bức xạ được sử dụng trong khử trùng, tiêu độc, trong bảo quản, chế biến và công tác y, VSV học.

1.2. Ảnh hưởng của các nhân tố hoá học

1.2.1. Độ pH

- Độ pH có quan hệ rất lớn đến sự sinh trưởng của VSV.

Giới hạn pH của sự sinh trưởng : là khoảng pH từ cực tiểu đến cực đại mà VSV có khả năng sinh trưởng. Trong khoảng này có pH thích hợp nhất, mà ở đó VSV có sự sinh trưởng và phát triển cao nhất. Tác dụng của pH có ảnh hưởng trực tiếp đến quá trình trao đổi chất của tế bào vì pH cần cho hoạt động của nhiều enzym ; nồng độ ion H còn ảnh hưởng trực tiếp đến độ hoà tan của một số muối khoáng K, Na, Mg... do đó ảnh hưởng đến sinh trưởng và phát triển của VSV.

- Đa số VSV thích ứng ở pH từ 4,5 – 9,0 ; tuỳ từng chủng giống VSV khác nhau mà thích ứng khác nhau.

Ví dụ : *Rhizobium*, pH thích hợp ở 6,5 – 7,5.
Azotobacter, pH thích hợp ở 7,2 – 8,2.
Saccromyces, pH thích hợp ở 4,0 – 6,0.

1.2.2. Ảnh hưởng của điện thế oxi hóa khử trong môi trường đến VSV

Trong hoạt động sống của VSV chịu ảnh hưởng rất lớn của điện thế oxi hóa khử trong môi trường, thường thì VSV yếm khí chịu được ở rH_2 thấp từ 0 – 12 vôn, đối với VSV hảo khí từ 10 – 30 vôn. Tùy từng chủng giống VSV khác nhau mà chịu được rH_2 khác nhau.

Điện thế oxi hóa khử trong môi trường được tính bằng công thức sau :

$$rH_2 = -\frac{Eh}{0,29} + 2pH \text{ (vôn)}$$

rH_2 - điện thế oxi hóa khử, Eh - điện thế, 0,29 - hệ số, pH - độ chua của môi trường.

1.2.3. Các chất sát trùng, ức chế, diệt khuẩn

Các chất sát trùng, chất ức chế, chất diệt khuẩn là bao gồm tất cả các chất gây hại đối với VSV. Chúng gồm nhiều chất từ nhiều nguồn gốc, có thành phần, hoạt tính hoá học và cơ chế tác động khác nhau.

a) *Chất sát trùng*

Chỉ những chất có thể giết chết VSV gây bệnh hoặc không gây bệnh nhưng không giết chết được nha bào.

Split Unregistered Version - http://www.simpopdf.com

b) *Chất ức chế*

Là những chất chỉ làm ngừng quá trình sinh trưởng, phát triển, VSV không bị giết chết mà ở trạng thái tiềm tàng.

c) *Chất diệt khuẩn* : Chỉ các chất có thể giết toàn bộ vi khuẩn kể cả nha bào (hay bào tử). Ví dụ : HgCl, $AgNO_3$, $CuSO_4$...

Một chất có thể vừa là sát trùng, ức chế hay diệt khuẩn... tuỳ thuộc vào nồng độ, thời gian, loại VSV tác động và các yếu tố khác.

1.2.4. Các chất hoá trị liệu

- Gồm các chất có thể tổng hợp được bằng phương pháp hoá học. Có tác dụng độc đối với VSV nhưng hầu như không gây hại cho động vật.

- Các chất hoá trị liệu có hoạt tính cao nên đã tranh chỗ trong phản ứng sinh tổng hợp của tế bào, vì vậy đã hình thành nên các hợp chất không cần thiết cho cơ thể làm cho các phản ứng sinh hoá của tế bào bị kìm hãm, gây ức chế quá trình sinh trưởng, phát triển của tế bào vi khuẩn : Ví dụ : Sunfolamit có cấu trúc tương tự như axit para-aminobenzoic (PABA) (là thành phần tham gia tổng hợp nên axit folic, tiền chất của coenzym tham gia quá trình tổng hợp nên purin, axit amin). Do hoạt chất của sunfolamit cao nên chiếm chỗ của PABA, làm cho axit folic không được tạo thành, do đó sự sinh trưởng và phát triển của vi khuẩn bị ngừng.

1.2.5. Chất kháng sinh

Kháng sinh – antibiotic, antibiotica, chemotherapeutica (anti : kháng lại, bios : sự sống) là chất do VSV sinh ra, ngay ở nồng độ thấp, kháng sinh cũng có khả năng ức chế hoặc tiêu diệt các VSV một cách đặc hiệu, mỗi kháng sinh chỉ tác động lên một vi khuẩn hoặc một nhóm vi khuẩn bằng cách gây rối loạn phản ứng sinh vật ở ngưỡng phân tử.

- Cơ chế tác động của thuốc kháng sinh lên VSV :

+ Ức chế sinh tổng hợp hoặc phá huỷ vách tế bào, nên vi khuẩn sinh ra không có vách tế bào, do đó dễ bị tiêu diệt.

+ Gây rối loạn chức năng màng nguyên sinh, đặc biệt là chức năng thẩm thấu, chọn lọc, do đó làm ngừng quá trình trao đổi chất.

+ Làm ngừng quá trình tổng hợp protein.

+ Gây ức chế sự tổng hợp axit nucleic, ngăn cản sự sao chép ADN, ngăn cản sinh tổng hợp ARN-polimeraza, tức là ức chế sinh tổng hợp những chất cần thiết cho tế bào.

Tuỳ từng chủng giống VSV khác nhau mà khả năng chịu được các loại thuốc và liều lượng kháng sinh khác.

Split Unregistered Version - http://www.simpopdf.com

1.3. Tác động của các nhân tố sinh vật học

1.3.1. Quan hệ cộng sinh

Là mối quan hệ sống chung, đều có lợi giữa hai sinh vật khác nhau, hoạt động sống của sinh vật này sẽ thúc đẩy sự sinh trưởng và phát triển của sinh vật kia và ngược lại, mối quan hệ giữa chúng khó có thể tách rời. Nếu tách rời, sẽ ảnh hưởng đến hoạt động sống của chúng.

Ví dụ : Mối quan hệ giữa vi khuẩn nốt sần và cây họ Đậu là một cơ cấu sinh lí đặc biệt làm cho vi khuẩn sống tốt và cố định được N phân tử cung cấp cho cây phát triển. Mối quan hệ giữa hệ sinh vật với động vật nhai lại, như sự hình thành hệ VSV của dạ cỏ. Hay địa y là mối quan hệ cộng sinh giữa nấm và tảo.

1.3.2. Quan hệ tương hỗ

- Chỉ mối quan hệ giữa các sinh vật sống cạnh nhau và có tác dụng hỗ trợ nhau trong quá trình sống. Mối quan hệ này rất phổ biến trong giới sinh vật nói chung và VSV nói riêng. Không có sự ràng buộc một cách chặt chẽ giữa các sinh vật trong mối quan hệ này, chúng có thể sống tách rời nhau, không cần đến nhau và giữa chúng chỉ có một bên nhận mà không hề có trả về sự giúp đỡ của bên kia.

- Đó là mối quan hệ tương hỗ giữa các nhóm VSV trong cùng một môi trường sống như nấm men lên men đường thành rượu, tạo điều kiện thuận lợi về dinh dưỡng cho sự oxi hoá rượu thành dấm của vi khuẩn axetic khi có không khí. Khi lên men tự nhiên, những VSV hảo khí đầu tiên phát triển, sử dụng hết oxi tạo điều kiện yếm khí cho các vi khuẩn tiến hành lên men, tạo ra các hợp chất hữu cơ khác nhau như quan hệ tương hỗ giữa VSV trong đất và cây trồng.

Ví dụ : Mối quan hệ tương hỗ giữa *Azotobacter* với *Acetobacter*, chúng sống chung trong một môi trường sống, *Azotobacter* đồng hóa nitơ của không khí, còn *Acetobacter* phân hủy các chất hữu cơ và vô cơ bền vững thành các chất dễ tiêu trong môi trường sống.

1.3.3. Quan hệ đối kháng

Đây là mối quan hệ không có lợi, gây ra những ảnh hưởng hạn chế hoặc tiêu diệt, loại trừ nhau biểu hiện trên các mặt như tranh chấp chất dinh dưỡng, tiết ra những sản phẩm độc hại.

Ví dụ như sự lên men axit lactic của vi khuẩn *Lactic* đã ức chế các nhóm vi khuẩn thối rữa, vì axit lactic làm cho độ pH giảm thấp. Một số nhóm VSV tiết ra độc tố như một số vi khuẩn gây bệnh. Nấm *Aspergillus flavus* tiết ra aflatoxin. Nhiều nhóm VSV còn tiết ra chất kháng sinh gây ức chế các nhóm VSV khác.

Split Unregistered Version - http://www.simpopdf.com

1.3.4. Quan hệ kí sinh

Là mối quan hệ giữa hai cá thể sinh vật mà một bên lợi, một bên hại, sinh vật này sống nhờ hoàn toàn vào sinh vật kia bằng cách sử dụng bản thân sinh vật ấy làm nguồn cung cấp dinh dưỡng cho nó, làm cho sinh vật ấy bị ảnh hưởng đến sự sinh trưởng và phát triển hoặc có thể bị chết.

Có thể thấy mối quan hệ kí sinh của VSV gây bệnh đối với cơ thể động vật, thực vật hay thực khuẩn thể sống bắt buộc trong tế bào vi khuẩn. Các VSV này được gọi là VSV kí sinh. Mối quan hệ này chủ yếu đem lại cho sinh vật cao cấp những tác hại to lớn. Ví dụ : Nấm sống kí sinh trên cây trồng, gây bệnh cho cây...

II - PHÂN BỐ CỦA VI SINH VẬT TRONG TỰ NHIÊN

2.1. Sự phân bố của vi sinh vật trong đất

Đất là môi trường sống tốt nhất đối với VSV.

Trong đất có đầy đủ những điều kiện tối thiểu cho VSV tồn tại và phát triển :

- Về nhiệt độ : Trong đất nhiệt độ luôn luôn giữ ở 25 – 28° C. Nhiệt độ này rất thích hợp đối với VSV.

- Về độ ẩm : Trong đất độ ẩm thường giao động từ 30 – 90%, VSV thường phát triển ở độ ẩm 30 – 70%.

- Về dinh dưỡng : trong đất có đầy đủ những nguyên tố dinh dưỡng đa lượng, vi lượng và các enzym, các chất kích thích cho VSV hoạt động.

- Chính vì vậy trong 1 gam đất có chứa tới hàng trăm triệu tế bào vi khuẩn, chục triệu tế bào nấm và xạ khuẩn, hàng vạn tế bào tảo.

+ VSV tập trung ở tầng đất canh tác, giảm dần theo độ sâu xuống phía dưới ; ở giới hạn sâu nhất, trong 1 gam có 1000 - 10.000 vi khuẩn ; ở bề mặt là 1 -10 tỉ vi khuẩn. Đặc biệt là VSV hảo khí giảm dần theo độ sâu, vi khuẩn yếm khí phát triển mạnh ở tầng đất sâu 30 -50cm.

Nói chung VSV ở đất trồng trọt, đất rừng, đồng cỏ thường tập trung ở độ dày 0 - 30cm.

+ Trong đất ngập nước, yếm khí, người ta vẫn thấy có tới 60 - 70 vạn tế bào VSV hảo khí.

+ Trong đất trồng lúa người ta gặp nhiều VSV có khả năng cố định nitơ phân tử tự do hoặc hội sinh, như *Azotobacter, Chrococium, Clostridium butynicum, Azospirillum...*

Split Unregistered Version - http://www.simpopdf.com

2.2. Phân bố vi sinh vật trong nước

2.2.1. Nguồn gốc vi sinh vật ở nước

Trong tự nhiên ít khi có nước vô trùng. Nguồn VSV trong nước là từ đất, không khí và chất thải, do đó nước trên bề mặt sông hồ, đại dương cũng chứa các VSV.

Khi nước ngấm xuống đất thì phần lớn VSV trong nước bị tách ra do tác dụng lọc của đất nhưng không hoàn toàn, do đó nước ở sâu dưới đất đều có mang VSV, nước dưới đáy sâu các giếng, hồ, sông cũng đều mang VSV bởi sự ô nhiễm do nước thải.

2.2.2. Sự tồn tại phát triển của vi sinh vật trong nước

- Nước là môi trường được coi là thích hợp của nhiều loại VSV, vì nước có chứa đầy đủ các chất hữu cơ, không khí và nhiệt độ thuận lợi cho sinh trưởng, phát triển của VSV.

- Sự tồn tại của VSV có quan hệ rất lớn đến độ sâu của nước :

+ Nước trên bề mặt : nhiều chất hữu cơ, nhiệt độ và độ thoáng khí tốt, do đó VSV phát triển thuận lợi, số lượng và loại hình khá lớn. Nhiều vi khuẩn, tảo và *protozoa*, nấm mốc, khi được đưa vào nước bề mặt, thì có khả năng trở thành một quần thể tự nhiên trong nước.

Ở nước bề mặt có thể thấy các loại : cầu khuẩn, trực khuẩn không nha bào, xoắn khuẩn, xạ khuẩn, vi khuẩn có nha bào và các vi khuẩn quang hợp, các loại tảo.

+ Nước dưới sâu : ít chứa chất hữu cơ, nhiệt độ lạnh, do đó quần thể VSV ở đây không đa dạng, chỉ tồn tại một số nhóm với số lượng nhỏ hơn ở nước bề mặt.

- Sự tồn tại của VSV còn phụ thuộc vào nguồn nước, thời tiết khí hậu, loại hình VSV nhiễm :

+ Nguồn nước gần thành phố, khu vực dân cư đông đúc có hệ VSV phức tạp hơn, số lượng lớn hơn ở nguồn nước vùng hẻo lánh, ít dân.

+ Vào mùa nắng ấm, mưa nhiều, VSV trong nước cũng tăng hơn trong mùa lạnh, mưa ít ; trời nắng nhiều, không mưa, làm giảm số lượng VSV.

+ VSV có nha bào tồn tại lâu hơn, những VSV gây bệnh nhiễm vào nước từ chất thải không có khả năng phát triển, thường bị chết trong một thời gian ngắn, chỉ tồn tại các nha bào của chúng. VSV gây bệnh sống sót được lâu hơn trong nước lạnh và nước sạch so với trong nước nóng.

2.2.3. Vi sinh vật trong ao, hồ

Sự biến đổi về VSV theo nguồn nước, thời tiết : Nguồn nước ao hồ ở nơi dân cư đông đúc, gần thành thị, đường giao thông có nhiều VSV hơn,

Split Unregistered Version - http://www.simpopdf.com

đặc biệt có một số lượng đáng kể các VSV gây bệnh chứa trong nước ao hồ. Nước ở chỗ thông thoáng có nhiều ánh nắng thì số lượng VSV giảm hơn nước ở ao hồ nông, ít nước và bị che khuất ánh nắng.

- Thời kì nắng nóng, mưa nhiều, lượng VSV ao hồ lớn hơn thời kì giá rét, hanh khô, do dinh dưỡng không được bổ sung, điều kiện không thích hợp.

- Diễn biến thời tiết trong một ngày có ảnh hưởng đến số lượng VSV : vào đêm, sáng sớm, lượng VSV nhiều hơn buổi trưa, chiều nắng gắt ; VSV lúc râm mát, trời mưa, nhiều hơn lúc trời nắng.

- Trong nước ao tù, thành phần và số lượng VSV cao hơn gấp nhiều lần ở ao hồ được thoát nước. Đặc biệt trong ao đọng nước, số lượng VSV gây bệnh rất nhiều, như : *E.coli, E.coliform, Salmonella*...

- Tính theo độ sâu của hồ nước tự nhiên, thì thành phần và số lượng VSV tập trung nhiều nhất ở độ sâu 3 – 20m, sau đó là ở độ sâu 0,3m và ít nhất là ở độ sâu trên 20m.

2.2.4. Vi sinh vật trong sông ngòi

Nhiều nhân tố ảnh hưởng đến hệ VSV trong sông ngòi như vị trí dòng sông, tốc độ dòng chảy, độ rộng và độ nông sâu, thời tiết khí hậu, đều ảnh hưởng đến sự biến đổi hệ VSV trong sông ngòi.

- Ở khúc sông có dòng chảy chậm, thì thành phần và số lượng VSV nhiều hơn ở khúc sông có cường độ chảy nhanh.

- Ở khúc sông chảy qua chính giữa thành phố, thì có thành phần và số lượng VSV ít hơn ở khúc sông ở cuối thành phố.

- Ở khúc sông chảy qua khu dân cư, thì thành phần và số lượng VSV nhiều hơn ở khúc sông chảy qua nơi không có dân cư ở.

2.2.5. Vi sinh vật trong nước mạch, nước giếng, nước mưa

Do tác dụng lọc mà trong nước mạch, nước mưa và nước giếng, có ít hợp chất hữu cơ và muối khoáng, sự nhiễm VSV ban đầu cũng ít, đặc biệt là sự nhiễm VSV gây bệnh.

a) *Nước mạch*

Nước tự nhiên được lọc qua tầng đất dày, chất hữu cơ bị giữ lại cùng với một phần VSV, nên số lượng còn lại ít, trong 1 lít có khoảng 100.000 tế bào VSV.

b) *Nước giếng*

Cũng lấy từ nguồn nước ngầm, được qua lọc, nhưng do được phun thấm và giữ lại ở trong giếng nên nó còn bị chi phối bởi nhiều nhân tố khác nữa, đó là vị trí giếng : giếng được đào đúng chỗ mạch nước ngầm thì trong, ít VSV ; nếu đào gần ao, sông, chỗ đất thấp dễ thu được nguồn nước thấm

Split Unregistered Version - http://www.simpopdf.com
không phải nước mạch ; hoặc chất đất ở đó quyết định nước đục hay trong ; phụ thuộc vào kĩ thuật xây giếng ; cách bảo quản sử dụng. Giếng có thành thấp, không có nắp đậy dễ bị nhiễm VSV từ đất bụi, không khí, rác bẩn.

Trong một lít có khoảng hàng chục vạn đến hàng triệu VSV.

c) *VSV trong nước mặn*

Nước biển mặc dù có hàm lượng muối cao, do đó áp suất thẩm thấu lớn, nhiệt độ nói chung thấp, nhưng vẫn có hệ VSV với số lượng tương đối lớn, là do chúng thích nghi với môi trường sống ở đây và dinh dưỡng trong nước biển cũng thoả mãn cho nhu cầu của chúng. Độ mặn càng cao, thì thành phần và số lượng VSV càng ít ; trong nước biển, VSV có tiên mao chiếm trên 70%.

Số lượng và chủng loại VSV biển thay đổi theo chiều sâu, khoảng cách so với bờ, ngoài ra còn phụ thuộc vào thời tiết khí hậu.

2.2.6. Vấn đề làm sạch nước

Nước dùng thường bị ô nhiễm bởi các VSV gây bệnh xuất phát từ một nguồn gốc, đó là nước thải.

- Nước ở bể bơi, bãi biển thường bị ô nhiễm trực tiếp từ người, môi trường không khí.

- Nước ao hồ, sông, suối, giếng nói chung bị nhiễm bằng đường duy nhất là qua nước thải.

- Nước thải từ người hoặc động vật bị bệnh sẽ mang VSV gây bệnh như tả, thương hàn, kiết lị, bạch hầu. Vì thế, việc sử dụng ao hồ, sông suối làm nơi thoát nước thải chưa được xử lí làm cho nước ao hồ, sông suối bị ô nhiễm, nguy hiểm cho người dùng. Do vậy vấn đề làm sạch nước là một vấn đề bức thiết.

2.2.7. Bảo vệ nước tránh bị ô nhiễm bởi nước thải

a) *Muốn tránh nước bị ô nhiễm, phải thực hiện các biện pháp sau :*

- Xây dựng các trạm xử lí nước thải để loại trừ các VSV gây bệnh.

- Có sự hướng dẫn và quy định cho cá nhân, gia đình và cụm dân cư thoát nước thải của họ đúng cách, đúng chỗ để tránh ô nhiễm vào nước dùng của chính họ.

- Xây dựng và xác định các nguồn nước sinh hoạt, phục vụ đời sống dân cư, đều góp phần phòng ngừa sự ô nhiễm của nước.

- Các hố chứa nước thải phải có sự chống thấm tốt để phòng ngừa ngấm vào các mạch nước, nguồn nước khác.

- Phải có biện pháp tránh nhiễm chất thải vào bể chứa, giếng nước, bằng sử dụng nắp đậy và luôn luôn kiểm tra để loại trừ tất cả các khả năng ô nhiễm nước thải.

Split Unregistered Version - http://www.simpopdf.com

b) *Làm lắng*

- VSV ở nước thường lắng xuống khi nước được giữ yên trong một thời gian, quy trình lắng nhanh có thể xảy ra khi có mặt các chất tạo vẩn keo, chất này thu hút các VSV vào bề mặt và bị lắng xuống nhanh chóng.

- Vậy muốn làm lắng, phải đưa nước vào bể chứa hoặc bể lắng, cho thêm vào chất keo lắng (muối sắt) sẽ làm lắng các VSV và các chất bẩn khác trong nước. Tất nhiên nước này chưa sạch hoàn toàn.

c) *Lọc nước*

- Lọc chậm bằng cát : Dùng bể lọc gồm các lớp được sắp xếp thứ tự sau : đá lớn, đá dăm, cát to, cát mịn. Các VSV và chất bẩn được giữ lại ở các lớp cát mịn sâu dưới đáy. Sau một thời gian sẽ xuất hiện một lớp keo. Những tế bào VSV phủ lên bề mặt cát, làm bít những lỗ nhỏ trên đó. Khối keo này làm tăng hiệu quả của bể lọc để loại trừ VSV, nhưng lại làm giảm tốc độ lọc nên thường phải làm vệ sinh.

- Lọc nhanh bằng cát : Sử dụng bể lọc có nhiều ngăn và có dòng chảy lớn, lọc nhanh được. Trước khi lọc cho thêm một chất đông lắng như muối nhôm làm tăng sự lắng đọng, làm cho nước được làm trong trước khi lọc, sẽ nhanh và sẽ có hiệu quả hơn.

d) *Khử trùng*

Đây là bước cuối cùng để làm sạch nước, thường sử dụng các biện pháp :

- Sử dụng clo và các hợp chất có chứa clo :

Tác động của clo, hipoclorit, các hợp chất của cloramin đều có thể sử dụng làm sạch nước. Việc làm sạch nước bằng clo và các hợp chất của clo phụ thuộc vào nhiều yếu tố, trong đó có các yếu tố chủ yếu là :

+ Nồng độ clo thực tế và thời gian tác động ; số lượng và chủng loại VSV hiện có ; số lượng các hợp chất hữu cơ, nồng độ của ion hidro và nhiệt độ.

+ Nếu nước ít VSV và hợp chất hữu cơ thì lượng clo dùng thấp.

+ Clo không diệt được tất cả các VSV trong nước.

- Tia cực tím :

Nước không có chất hữu cơ và ít VSV có thể làm sạch bằng tia cực tím. Phương pháp xử lí này thường được dùng cho nước đã đóng chai vì nó không gây mùi lạ cho nước.

- Dùng ôzôn (O_3) :

Ở các nước phát triển được dùng rộng rãi, nhưng không được thông dụng do khá đắt, tuy rằng hiệu quả khử trùng cao và nước không có mùi vị lạ.

nd Split Unregistered Version - http://www.simpopdf.com

2.2.8. Xác định giá trị của nước

- Tiêu chuẩn nước dùng trong sinh hoạt là : không có hợp chất hữu cơ, không có mùi vị lạ, không có các sản phẩm hoá học gây độc, không có VSV gây bệnh.

Nước đạt các tiêu chuẩn trên gọi là nước "sạch", nước "tinh khiết".

- Muốn xác định nước có bị ô nhiễm hay không và nhiễm ở mức độ nào, từ đó có thể suy ra nước có khả năng gây bệnh hay không, người ta có thể xác định sự có mặt của vi khuẩn *Escherichia coli* và *Aerobacter*, vì vi khuẩn này luôn có số lượng lớn trong chất thải. Loại vi khuẩn này được coi là vi khuẩn chỉ điểm, nên việc phát hiện thấy vi khuẩn này cho ta xác định được nước đã bị ô nhiễm và có mang VSV gây bệnh. Từ đó định ra biện pháp xử lí để tránh gây ra dịch bệnh thông qua nguồn nước.

Thông qua phân tích có thể xác định được tổng số vi khuẩn có trong nước.

Nước đảm bảo vệ sinh dùng trong sinh hoạt phải đạt chỉ tiêu về mặt vi sinh vật học.

2.3. Phân bố vi sinh vật trong không khí

2.3.1. Sự tồn tại của vi sinh vật trong không khí

- Không khí được coi là môi trường không thuận lợi cho sự phát triển của VSV, thiếu dinh dưỡng, khô, luôn bị ánh sáng mặt trời chiếu sáng và mưa rửa trôi bụi bẩn trong không khí.

- Sự nhiễm VSV chủ yếu là từ đất, gió thổi bụi bẩn trong đất có mang VSV tung vào không khí, ngoài ra còn từ nước do bốc hơi nước, hay hơi thở của người và động vật.

- Hệ VSV trong không khí có quan hệ với các nhân tố :

+ Hệ VSV có trong đất : số lượng, chủng loại VSV trong đất ở một vùng nào đó phản ánh số lượng và chủng loại VSV trong không khí ở vùng đó.

+ Sự hoạt động của người, động vật và các phương tiện cần thiết cho sinh hoạt của người. Nơi tập trung dân, tập trung súc vật và sự hoạt động của người và súc vật lớn thì số lượng và chủng loại VSV lớn.

+ Tầng không khí : không khí càng gần mặt đất thì số lượng VSV càng lớn, càng lên cao càng giảm.

+ Thời tiết khí hậu : nắng và mưa có tác dụng làm giảm VSV trong không khí. Trời khô hanh, nhiều gió sẽ tăng lượng VSV trong không khí.

2.3.2. Biện pháp làm sạch không khí

- Trong không khí thường tồn tại chủ yếu là vi khuẩn, bào tử mốc và một số ít các nhóm khác. Chúng tồn tại dưới dạng các tế bào khô, bào tử

nd Split Unregistered Version - http://www.simpopdf.com

(hay nha bào) tự do hoặc dính vào cát bụi và chúng được di chuyển trong không khí là nhờ gió.

- VSV trong không khí có thể bị tiêu diệt hay bị khử do một hay nhiều tác nhân có sẵn trong điều kiện tự nhiên như : lắng đọng, rửa và tia cực tím.

+ Các tế bào VSV có khối lượng riêng nhỏ hơn không khí cho nên khi không có gió, chúng có xu hướng lắng đọng xuống, đặc biệt khi chúng bám vào bụi thì càng dễ lắng đọng.

+ Mưa có tác dụng dội rửa VSV trong không khí.

+ Tia cực tím của ánh sáng mặt trời có tác dụng khử trùng.

- Trong thực tiễn người ta sử dụng một số biện pháp sau :

+ Phương pháp lọc : sử dụng các vật liệu, nguyên liệu để lọc như dùng bông có tác dụng giữ VSV với bụi bẩn trong không khí. Ví dụ : việc dùng nút bông làm nút các ống môi trường, VSV sẽ bị giữ lại qua nút bông này ; máy điều hoà nhiệt độ có khả năng lọc không khí đi qua. Việc dùng khẩu trang khi mổ và khi làm việc nơi nhiều bụi bẩn.

+ Khử trùng bằng tác nhân vật lí : dùng đèn tử ngoại để khử trùng không khí trong phòng mổ, phòng thí nghiệm VSV, phòng lên men. Dùng phương pháp nung nóng không khí cục bộ bằng đèn cồn như trong cấy truyền VSV.

+ Khử trùng bằng hoá chất : như xông phòng bằng hơi foocmon pha trong thuốc tím.

+ Việc làm sạch không khí tránh ô nhiễm vi khuẩn gây bệnh phụ thuộc rất nhiều vào con người. Đó là vấn đề làm sạch môi trường ăn, ở, sinh hoạt của người và gia súc, vấn đề xử lí chất thải, vấn đề xây dựng nhà cửa hợp lí và khoa học, xây dựng đường sá giao thông, trồng cây gây rừng có ý nghĩa rất lớn đến việc làm sạch không khí.

HƯỚNG DẪN ÔN TẬP

1. Ảnh hưởng của nhân tố vật lí đến VSV.
2. Ảnh hưởng của nhân tố hoá học đến VSV.
3. Ảnh hưởng của nhân tố sinh học đến VSV.
4. Tiêu độc và khử trùng.
5. Sự phân bố của VSV trong đất (đất là môi trường sống tốt nhất của VSV).
6. Sự phân bố của VSV trong nước (trong ao, hồ, sông, suối, biển).
7. Sự phân bố của VSV trong không khí ? (các con đường xâm nhập của VSV vào không khí).
8. Biện pháp làm sạch VSV trong nước và trong không khí.

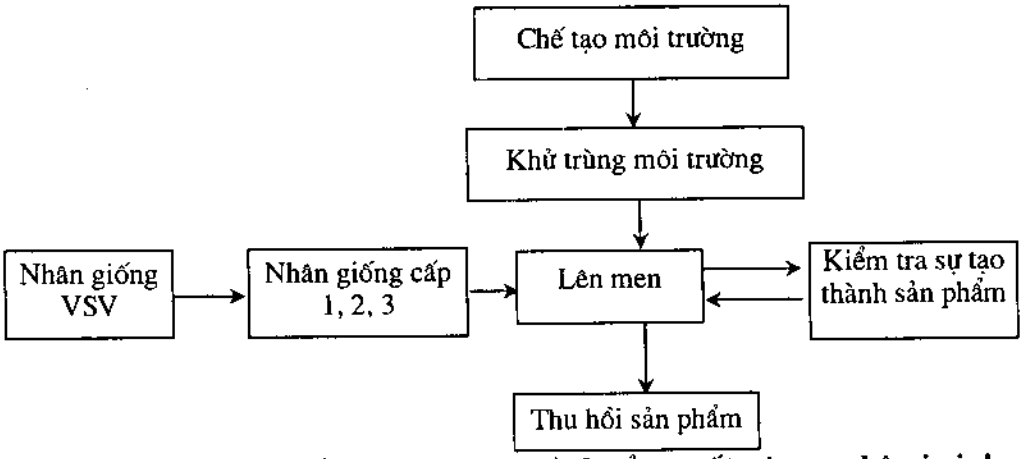
Split Unregistered Version - http://www.simpopdf.com

Chương 7

VI SINH VẬT ỨNG DỤNG TRONG CÔNG NGHIỆP LÊN MEN

I - NHỮNG NGUYÊN TẮC CƠ BẢN CỦA NUÔI CẤY VI SINH VẬT CÔNG NGHIỆP

1.1. Quy trình lên men cổ điển được tiến hành theo các giai đoạn sau :



1.2. Các bước chính trong quy trình sản xuất công nghệ vi sinh công nghiệp

1.2.1. Giống vi sinh vật

Muốn có sản phẩm tốt, ngoài quy trình công nghệ, thì khâu giống là quan trọng nhất, nó quyết định chất lượng sản phẩm và giá trị kinh tế của quy trình công nghệ sản xuất.

Trong công nghệ lên men, người ta sử dụng rộng rãi nhiều loại VSV thuộc nhóm Procaryote (vi khuẩn, xạ khuẩn, vi khuẩn lam) và nhóm Eucaryote (nấm men, nấm mốc, tảo).

a) *Tiêu chuẩn của giống*

- Chủng VSV được coi là chủng tốt trong sản xuất, phải có tính ưu việt sau :

Chủng phải có khả năng sinh tổng hợp tạo sinh khối với hiệu suất cao và phải có thêm những đặc điểm sau :

+ Có khả năng sử dụng các nguyên liệu rẻ tiền, dễ kiếm như các phụ phẩm, các nguyên liệu thô, các phế thải v.v...

Split Unregistered Version - http://www.simpopdf.com
+ Trong quá trình lên men không tạo ra các phẩm phụ mà người sản xuất mong muốn.

+ Ít mẫn cảm đối với sự tạp nhiễm do VSV khác hoặc do phage.

+ Sản phẩm sinh khối có thể tách dễ dàng ra khỏi môi trường dinh dưỡng.

Tuy nhiên trong quá trình sản xuất, các tiêu chuẩn trên không phải gắn liền với nhau và cùng tồn tại ở một số đối tượng VSV nào đó. Các VSV thuộc nhóm Eucaryote có kích thước tế bào lớn thể hình sợi, do đó dễ tách chúng ra khỏi môi trường dinh dưỡng bằng phương pháp lọc li tâm thường. Nhưng ở chúng thường tồn tại một quy tắc chung là kích thước tế bào tỉ lệ nghịch với hoạt tính trao đổi chất.

- Việc chọn chủng VSV cho một quy trình công nghệ là hết sức quan trọng, để chọn được chủng có hoạt tính cao, người ta phải tìm cách hoàn thiện genotipe của chúng với các phương pháp sau : chọn lọc, lai tạo, gây đột biến trong chất liệu di truyền của tế bào hoặc trong hệ thống điều hòa trao đổi chất. Gần đây người ta đã sử dụng các phương pháp di truyền hiện đại để tạo các chủng giống có những tính chất mong muốn một cách chủ động, do đó các chủng dùng trong sản xuất ngày càng hoàn hảo hơn, đáp ứng ngày một tốt hơn yêu cầu của con người.

b) *Các công việc chủ yếu của công tác giống trong sản xuất*

Trong sản xuất, việc hoạt hóa giống, thường xuyên kiểm tra chất lượng của giống là điều hết sức cần thiết và không thể thiếu. Muốn làm được khâu này được tốt, cần phải làm các phần việc sau :

- Kiểm tra độ thuần khiết của giống trong lên men.

- Kiểm tra khả năng hồi biến của giống. Hầu hết các chủng VSV dùng trong sản xuất là đột biến, do đó phải kiểm tra xem chúng có hồi trở lại giống gốc của chúng hay không, hiện tượng này rất hay xảy ra.

- Hoạt hóa giống sau một thời gian sử dụng. Để hoạt hóa giống người ta thường sử dụng môi trường nuôi cấy giàu các chất kích thích sinh trưởng như cao nấm men, nước chiết cà chua, hỗn hợp vitamin, axit béo.

- Giữ giống bằng phương pháp thích hợp để có thể duy trì những hoạt tính ưu việt của chúng, chống thoái hóa giống, mất hoạt tính.

c) *Các phương pháp giữ giống*

Hiện nay thường sử dụng 4 phương pháp chính để giữ giống VSV :

- Bảo quản trên môi trường thạch bằng, định kì kiểm tra cấy truyền :

Split Unregistered Version - http://www.simpopdf.com

Giống VSV được giữ trên môi trường thạch nghiêng (đối với các giống VSV hảo khí) hoặc chích sâu vào môi trường thạch (đối với VSV yếm khí). Các ống giống được bảo quản trong tủ lạnh ở nhiệt độ 3 - 5°C. Định kì để cấy truyền giống, tuỳ từng nhóm VSV khác nhau, mà định kì cấy truyền khác nhau, song giới hạn tối đa là 3 tháng.

Để công tác giữ giống được tốt, lâu hơn và đỡ bị tạp hơn, người ta thường phủ lên môi trường đã được cấy giống VSV một lớp dầu khoáng như parafin lỏng. Lớp parafin này sẽ hạn chế được sự tiếp xúc của VSV đối với oxi không khí và hạn chế sự thoát hơi nước của môi trường thạch, do vậy giống có thể bảo quản được lâu hơn và không bị nhiễm tạp, thoái hóa.

- Giữ giống trong cát hoặc trong đất sét vô trùng :

Do cấu trúc hóa lí, cát và sét là những cơ chất tốt mang các tế bào VSV, chủ yếu là nhóm VSV có bào tử. Cách làm như sau : Cát và đất được xử lí sạch, sàng lọc qua rây, xử lí pH đạt trung tính, sấy khô và khử trùng. Sau đó bằng thao tác vô trùng, trộn bào tử vào cơ chất cát hoặc đất sét trong các ống nghiệm. Dùng parafin nóng chảy phết lên nút bông của ống nghiệm để giúp cho ống giống không bị ẩm trở lại.

Ngoài giữ giống trong cát và đất sét, người ta còn giữ trong hạt ngũ cốc hay trên silicagen v.v... Phương pháp bảo quản giống trên chủ yếu cho nấm mốc và xạ khuẩn.

- Giữ giống bằng phương pháp lạnh đông :

Phương pháp này dựa trên nguyên tắc ức chế sự phát triển của VSV, đưa chúng vào điều kiện lạnh sâu ở - 25°C đến - 70°C. Người ta trộn VSV với dung dịch bảo vệ hay còn gọi là dung dịch nhũ hóa như glixerin 15%, huyết thanh ngựa (loại không cho chất bảo quản), dung dịch glucozơ hoặc lactozơ 10%.....Việc làm lạnh được tiến hành một cách từ từ. Khi độ lạnh đạt -20°C, nếu tiếp tục làm lạnh thì phải đạt tốc độ làm lạnh 1- 2°C/ phút.

Phương pháp bảo quản này có nhiều ưu điểm, đó là bảo quản được lâu :

+ Nếu giữ ở nhiệt độ -15°C đến -20°C thì 6 tháng cấy truyền lại 1 lần.

+ Nếu giữ ở nhiệt độ -30°C thì 9 tháng cấy truyền lại 1 lần.

+ Nếu giữ ở nhiệt độ -40°C thì 12 tháng cấy truyền lại 1 lần.

+ Nếu giữ ở nhiệt độ -50°C thì 3 năm cấy truyền lại 1 lần.

+ Nếu giữ ở nhiệt độ -70°C thì 10 năm cấy truyền lại 1 lần.

Split Unregistered Version - http://www.simpopdf.com

- Giữ giống bằng phương pháp đông khô :

Về nguyên tắc cũng giống như phương pháp lạnh đông, nhưng khác ở chỗ là đưa chất bảo vệ vào như : Glutamat 3% hay lactozơ 1,2% + pepton 1,2% hay saccarozơ 8% + sữa 5% + gelatin 1,5%.

Điều khác biệt với phương pháp lạnh đông là : Để đảm bảo an toàn hơn cho sự sống của tế bào giống, người ta làm thăng hoa phần nước ở trong tế bào và môi trường có chất bảo vệ trong thiết bị đông khô ở áp suất 1.10^{-4}mmHg. Hỗn hợp tế bào giống và dung dịch bảo vệ được chứa trong các ampul thuỷ tinh có đường kính 10mm - 15mm được hàn kín để đảm bảo độ khô và chân không cần thiết, những ampul này được bảo quản ở nhiệt độ 3-5^{0}C hay ở nhiệt độ trong phòng.

Đây là phương pháp bảo quản tối ưu nhất hiện nay, có thể tới vài chục năm mới phải làm lại. Những năm gần đây, người ta đưa ra phương pháp giữ giống bằng ngân hàng gen để giữ giống VSV quý hiếm, song rất tốn kém trong việc giữ ngân hàng gen.

1.3. Nhân giống vi sinh vật

Mục đích của việc nhân giống là để tăng số lượng tế bào VSV. Trong quy trình lên men, thì tuỳ từng chủng giống VSV khác nhau, mà cần nhân theo cơ chất và môi trường nhân khác nhau. Thường có hai dạng giống : tế bào sinh dưỡng và bào tử.

1.3.1. Trường hợp giống là tế bào sinh dưỡng

Để thu được lượng tế bào sinh dưỡng, người ta thường chọn môi trường nhân sinh khối. Môi trường phải đảm bảo cho VSV tồn tại và thích hợp nhất với thời gian ngắn nhưng cho sinh khối VSV lớn nhất. Trong trường hợp này thường dùng môi trường dịch thể (nuôi cấy chìm).

1.3.2. Trường hợp giống là bào tử hay conidi

Thông thường chọn môi trường đặc (nuôi cấy bán rắn có cám gạo, bột bắp, thóc, trấu, mùn cưa..).

Nuôi cấy nấm mốc và xạ khuẩn thường là thời gian khá dài để tạo bào tử. Bào tử được thu hồi bằng nhiều cách : Dùng máy hút (như hút bụi) hay dùng chổi lông mềm quét lên bề mặt của môi trường bán rắn để thu hồi giống.

Bào tử được thu hồi cho vào bình khô có gắn miệng bình bằng parafin, bảo quản nơi thoáng mát và sử dụng hàng năm.

1.3.3. Các bước tiến hành nhân giống

Trong công nghiệp, người ta thường nhân với lượng lớn sinh khối VSV bằng các bước như sau :

Split Unregistered Version - http://www.simpopdf.com

Giữ giống bằng phương pháp đông khô

Về nguyên tắc cũng giống như phương pháp lạnh đông, nhưng khác ở chỗ là đưa chất bảo vệ vào như : Glutamat 3% hay lactozơ 1,2% + pepton 1,2% hay saccarozơ 8% + sữa 5% + gelatin 1,5%.

Điều khác biệt với phương pháp lạnh đông là : Để đảm bảo an toàn hơn cho sự sống của tế bào giống, người ta làm thăng hoa phần nước ở trong tế bào và môi trường có chất bảo vệ trong thiết bị đông khô ở áp suất 1.10^{-4}mmHg. Hỗn hợp tế bào giống và dung dịch bảo vệ được chứa trong các ampul thuỷ tinh có đường kính 10mm - 15mm được hàn kín để đảm bảo độ khô và chân không cần thiết, những ampul này được bảo quản ở nhiệt độ 3-5^{0}C hay ở nhiệt độ trong phòng.

Đây là phương pháp bảo quản tối ưu nhất hiện nay, có thể tới vài chục năm mới phải làm lại. Những năm gần đây, người ta đưa ra phương pháp giữ giống bằng ngân hàng gen để giữ giống VSV quý hiếm, song rất tốn kém trong việc giữ ngân hàng gen.

1.3. Nhân giống vi sinh vật

Mục đích của việc nhân giống là để tăng số lượng tế bào VSV. Trong quy trình lên men, thì tuỳ từng chủng giống VSV khác nhau, mà cần nhân theo cơ chất và môi trường nhân khác nhau. Thường có hai dạng giống : tế bào sinh dưỡng và bào tử.

1.3.1. Trường hợp giống là tế bào sinh dưỡng

Để thu được lượng tế bào sinh dưỡng, người ta thường chọn môi trường nhân sinh khối. Môi trường phải đảm bảo cho VSV tồn tại và thích hợp nhất với thời gian ngắn nhưng cho sinh khối VSV lớn nhất. Trong trường hợp này thường dùng môi trường dịch thể (nuôi cấy chìm).

1.3.2. Trường hợp giống là bào tử hay conidi

Thông thường chọn môi trường đặc (nuôi cấy bán rắn có cám gạo, bột bắp, thóc, trấu, mùn cưa..).

Nuôi cấy nấm mốc và xạ khuẩn thường là thời gian khá dài để tạo bào tử. Bào tử được thu hồi bằng nhiều cách : Dùng máy hút (như hút bụi) hay dùng chổi lông mềm quét lên bề mặt của môi trường bán rắn để thu hồi giống.

Bào tử được thu hồi cho vào bình khô có gắn miệng bình bằng parafin, bảo quản nơi thoáng mát và sử dụng hàng năm.

1.3.3. Các bước tiến hành nhân giống

Trong công nghiệp, người ta thường nhân với lượng lớn sinh khối VSV bằng các bước như sau :

Split Unregistered Version - http://www.simpopdf.com

a) *Giai đoạn trong phòng thí nghiệm (gọi là nhân giống cấp I)*

Đây là giai đoạn cấy giống VSV thuần khiết từ ống giống, đem nhân ở môi trường dinh dưỡng chuyên tính vô trùng, nuôi cấy trong phòng thí nghiệm, nhằm đáp ứng đủ lượng giống cần thiết cho bước tiếp theo.

b) *Giai đoạn ở xưởng (nhân giống sản xuất)*

Đây là giai đoạn cần nhân một lượng giống lớn để đáp ứng giống cho sản xuất. Từ giống cấp 1 ; 2 ; 3, nhân trong nồi lên men hay trong cơ chất đặc (chất mang).

Khi kết thúc mỗi khâu nhân giống, cần kiểm tra ngay độ thuần của giống và mật độ tế bào VSV cần nhân.

1.4. Lên men

Là giai đoạn nuôi cấy VSV để chúng tạo sản phẩm hoặc sinh khối VSV, hoặc là sản phẩm trao đổi chất v.v... Đây là khâu quyết định kết quả của một quy trình lên men.

Để thực hiện lên men, người ta thường sử dụng hai phương pháp là lên men bề mặt và lên men chìm.

1.4.1. Khái niệm lên men bề mặt

Là thực hiện nuôi cấy VSV trên bề mặt môi trường dịch thể hoặc bán rắn.

- Nuôi cấy trên bề mặt dịch thể (dùng cho nhóm VSV hảo khí) : Tuỳ từng loại VSV khác nhau, mà chọn môi trường thích hợp khác nhau. Môi trường được pha loãng với nồng độ thích hợp, sau đó bổ sung nguồn nitrogen (N), nguồn khoáng v.v... Khi môi trường cho vào thiết bị lên men phải đảm bảo cho cột môi trường có bề mặt thoáng, rộng. Nuôi cấy theo phương pháp này đơn giản, nhưng đòi hỏi diện tích sử dụng lớn, khó tự động hóa quy trình sản xuất. Hiện nay phương pháp này ít được sử dụng.

- Nuôi cấy bề mặt sử dụng môi trường bán rắn : Có thể dùng VSV hảo khí hoặc bán hảo khí hoặc yếm khí. Ở phương pháp lên men này nguyên liệu thường dùng là :

+ Các loại hạt : thóc, gạo, nếp, đậu tương v.v...

+ Các loại mảnh : mảnh sắn, mảnh bắp v.v...

+ Các loại phế liệu hữu cơ : bã mía, trấu, cọng rơm rạ, rác thải sinh hoạt v.v...

Các loại nguyên liệu chứa tinh bột trước khi sử dụng phải xử lí bằng cách nấu chín, ngoài các nguyên liệu nói trên người ta phải bổ sung các chất dinh dưỡng vào môi trường để đảm bảo dinh dưỡng cho VSV trong quá trình nhân sinh khối (lên men).

Split Unregistered Version - http://www.simpopdf.com

Đối với VSV hảo khí cần phải có quạt thổi khí vô trùng. Trong lên men bán rắn, ngoài yêu cầu về nguyên liệu, thì độ ẩm là rất cần thiết cho quá trình lên men. Phải luôn luôn đảm bảo độ ẩm 60- 75% (độ ẩm không khí 90- 100%). Phương pháp lên men bán rắn được sử dụng khá rộng ở khắp thế giới. Phương pháp này thường sử dụng để :

+ Sản xuất kháng sinh dùng trong chăn nuôi.

+ Sản xuất enzym từ nấm mốc.

+ Làm tương.

+ Đường hóa tinh bột để sản xuất rượu ethanol từ nấm men.

1.4.2. Khái niệm về lên men chìm

- Dùng cho cả VSV hảo khí và yếm khí :

Khi lên men chìm, VSV được nuôi cấy ở môi trường dịch thể, chúng sẽ phát triển theo chiều đứng của cột môi trường.

Để thực hiện quá trình lên men chìm, cần thực hiện qua các bước sau :

+ Thực hiện quá trình khuấy đảo và sục khí :

Quá trình lên men chìm, VSV phát triển trong các nồi lên men cần được trộn đều để tăng cường diện tiếp xúc giữa tế bào và môi trường dinh dưỡng, đồng thời ngăn cản sự kết lắng của tế bào. Để thực hiện việc này, trong các thiết bị lên men, người ta lắp hệ thống cánh khuấy, hệ thống này cần cả cho VSV hảo khí và yếm khí. Đối với VSV hảo khí, nó có tác dụng đảm bảo cung cấp oxi đầy đủ theo yêu cầu của từng loại VSV, là một trong những thiết bị rất quan trọng của thiết bị lên men. Do vậy trong trường hợp này, người ta còn lắp thêm hệ thống sục khí. Không khí trước khi được bơm vào nồi lên men phải xử lí để đảm bảo sạch về cơ học (sạch bụi) và vô trùng (không có VSV) bằng cách cho đi qua một hệ thống lọc bằng bông thuỷ tinh và khử trùng bằng hơi nóng. Tuỳ từng chủng loại VSV khác nhau và tuỳ vào từng giai đoạn lên men khác nhau, mà cần cường độ thông khí khác nhau.

+ Theo dõi sự tạo bọt trong lên men và biện pháp phá bọt :

Khi tiến hành khuấy đảo và sục khí mạnh, liên tục, trong nồi lên men sẽ tạo ra bọt, nó có khuynh hướng trào ra khỏi nồi lên men và gây nhiễm tạp môi trường lên men, ngoài ra bọt khí cũng cản trở sự tiếp xúc giữa VSV và môi trường dinh dưỡng. Do vậy trong quá trình lên men, người ta cần kiểm soát lượng bọt tạo thành và tìm cách phá huỷ chúng. Để phá bọt, người ta thường dùng các chất tự nhiên như : dầu thực vật (dầu lạc), mỡ cá heo v.v... và các chất được tổng hợp theo con đường hóa học.

Split Unregistered Version - http://www.simpopdf.com

+ Điều chỉnh pH của môi trường lên men :

Mỗi loại VSV thích hợp với pH nhất định của môi trường nuôi cấy. Trong quá trình lên men, VSV luôn tạo ra các sản phẩm mang tính axit hoặc kiềm làm cho pH môi trường thay đổi. pH thay đổi sẽ không thích hợp cho hoạt động sống của chính VSV ấy. Vì vậy việc chủ động điều chỉnh pH môi trường là rất cần thiết trong suốt quá trình sản xuất.

Người ta có thể điều chỉnh pH môi trường trong quá trình lên men bằng các dung dịch NaOH, HCl, NH_4OH, urê, hay bổ sung dịch đệm photphat....., nhưng vẫn phải đảm bảo điều kiện vô trùng.

+ Theo dõi và điều chỉnh nhiệt độ của môi trường lên men :

Nhiệt độ là yếu tố rất quan trọng ảnh hưởng rất lớn đến sự phát triển của VSV và hiệu quả lên men. Mỗi loại VSV thích ứng ở nhiệt độ thích hợp, để sinh trưởng, tạo sản phẩm.

Quá trình lên men luôn luôn có sự toả nhiệt rất mạnh, do đó nhiệt độ trong thiết bị lên men thường tăng rất mạnh, vượt quá ngưỡng của nhiệt độ thích hợp cho VSV. Vì vậy phải thường xuyên giám sát và điều chỉnh nhiệt độ theo yêu cầu của quá trình lên men. Để làm được việc này người ta thường trang bị hệ thống làm nguội, bằng cách cho nước chảy qua nồi lên men hay cho vào nồi hệ thống ống ruột gà làm nguội, nhằm giảm nhiệt độ.

+ Tiếp thêm nguyên liệu và bổ sung các chất tiền thể :

* Việc thực hiện bổ sung nguyên liệu trong quá trình sản xuất là việc làm cần thiết, vì có một số chất không cho phép đưa vào quy trình lên men ngay từ đầu với nồng độ và hàm lượng cao (như đường phải bổ sung nhiều đợt với nồng độ thấp).

* Đối với một số quy trình sinh tổng hợp một số chất (như vitamin B_{12}, cần thiết phải bổ sung chất tiền thể của vitamin B_{12} là 5,6 dimethilbenzimidazol sau một thời gian lên men nhất định).

- Ngoài theo dõi nghiêm ngặt các vấn đề trên, trong quá trình lên men phải lấy mẫu để kiểm tra các chỉ tiêu sau :

+ Trạng thái tế bào của chủng, giống dùng trong quá trình lên men và độ tạp khuẩn.

+ Kiểm tra sự tiêu hao năng lượng, sự tạo thành sản phẩm trong quá trình lên men.

- Điều cuối cùng cũng là quan trọng nhất, đó là xác định thời gian của quá trình lên men. Tuỳ từng quy trình lên men khác nhau, mà thời gian lên men khác nhau. Người sản xuất phải nắm rất chắc thời gian lên men này để thu hồi sản phẩm với hiệu suất cao nhất.

Split Unregistered Version - http://www.simpopdf.com
Lên men chìm là phương pháp được phổ biến rộng nhất trong quy trình lên men công nghiệp, vì người ta có thể kiểm soát được toàn bộ các khâu trong quá trình lên men một cách dễ dàng. So với phương pháp lên men bề mặt, thì lên men chìm có nhiều ưu điểm, đó là : ít choán bề mặt (không mất nhiều diện tích), dễ cơ giới hóa và tự động hóa trong quá trình theo dõi.

Tuy nhiên, phương pháp lên men chìm đòi hỏi đầu tư nhiều kinh phí cho trang thiết bị, ngoài ra nếu một mẻ lên men, vì một lí do nào đó bị xử lí thì không thể xử lí cục bộ được, đa phần phải hủy bỏ cả quá trình lên men, gây thất thu, tốn kém lớn ; ngoài ra, khi phế liệu của quá trình lên men thải ra, phải kèm theo công nghệ xử lí chống ô nhiễm môi trường.

1.5. Thu hồi sản phẩm

1.5.1. Việc thu hồi sản phẩm với hiệu suất cao có ý nghĩa quyết định đối với tính kinh tế của quy trình công nghệ. Vì vậy việc tách, thu hồi sản phẩm phải được lưu ý ngay từ khi chọn giống, chủng VSV để lên men, chọn nguyên liệu cũng như môi trường dinh dưỡng. Khi quá trình lên men kết thúc, người ta tiến hành thu hồi sản phẩm. Các sản phẩm của quá trình tổng hợp VSV thường được tích luỹ hoặc ở trong tế bào hoặc trong dung dịch nuôi cấy.

- Việc đầu tiên là tách tế bào VSV ra khỏi pha lỏng của dịch lên men :

+ Nếu là các VSV có cấu tạo hệ sợi như nấm, tảo, người ta dùng phương pháp lọc vớt.

+ Nếu là các VSV đơn bào, có kích thước tế bào nhỏ như nấm men, vi khuẩn... dùng phương pháp li tâm, thường li tâm ở tốc độ cao.

- Việc xử lí tiếp theo, thu hồi sản phẩm phụ thuộc vào mục tiêu của công nghệ. Thông thường người ta hay dùng các phương pháp sau : chiết rút, hấp phụ, kết tủa, kết tinh, sắc kí, điện li, phân tích quang phổ hấp phụ v.v...

1.5.2. Để tính hiệu quả kinh tế của một quy trình công nghệ cũng như tính khả thi của xí nghiệp, nhà máy lên men, người ta thường xây dựng thành khu liên hợp các xí nghiệp có mối quan hệ sản xuất gần nhau, hoặc khép kín công nghệ từ A đến Z.

- Về vấn đề năng lượng : Sẽ sử dụng được triệt để hơn nguồn năng lượng trong quá trình lên men. Ví dụ : Một nồi lên men phục vụ cho xí nghiệp này sản xuất, xí nghiệp khác có thể ở giai đoạn chuẩn bị để kế tiếp nhau lên men ; ngoài ra có thể sử dụng năng lượng dư thừa để sấy sản phẩm, sưởi ấm các phòng, phân xưởng sản xuất (vào mùa lạnh).

- Về vấn đề nguyên liệu : Do đặc điểm của từng công nghệ và mục tiêu của từng xí nghiệp nhà máy, mà xí nghiệp này có thể sử dụng phế liệu của

Split Unregistered Version - http://www.simpopdf.com
xí nghiệp kia làm nguyên liệu đầu vào. Ví dụ : Nhà máy sản xuất axit glutamic cần cao ngô. Người ta xây dựng xí nghiệp sản xuất cao ngô ngay cạnh nhà máy này. Hạt ngô sau khi ngâm lấy nước chiết làm cao ngô, sẽ được sử dụng làm nguyên liệu cho xí nghiệp sản xuất tinh bột v.v...

- Vấn đề xử lí nước thải, chất thải : Xử lí ô nhiễm do hoạt động của các nhà máy, xí nghiệp thực phẩm chế biến rau, quả, đông lạnh... thường được liên kết chặt với các xí nghiệp xử lí môi trường, tái chế các phế thải vào các mục đích khác nhau. Ví dụ : Xí nghiệp xử lí bùn mía thành phân hữu cơ bón cho cây trồng, được xây dựng cạnh nhà máy đường...

II - DINH DƯỠNG CỦA VI SINH VẬT VÀ NGUYÊN LIỆU NUÔI CẤY VI SINH VẬT CÔNG NGHIỆP

Nuôi cấy VSV ở bất cứ quy mô nào (phòng thí nghiệm, nhân giống cấp 1, 2, 3 hay trong nồi lên men) đều phải đảm bảo đầy đủ các nguyên tố dinh dưỡng cho VSV hoạt động, nhân sinh khối, tạo sản phẩm.

Nguyên tố dinh dưỡng của VSV là : các nguyên tố đa lượng, vi lượng và các vitamin...(trong giáo trình VSV đại cương đã học). Tuy vậy, trong lên men công nghiệp cũng có chỗ khác biệt đáng lưu ý. Người ta không bổ sung nguyên tố vi lượng ở dạng dung dịch tinh khiết vào môi trường lên men, mà có sự bổ sung cùng lúc với các nguyên tố đa lượng. Các nguyên tố đa lượng được bổ sung dưới tạp hợp chất (rỉ đường, cao ngô, gạo...).

Thông thường các tạp chất này chứa một lượng các nguyên tố vi lượng cần thiết và đủ cho VSV.

2.1. Các hợp chất cung cấp nguồn các bon

2.1.1. Rỉ đường : Có hai loại là rỉ đường mía và rỉ đường củ cải.

a) *Rỉ đường mía*

Là phụ phẩm thu được của công nghiệp ép mía thành đường sau khi đã thu saccacrozơ.

- Thu nhận rỉ đường trong quá trình sản xuất đường saccarozơ :

Đường mía thô gồm hai hợp phần : Các tinh thể đường saccarozơ và mật bao bọc phía ngoài có chứa đường, các chất không phải là đường và các chất màu.

+ Theo quy trình sản xuất, đường thô được tinh luyện, li tâm, lắng trong, làm sạch bằng phương pháp cacbonate (lắng trong bằng vôi) cho bão hòa CO_2, sau đó được đem lọc và sunfit hóa. Tiếp theo, dịch đã làm sạch được cô trong thiết bị chân không, thu được dịch đường non I. Dịch này sẽ đem li tâm cho ra đường trắng. Còn cặn có màu được xử lí 3 lần để thu hồi đường loại II, III và IV. Phần cuối cùng còn lại là rỉ đường. (Quy trình sản xuất đường của Cộng hòa liên bang Nga).

Split Unregistered Version - http://www.simpopdf.com

+ Vậy thì có thể nói rỉ đường là hỗn hợp khá phức tạp, ngoài hàm lượng đường, còn có chứa các hợp chất nitrogen, các vitamin và các hợp chất vô cơ. Ngoài ra trong rỉ đường còn chứa một số chất keo, VSV tạp nhiễm bất lợi cho quá trình lên men sau này, vì vậy tuỳ theo mục đích sử dụng khác nhau, mà người ta cần xử lí rỉ đường trước khi đưa vào sử dụng làm môi trường nuôi cấy VSV trong công nghiệp lên men.

- Thành phần rỉ đường : Phụ thuộc vào phương pháp sản xuất đường, điều kiện bảo quản rỉ đường và vào hàm lượng các nguyên tố trong thân cây mía.

Trong rỉ đường mía có : 15 - 20% nước, 80 - 85% chất khô hòa tan. Trong chất khô thấy có các thành phần sau :

+ Đường tổng số hay đường lên men trên 50%, trong đó đường saccarozơ chiếm 30- 35%, đường khử chiếm 15- 20% (glucozơ, fructozơ). Đôi khi có cả rafinozơ cũng như các chất khử không lên men được đó là : caramel và melanoidin, sản phẩm ngưng tụ giữa đường và axit amin, các chất khử không lên men chiếm 1,7% khối lượng rỉ đường.

Thành phần chất thô còn lại của rỉ đường chiếm dưới 50%, trong đó 30- 32% chất hữu cơ (axit aconitic chiếm 5%), 18- 20% chất vô cơ.

+ Trong rỉ đường mía chứa khá nhiều vitamin, trong đó đáng lưu ý là biotin (theo tài liệu của Andecofler), hàm lượng vitamin trong rỉ đường mía như sau : (Mol/g rỉ đường).

Thiamine : 8,3	Axit folic : 0,038
Riboflavine : 2,5	Pyridoxine (vitaminB_6) : 6,5
Axit nicotinic : 21,4	Biotin : 12,0

Khi bảo quản lâu, rỉ đường bị tổn thất đường rất lớn, do đó trong sử dụng rỉ đường cũng cần lưu tâm đến thời gian bảo quản rỉ đường.

BẢNG 7.1. THÀNH PHẦN CÁC NGUYÊN TỐ TRO TRONG RỈ ĐƯỜNG MÍA

Tài liệu	Thành phần (%)								
	K_2O	CaO	MgO	P_2O_5	Fe_2O_3	SiO_2	SO_4	Cl^-	Tổng
Mac- Djinnisa	3,5	1,5	0,1	0,2	0,2	0,5	1,6	0,4	8,0
Andercofler và Khiki	3,6	0,5	0,07	0,9	-	-	3,9	-	9,0

b) *Rỉ đường củ cải*

Là nước cốt sinh ra trong quá trình sản xuất đường từ củ cải đường. Dịch này được cô đặc có thể dùng lâu dài.

nd Split Unregistered Version - http://www.simpopdf.com
Thành phần của rỉ đường củ cải (%) như sau :

Saccarozơ : 48
Rafinozơ : 1
Đường chuyển hóa khác : 1
Các axit hữu cơ : 2

Trong rỉ đường, kể cả của củ cải và rỉ đường mía, ngoài thành phần kích thích sinh trưởng, còn chứa một số chất mà nếu dùng nó ở nồng độ cao sẽ kìm hãm sinh trưởng của VSV như SO_2, hidroximethilfurfurol...

2.1.2. Dịch kiềm sunfit : là một loại phế phẩm của công nghiệp sản xuất xenlulo

Khi sản xuất 1 tấn xenlulo gỗ dẻ sẽ thải ra ngoài 1000m^3 dịch kiềm sunfit. Dịch kiềm sunfit có thành phần : 80% chất khô là đường hexozơ (glucozơ, mannozơ, galactozơ), ngoài ra trong dịch kiềm sunfit có chứa axit ligninsulfuric. Axit này chưa được VSV sử dụng. Một điều đáng lưu ý là dịch kiềm sunfit có đặc tính hấp phụ nhiều O_2, cho nên khi nuôi cấy VSV hảo khí có thể giảm mức cung cấp O_2 tới 60% so với mức bình thường.

2.1.3. Tinh bột và xenlulo

Tinh bột được sử dụng dưới dạng hạt hoặc bột của khoai, sắn, lúa, đại mạch v.v...

Dạng nguyên liệu này trước khi sử dụng làm môi trường nuôi cấy VSV phải qua khâu xử lí và đường hóa. Đối với các chủng VSV có hệ enzym amilaza phát triển, có thể sử dụng trực tiếp tinh bột không thông qua khâu đường hóa.

Xenlulo được sử dụng dưới dạng : rơm, rạ, giấy, mùn cưa..., các loại nguyên liệu này tuỳ từng loại VSV khác nhau, mà đưa ra biện pháp xử lí khác nhau sao cho phù hợp.

2.1.4. Dầu thực vật (dầu dừa, dầu lạc, dầu đậu tương, dầu hạt bông, dầu hướng dương,.....) : Các loại dầu nói trên được dùng trong nuôi cấy VSV với tư cách là nguồn dinh dưỡng cacbon, ngoài ra còn là chất phá bọt trong quá trình lên men. Khi nuôi cấy, VSV có khả năng tiết ra enzym lipaza, sẽ phân huỷ các chất dầu này thành glixerin và các axit béo.

Lượng chất béo bổ sung vào môi trường phải rất phù hợp với hoạt động sống của VSV, nếu bổ sung quá nhiều sẽ làm chậm quá trình đồng hóa nguồn cacbonhydrat của VSV. Cụ thể sẽ làm tăng độ nhớt của môi trường, tạo các hạt nhũ tương của các loại xà bông, đặc biệt khi môi trường có $CaCO_3$ sẽ dẫn đến hiện tượng giảm oxi hòa tan, dẫn đến VSV sẽ phát triển kém, ảnh hưởng xấu đến hiệu suất lên men.

Split Unregistered Version - http://www.simpopdf.com

BẢNG 7.2. THÀNH PHẦN HÓA HỌC CỦA CÁC LOẠI DẦU THỰC VẬT (L.A. POPOVA VÀ CỘNG SỰ, 1961)

Các loại dầu	Axit béo (%)				
	Oleic	Linoleic	Palmitic	Stearic	Arachidic
Dầu lạc	50- 70	13- 26	6- 11	2- 6	5- 7
Dầu bắp	< 45	< 48	< 7,7	3,6	< 0,4
Dầu đậu tương	25- 36	52- 65	6- 8	3- 5	0,4- 10
Dầu bông	30- 35	40- 45	20- 22	2,0	0,1 - 0,6
Dầu lanh	13- 29	15- 30	9- 11	6- 7	-

2.1.5. Hidrocacbon

Từ lâu người ta đã biết có nhiều VSV có khả năng sống được ở mỏ dầu, mỏ khí đốt, ở đáy bể chứa dầu v.v...

- Nhiều công trình nghiên cứu cho thấy n- parafin là loại nguyên liệu tương đối vạn năng để nuôi cấy VSV. Theo số liệu của Fuch (1961) có 26 giống VSV, trong đó 75 loài có khả năng phân huỷ hidrocacbon mạch thẳng. Trong đó, vi khuẩn có khả năng phát triển trên nhiều loại hidrocacbon hơn là nấm men và nấm mốc. Cụ thể nó có thể phát triển trên các dãy alkan mạch thẳng, mạch nhánh, hidrocacbon thơm và khí thiên nhiên như : mêtan, êtan, propan... Nấm men chỉ phát triển trên n-alkan và alken. Nấm mốc phát triển trên n-alkan còn trên alkan mạch nhánh sinh trưởng kém hơn.

- Khả năng sử dụng hidrocacbon của VSV còn phụ thuộc vào các điều kiện sau :

+ Khả năng xâm nhập vào tế bào của hidrocacbon.

+ Sự tồn tại hệ thống enzym cần thiết để chuyển hóa các nguồn cacbon này, đặc biệt ở giai đoạn đầu của sự oxi hóa.

+ VSV phải bền vững với độc tính của hidrocacbon khi nồng độ cao.

2.2. Các hợp chất cung cấp nguồn nitrogen (nitơ)

Nitơ tham gia vào tất cả các cấu trúc trong tế bào VSV, giúp tế bào hoàn thiện mọi chức năng của hoạt động sống. Nguồn nitơ là nguồn dinh dưỡng quan trọng không kém nguồn cacbon.

Nitơ được cung cấp cho tế bào VSV dưới nhiều dạng khác nhau :

2.2.1. Dưới dạng các hợp chất vô cơ và hữu cơ khá thuần kiết như :

NH_4^+, NO_3^- , pepton các loại, các amino axit.

Trong lên men công nghiệp, người ta thường sử dụng nguồn nitơ dưới dạng sản phẩm thô, gọi là nguồn nitơ kĩ thuật, bao gồm các loại sau :

nd Split Unregistered Version - http://www.simpopdf.com

a) *Dịch thuỷ phân nấm men*

- Một trong những lí do con người quan tâm nhiều đến nấm men, vì trong tế bào nấm men chứa nhiều chất dinh dưỡng có giá trị, nổi bật là protein và vitamin. Hàm lượng protein của nấm men dao động trong khoảng 40 - 60% chất khô của tế bào. Về tính chất, protein của nấm men gần giống protein nguồn gốc của động vật, có chứa khoảng 20 amino axit, trong đó có đủ các amino axit không thay thế. Thành phần amino axit nấm men cân đối hơn so với ở lúa mì và trong các hạt ngũ cốc khác, kém chút ít so với ở trong sữa và bột cá. Vì vậy, dịch thuỷ phân nấm men là một loại dịch rất giàu chất bổ dưỡng, gồm amino axit, các peptit, các vitamin, đặc biệt là vitamin thuộc nhóm B.

- Người ta sử dụng nấm men thuỷ phân với mục đích bổ sung nguồn nitơ và nguồn các chất kích thích sinh trưởng vào môi trường nuôi cấy VSV.

- Có thể thu nhận nấm men bằng nhiều phương pháp khác nhau : bằng tác động của enzym ; phương pháp tự phân ở 45 - 50°C , pH = 6,2 ; phương pháp tiêu nguyên sinh chất bằng dung dịch NaCl ở nồng độ cao... Thành phần hóa học của các dịch thuỷ phân nấm men phụ thuộc vào nguyên liệu và quy trình sản xuất.

b) *Bột đậu nành*

Bột đậu nành sau khi tách dầu là một nguyên liệu lí tưởng dùng trong công nghệ vi sinh. Loại bột này chứa tới 40-50% protein, 30% hidratcacbon, hàm lượng dầu còn lại 1%, lecihin 1,8%.

c) *Cao ngô*

Có dạng lỏng màu nâu thẫm được tạo nên từ nước chiết ngâm ngô thông qua quá trình cô đặc. Thành phần của cao ngô : chất khô chiếm 40-50%, trong thành phần chất khô có chứa : 3-5% N, 1-3% đạm amin.

Trong cao ngô còn chứa một ít protein, một số amino axit tự do và các peptit có phân tử lượng thấp.

d) *Khô lạc hay bánh dầu phộng*

Là xác bã thu được sau khi ép lạc lấy dầu. Thành phần : giàu protein và một số axit béo. Hàm lượng đạm tổng số và đạm amin gần giống như ở cao ngô.

e) *Nước mắm, nước tương*

Nước mắm, nước tương cũng được sử dụng với vai trò là nguồn nitơ, vì nó có chứa khá đầy đủ các amino axit cần thiết.

- Nước mắm : là sản phẩm chế biến từ quá trình lên men tự nhiên, phân huỷ protein của cá dưới tác dụng của hệ enzym proteinaza. Nước mắm

Split Unregistered Version - http://www.simpopdf.com
có giá trị dinh dưỡng cao, có đầy đủ các amino axit hợp phần của protein. Thành phần : đạm : 15 - 25 g/l, đạm amin chiếm 60-70 % đạm tổng số.

- Nước tương : Là dịch thuỷ phân từ bánh dầu lạc hay dầu đậu nành bằng HCl hoặc thông qua quá trình thuỷ phân bằng enzym của nấm mốc. Thành phần của nước tương : đạm tổng số : 20- 25 g/l, đạm amin là 70- 75% đạm tổng số. Dịch amino axit thu được này sẽ thiếu hai amino axit là axit triptophan và xistein vì hai amino axit này bị phá huỷ trong môi trường axit. Do vậy, nếu nước tương thu được bằng thuỷ phân bánh dầu do enzym của nấm mốc sẽ có thành phần amino axit đầy đủ hơn.

2.3. Các nguyên tố khoáng

- Trong công nghệ lên men, người ta nhận thấy vai trò của dinh dưỡng khoáng rất lớn, nó ảnh hưởng nhiều đến chất lượng của quá trình lên men. Trong số dinh dưỡng khoáng, người ta đặc biệt chú ý đến vai trò của photpho (P).

Khi lên men công nghiệp, người ta thường bổ sung P dưới dạng bột đậu, bột bắp, bã rượu, hay ở dạng photphat vô cơ. Với các chất khoáng khác như : Mg, Na, Fe..... VSV sẽ nhận từ môi trường dinh dưỡng ở dạng muối vô cơ hoặc có khi ngay cả trong nước pha môi trường dinh dưỡng. Vì vậy khi pha môi trường người ta thường dùng nước máy, không dùng nước cất là lí do vậy. Các nguyên tố vi lượng như : Mn, Mo, Co v.v... thường có mặt trong các nguyên liệu tự nhiên ban đầu khi đưa vào môi trường lên men như dịch trái cây, nước chiết các loại hạt khác.

- Tuy vai trò của các nguyên tố khoáng rất quan trọng, nhưng trong quá trình lên men cũng chỉ cần một lượng thích hợp. Nếu vượt quá giới hạn, sẽ giảm hiệu quả của quá trình lên men, vì vậy thiết kế nồi lên men, người ta chế tạo từ thép cacbon, bên trong nồi còn quét lớp keo bảo vệ.

2.4. Vitamin và chất kích thích sinh trưởng

Ở quy mô công nghiệp, cũng như các nguyên tố khoáng, người ta thường bổ sung vitamin, các chất kích thích sinh trưởng thông qua việc bổ sung các nguyên liệu lên men, các nguyên liệu này giàu vitamin và chất kích thích sinh trưởng như : cao ngô, rỉ đường, dầu thực vật, và các cơ chất khác, không cần thiết phải cho vitamin nguyên chất vào nồi lên men.

HƯỚNG DẪN ÔN TẬP

1. Quy trình công nghệ lên men.
2. Công tác giống VSV trong quá trình lên men công nghiệp.
3. Cơ chất và nguồn nguyên liệu lên men.
4. Những công việc cần thiết trong quá trình lên men công nghiệp.
5. Thu hồi và đánh giá chất lượng sản phẩm của quá trình lên men.

Split Unregistered Version - http://www.simpopdf.com

Chương 8

VI SINH VẬT ỨNG DỤNG TRONG NÔNG - LÂM NGHIỆP

I – VI SINH VẬT TRONG QUÁ TRÌNH HÌNH THÀNH VÀ KẾT CẤU MÙN

1.1. Quá trình hình thành mùn

1.1.1. Quan điểm về quá trình hình thành mùn

a) *Quan điểm hóa học*

Đại diện cho trường phái này là Oatxman. Họ cho rằng khi xác động, thực vật được vùi vào trong đất, nó bị thối rữa, phân huỷ, chuyển hóa do các quá trình chuyển hóa hóa học đơn thuần, phần dễ phân giải là quá trình oxi hóa mạnh theo hướng vô cơ, phần này không phải là nguyên liệu hình thành mùn. Theo họ thì mùn là chất dư thừa sau quá trình phân giải từ xác động, thực vật, được hình thành do các phản ứng hóa học đơn thuần trong đất, không có sự tham gia của VSV.

Tóm lại : Theo quan điểm hóa học, thì mùn là chất trung gian, hay chất dư thừa chưa được phân giải hết do các phản ứng hóa học trong đất.

b) *Quan điểm sinh học*

Đại diện cho trường phái này là Đakutraeb, Uyllams, Tuirin, Kononopva. Họ cho rằng khi xác động, thực vật được vùi vào đất, nhờ có VSV phân huỷ chuyển hóa theo hai hướng vô cơ hóa và mùn hóa. Cả hai hướng này đều liên quan tới hoạt động sống của VSV trong quá trình tự tiêu, tự giải, tạo thành mùn.

Họ đứng hẳn về trường phái sinh học, bác bỏ quan điểm của Oatxman, đó là :

- Mùn không phải là hợp chất dư thừa, vì đã là hợp chất dư thừa thì không bao giờ có thành phần và tỉ lệ các nguyên tố trong đó lại nhiều hơn chất ban đầu được vùi vào đất. Ví dụ N% trong mùn nhiều hơn trong xác thực vật được vùi đất....

- Mùn cũng không phải là chất trung gian, vì nếu là chất trung gian thì sớm hay muộn cũng bị phân giải. Nhưng thực tế mùn luôn luôn được tích luỹ.

c) *Vậy mùn là gì ?*

Mùn là một sản phẩm tổng hợp, được hình thành nhờ quá trình hoạt động sống của VSV. Tuỳ từng chủng giống VSV khác nhau, cơ chế hoạt

Split Unregistered Version - http://www.simpopdf.com
động khác nhau, mà tạo axit mùn khác nhau. Ví dụ : axit fulvic thường tạo nên trong quá trình phân giải, chuyển hóa xác động, thực vật của nấm *Aspergillus*. Axit humic thường là kết quả của quá trình phân huỷ chuyển hóa của vi khuẩn yếm khí. Axit humic thường được tạo bởi quá trình phân huỷ, chuyển hóa của vi khuẩn hảo khí.

- Sự chuyển hóa các chất hữu cơ được vùi vào đất dưới tác dụng của VSV, theo 2 hướng sau :

+ Quá trình vô cơ hóa : Là quá trình chuyển hóa các hợp chất hữu cơ thành các chất vô cơ dễ tiêu. Nếu quá trình vô cơ hóa xảy ra mạnh, cây trồng không đồng hóa hết, dẫn đến sự dư thừa, gây độc cho cây.

+ Quá trình mùn hóa : Là quá trình chuyển hóa các hợp chất hữu cơ thành các chất vô cơ và hữu cơ đơn giản hơn, kết hợp với quá trình tự tiêu, tự giải của VSV.

Trong quá trình phân giải, chuyển hóa của VSV, người ta thấy mùn gồm có :

Hidratcacbon, các pentozơ ($C_5H_{10}O_5$), các hexozơ ($C_6H_{12}O_6$) ; Xenlulo ($C_6H_{10}O_5)_n$; Hemixenlulo ; Lignin ; Nhựa, sáp, dầu mỡ ; Tamin ; Chất tro : Ca, Mg, K, S, v.v...

- Quá trình hình thành và tích luỹ mùn nhanh hoặc chậm còn phụ thuộc vào xác động, thực vật được vùi vào đất : Nếu tế bào còn non, vách tế bào mỏng, quá trình phân giải nhanh, dẫn đến quá trình tích luỹ mùn nhanh và ngược lại. Ngoài ra nó còn phụ thuộc vào yếu tố ngoại cảnh, đặc biệt là nhiệt độ và độ ẩm. Ở điều kiện nhiệt độ cao, độ ẩm lớn, thì quá trình tích luỹ mùn nhanh, nhưng quá trình phân giải cũng nhanh và ngược lại.

1.1.2. Khu hệ vi sinh vật và sơ đồ hình thành mùn của Kononopva

Theo Kononopva, thì VSV phân huỷ xác động, thực vật để hình thành mùn gồm 2 nhóm tham gia :

- Nhóm VSV lên men, gồm : VSV phân giải tinh bột, VSV lên men đường, VSV phân huỷ chuyển hóa xenlulo, hemixenlulo (*Saccaromyces, Mucor, Bacillus...*).

- Nhóm VSV sinh tính đất, là những VSV phân huỷ, chuyển hóa các chất bền vững như : lignin, kitin, sáp... (*Ruminococcus, Basidomicetes, Actinomyces*.....).

Xác động, thực vật được vùi vào đất, nhóm VSV phân giải đầu tiên được gọi là nhóm VSV lên men. Bằng thí nghiệm với cỏ 3 lá *(Medicago)*,

Split Unregistered Version - http://www.simpopdf.com

Kononopva thấy : Sau 3 ngày, trên bề mặt của cỏ 3 lá được phủ dày đặc nấm sợi, sau 7 ngày thấy nấm sợi biến mất, thay thế vào đó là vi khuẩn và nguyên sinh động vật, sau 10 ngày nhóm VSV lên men xuất hiện (*Saccharomyces*), sau 15 ngày biến trùng xuất hiện, sau 6 tháng xuất hiện nhiều loại xạ khuẩn và vi khuẩn sinh nha bào, chúng hoạt động mạnh để phân huỷ các hợp chất bền vững như xenlulo, hemixenlulo, lignin, kitin v.v...

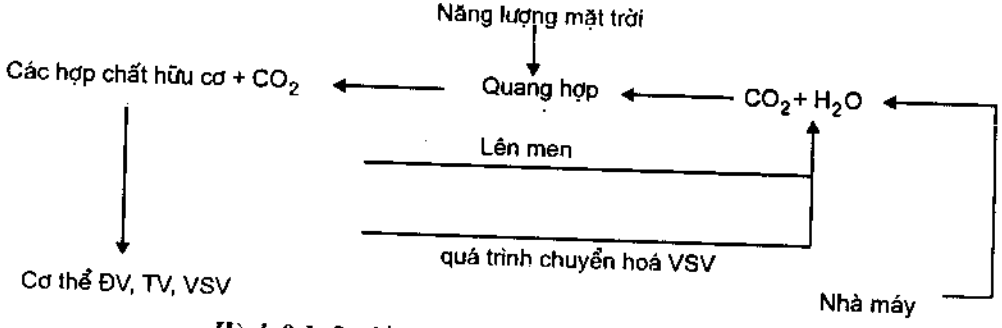
1.2. Vi sinh vật trong quá trình cấu tạo và kết cấu mùn

Xác động, thực vật bị VSV phân giải thành các chất vô cơ và các chất hữu cơ đơn giản cùng với sự hình thành mùn. Tiurin đem thuỷ phân axit các hợp chất mùn, thu được axit amin và các loại đường. Phần không thuỷ phân được đó là lignin - được coi là sườn của nhân mùn, nó quy định tính chất của hợp chất mùn. Sau đó ông đem thuỷ phân phần còn lại này bằng hỗn hợp chất : $KMnO_4$, H_2O_2, HNO_3, cho một chất mùi thơm, đó chính là nhân benzen. Dùng NaOH 0,1N tách axit mùn thành 2 nhóm : axit humic và axit fulvic. Ngoài ra ông còn thấy có chất màu đen không tan trong dung dịch kiềm loãng, liên kết chặt với các chất khoáng trong đất, ông gọi là Humin.

Quá trình phân giải các hợp chất trong đất, VSV đã hấp thụ các chất dinh dưỡng. Trong quá trình tự tiêu, tự giải đã tạo thành chất mùn hoạt tính, chất này đã gắn chặt các hạt đất lại với nhau làm cho đất tơi xốp. Hơn nữa xác của VSV sau khi chết, chúng kết hợp với một số chất trong quá trình phân giải tạo thành phức chất, phức chất này đã tham gia tích cực vào thành phần và kết cấu mùn.

II – VI SINH VẬT PHÂN GIẢI VÀ CHUYỂN HÓA CÁC HỢP CHẤT CACBON

2.1 Vòng tuần hoàn cacbon trong tự nhiên



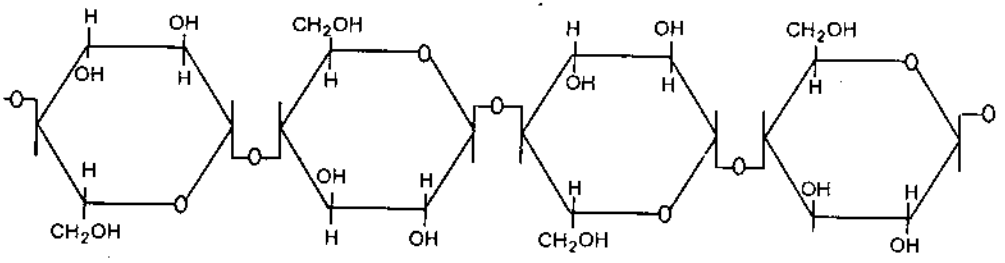
Hình 8.1. Sơ đồ chu chuyển cacbon trong tự nhiên

Split Unregistered Version - http://www.simpopdf.com

2.2. Quá trình phân giải xenlulo

Hàng năm có khoảng 30 tỉ tấn chất hữu cơ được cây xanh tổng hợp trên Trái Đất. Trong số này có tới 30% là màng tế bào thực vật mà thành phần chủ yếu là xenlulo. Người ta nhận thấy xenlulo chiếm trên 90% trong bông, 40 - 50% trong gỗ.

2.2.1 Xenlulo có cấu tạo dạng sợi :



Xilan $\xrightarrow{\text{Xilanaza}}$ Xilanbioza + Xiloza

2.2.2. Các loại vi sinh vật phân giải xenlulo

Có rất nhiều loại VSV có khả năng phân giải xenlulo.

- VSV hảo khí :

+ Niêm vi khuẩn : *Cytophaga, Sporocytophaga, Cellulomonas.*

+ Vi khuẩn : các giống *Bacillus*, giống *Clostridium.*

+ Xạ khuẩn : *Streptomyces.*

+ Nấm mốc : *Aspergillus, Penicillium, Fusarium.*

- VSV yếm khí :

+ Vi khuẩn dạ cỏ : giống *Ruminococcus.*

+ VSV yếm khí sống tự do : *Baciluus cellulosae hidrogenicus ; Bacillus cellulosae methanicus.*

+ Vi khuẩn ưa nóng : *Bacillus cellulosae thermophicus.*

2.2.3. Cơ chế của quá trình phân giải

Muốn phân giải được xenlulo, các loại VSV phải tiết ra men xenlulaza. Men xenlulaza là men ngoại bào và cơ chế chung của quá trình phân giải xenlulo là :

xenlulo → disaccarit → monosaccarit (gluco)

2.3. Sự phân giải xilan

2.3.1. Định nghĩa xilan

- Là một hợp chất hidratcacbon, phân bố rất rộng trong tự nhiên. Xilan chứa nhiều trong xác thực vật. Trong rơm rạ, xilan chiếm 15-20%, trong bã mía 30%, trong gỗ thông 7-12%, trong các loại cây lá rộng 20-25%.

Split Unregistered Version - http://www.simpopdf.com

- Xilan là một loại hemixenlulo, xilan không giống xenlulo về cấu trúc, về bản chất. Phân tử xilan có cấu tạo bởi các đơn vị có gốc β.D.xilo, liên kết với nhau bằng các dây nối 1-4 glucozit.

2.3.2. Cơ chế phân giải

- Dưới tác dụng của men xilanaza ngoại bào, xilan sẽ phân giải thành các phần khác nhau : những đoạn dài xilanbiozơ và xilozơ.

- VSV phân giải xilan : Nhiều loại VSV có khả năng phân giải xilan. Các VSV có khả năng phân giải xenlulo khi sản sinh ra men xelulaza thường sinh ra men xilanaza. Trong đất chua thì nấm là loại VSV đầu tiên tác động vào xilan. Trong đất trung tính và kiềm, vi khuẩn và niêm vi khuẩn là nhóm tác động đầu tiên vào xilan. Xilanaza thường là men cảm ứng (chất cảm ứng là xilan). Cũng có trường hợp (ví dụ ở *Clostridium*) men này là men cấu trúc.

$$\text{Xilan} \xrightarrow{\text{Xilanaza}} \text{Xilanbiozơ} + \text{Xilozơ}$$

2.4. Phân giải pectin

2.4.1. Định nghĩa

Pectin là loại poligalacturonic, một hợp chất cao phân tử cấu tạo bởi các gốc axit.D.galacturonic (một phần được metil hoá). Các gốc này liên kết với nhau nhờ dây nối α.1- 4 glucozit. Pectin có bản chất gluxit. Chúng có nhiều trong quả, củ, hạt và trong thân thực vật. Trong thực vật, pectin có mặt ở dạng protopectin không tan.

2.4.2. Vi sinh vật phân giải pectin

Bacillus subtilis, Bacillus nesentericus, Bacillus macaras, Bacillus polmyxa, Mucor stolinifer, Fusarium oxisporum, Botrytis cinereum, Clostridium.

2.4.3. Cơ chế phân giải

- VSV phân giải pectin nhờ có men protopectinaza biến protopectin không tan thành pectin hòa tan.

- Pectin hòa tan là polisaccarit được tạo nên từ các gốc axit.α.D.galacturonic.

- Các gốc này được kết hợp với nhau bằng mối liên kết 1- 4 glucozit. Mạch này được gọi là axit poligalacturonic hoặc axit pectit. Một số các nhóm cacboxil của axit được liên kết với rượu metilic.

Split Unregistered Version - http://www.simpopdf.com

- Dưới tác dụng của men pectinaza các gốc metil sẽ bị loại trừ. Rượu metilic và axit pectic tự do sẽ được hình thành. Axit pectic tự do sẽ cho muối, tức là pectal và axit pectic tự do dưới tác dụng của men poligalactaronaza (men pectinaza) sẽ bị phân giải để cho các axit. D.galacturonic.

2.4.4. Ứng dụng

- Người ta thường sử dụng quá trình VSV phân giải pectin vào việc ngâm đay, ngâm gai.

- Người ta cũng sử dụng một số VSV phân giải pectin trong quá trình chế biến (làm trong) các nước hoa quả, làm nước giải khát.

2.5. Sự phân giải lignin (liginine)

2.5.1. Khái niệm lignin

Là một trong những thành phần chủ yếu của tổ chức thực vật. Lignin và xenlulo tham gia vào thành phần của màng tế bào thực vật. Trong xác cây gỗ, lượng lignin có thể chiếm 30-40% chất khô. Trong cây hoà thảo : 20%. Lượng lignin chứa trong cây già nhiều hơn so với trong cây non. Thực vật khác nhau thì bản chất của những nguyên tố cấu trúc cũng khác nhau. Lignin là hợp chất rất bền vững, không tan trong nước, dưới tác dụng của kiềm, bisunphit natri và H_2SO_4 , thì lignin mới bị phân giải một phần và chuyển sang dạng hòa tan. Lignin là một chất trùng hợp, trong đó chứa nhân thơm. Đơn vị cấu trúc của nó là dẫn xuất của phenin - propan. Nhân thơm của lignin có một loạt mạch ngang chứa nhóm - OCH_3 giữ vai trò rất quan trọng. Nhân benzen, napthalen, antraxen, furan, piron, indon, pirimidin và quinolin. Công thức tổng quát của lignin là $C_{18}H_{30}O_{15}$.

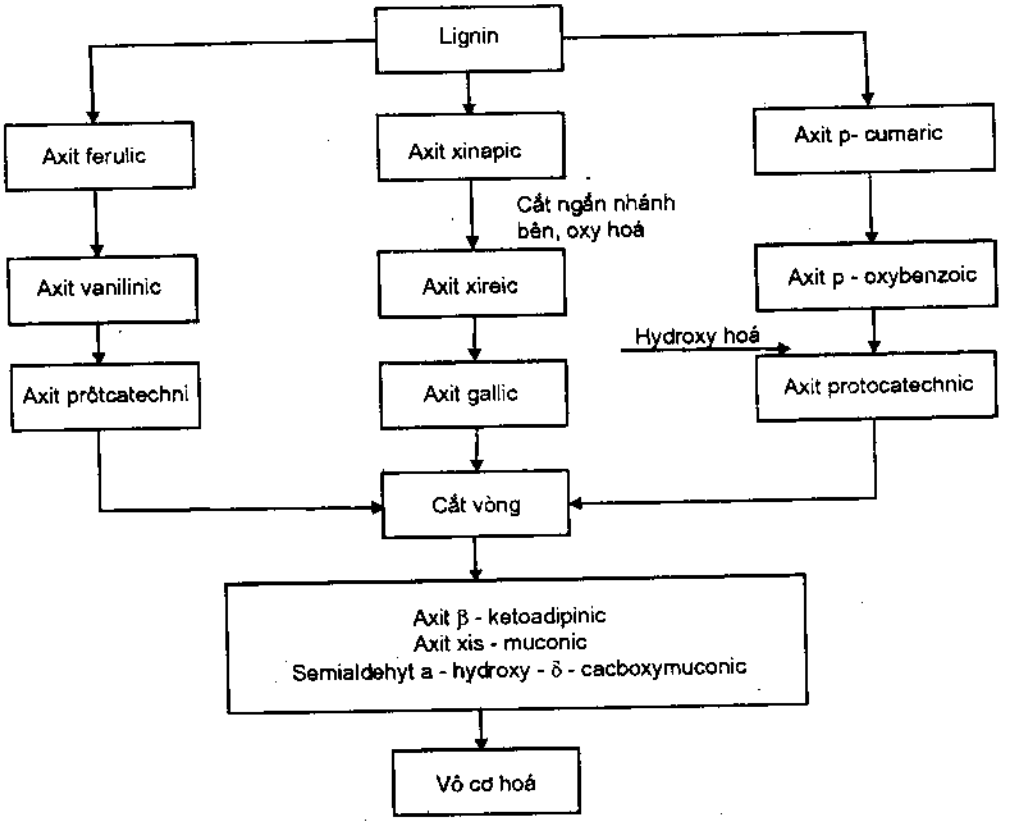
2.5.2. Vi sinh vật phân giải lignin

Nấm mốc *Basidomycetes* (phá hoại gỗ) có thể chia thành 2 nhóm. Một nhóm có thể chuyển hoá nhanh chóng gỗ thành một khối màu đỏ, chủ yếu là phá huỷ xenlulo và hemixenlulo, không có tác động lên lignin. Một nhóm phân giải gỗ thành một khối trắng, chúng chủ yếu tác động lên lignin, hầu như không làm phân giải xenlulo. Các loại nấm tác động lên lignin : *Polisitctus versicolor, Stereum hisutum, Pholiota, Clitocybe, Lenzites, Trametes.*

Nhiều loại vi khuẩn và xạ khuẩn cũng có khả năng phân giải lignin. Các loài vi khuẩn có hoạt tính phân giải lignin cao thường thuộc về các giống *Pseudomonas, Flavobacterium, Agrobacterium.*

nd Split Unregistered Version - http://www.simpopdf.com

2.5.3. Cơ chế phân giải lignin :



Hình 8.2. Sơ đồ cơ chế phân giải lignin

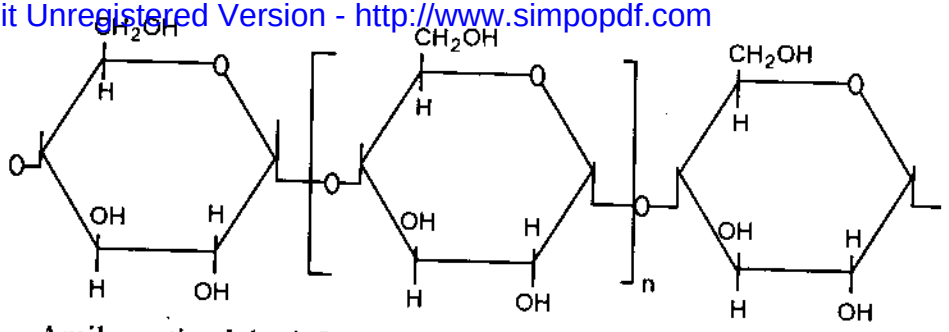
2.6. Sự phân giải tinh bột

2.6.1. Khái niệm tinh bột

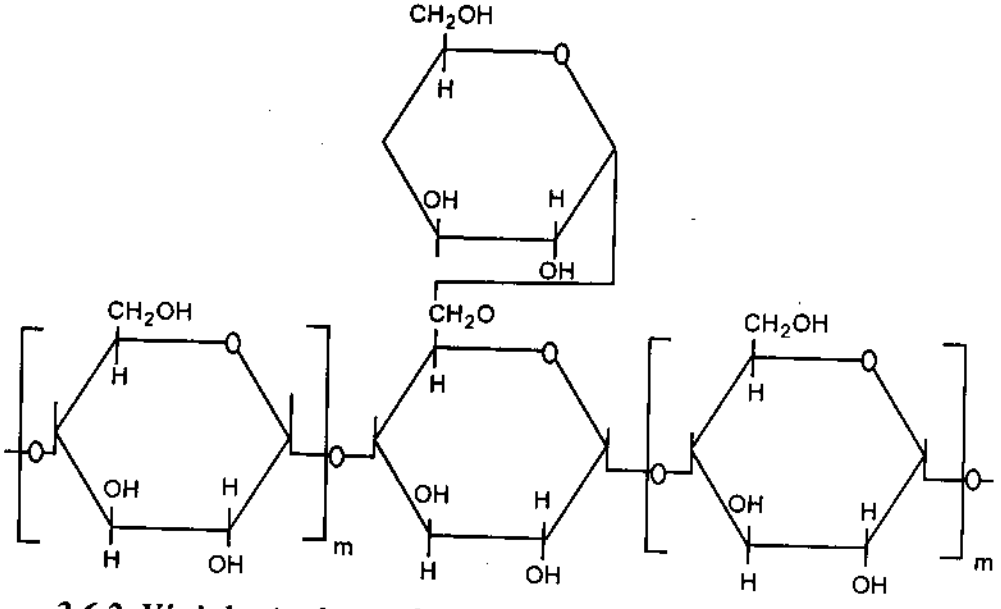
- Là chất dự trữ chủ yếu của thực vật. Nó phản ứng với iốt tạo thành hợp chất có màu lam tím. Trong tế bào thực vật, tinh bột tồn tại trong dạng các hạt tinh bột. Các hạt tinh bột có kích thước và hình dạng thay đổi tuỳ loại thực vật.

Tinh bột gồm hai thành phần khác nhau : amilo (amilose) và amilopectin (amylopectine). Amilo thường chiếm khoảng 15 -27% khối lượng tinh bột của thực vật. Amilo là những chuỗi không phân nhánh được cấu tạo bằng các gốc α.D.glucopirano, liên kết với nhau bằng dây nối 1-4 glucozit. Amilo tan trong nước nóng. Cấu tạo amilo có thể trình bày như sau :

nd Split Unregistered Version - http://www.simpopdf.com



Amilopectin chứa từ 0,1 - 0,8% P_2O_5. Đó là một chuỗi phân nhánh cấu tạo bởi các gốc α.D.glucopirano, liên kết với nhau bằng gây nối 1- 4 và 1- 6 glucozit. Amilopectin như một loại xi măng, co giãn được, liên kết các tinh thể amilo với nhau. Amilopectin có cấu tạo như sau (m = 25-30) :



2.6.2. Vi sinh vật phân giải tinh bột

- Nhiều loại VSV có khả năng sản sinh men amilaza ngoại bào làm phân giải tinh bột thành các thành phần đơn giản hơn. Có thể phân biệt một số loại amilaza sau đây :

+ α- amilaza : tác động đồng thời lên nhiều dây nối (α-1- 4) kể cả các dây nối bên trong đại phân tử. Sản phẩm quá trình phân giải này ngoài mantozơ còn có các oligomer chứa 3- 4 gốc glucozơ.

+ β- amilaza : khác với α- amilaza, men β- amilaza chỉ tác động vào phần ngoài đại phân tử.

+ Amila 1- 6 glucozidaza : phân cách dây nối 1- 6 glucozit ở các chỗ phân nhánh.

nd Split Unregistered Version - http://www.simpopdf.com

+ Glucoamilaza : phân giải tinh bột thành glucozơ và các α-oligosaccarit.

- Dưới đây là tên một số các loại VSV có hoạt tính amilaza cao và có ý nghĩa nhiều trong việc phân giải tinh bột :

+ *Aspergillus cadidus, Asp. niger, Asp. oryzae, B. mesentericus, B.sulitilis* có khả năng tiết ra men α.amilaza.

+ *Asp. Awamori, Asp. Oryzae* tiết ra men β.amilaza.

+ *Asp. Awamorii, Asp. niger, Asp. oryzae* tiết ra men glucoamilaza.

III - QUÁ TRÌNH TỔNG HỢP VÀ PHÂN GIẢI CÁC HỢP CHẤT CHỨA NITƠ

3.1. Vòng tuần hoàn nitơ trong tự nhiên

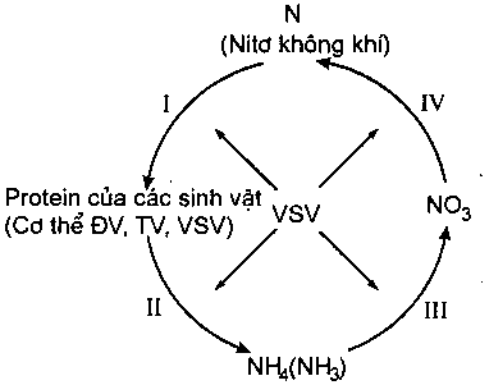
Trong đó :

I - Quá trình cố định nitơ phân tử.

II - Quá trình amôn hoá.

III - Quá trình nitơrat hóa.

IV - Quá trình phản nitơrat hoá.



***Hình 8.3.** Sơ đồ vòng tuần hoàn nitơ trong tự nhiên*

3.2. Quá trình amôn hóa

Quá trình phân huỷ, chuyển hóa các hợp chất hữu cơ dưới tác dụng của VSV để thành các hợp chất hữu cơ đơn giản hơn là NH_4^+ hoặc NH_3, được gọi là quá trình amôn hóa.

3.2.1. Quá trình amôn hóa protein

a) *Định nghĩa :* Dưới tác dụng của VSV, protein được phân giải để cho NH_3 gọi là quá trình amôn hoá protein.

b) *VSV chủ yếu :* Có rất nhiều loại VSV có khả năng phân giải protein : vi khuẩn hảo khí, yếm khí, xạ khuẩn, nấm.

c) *Cơ chế phân giải*

Dưới tác dụng của men proteinaza, các protein được phân giải thành các hợp chất đơn giản hơn (polipeptit và olizopeptit). Các chất này được tiếp tục phân giải thành axit amin nhờ tác dụng của men peptidaza ngoại bào. Các chất này cũng có thể trực tiếp hấp thụ vào tế bào VSV, sau đó được tiếp tục chuyển hoá thành axit amin. Các axit amin này sẽ được sử

Split Unregistered Version - http://www.simpopdf.com

dụng một phần vào quá trình sinh tổng hợp protein của VSV, một phần được tiếp tục phân giải để tạo ra NH_3, CO_2 và nhiều sản phẩm trung gian khác.

$$R\text{-}CH(NH_2)\text{-}COOH \rightarrow R = CH\text{-}COOH + NH_3$$

$$R\text{-}CH(NH_2) - COOH + 1/2\ O_2 \rightarrow R - CO - COOH + NH_3$$

$$R\text{-}CH(NH_2) - COOH + O_2 \rightarrow R - COOH + CO_2 + NH_3$$

$$R\text{-}CH(NH_2) - COOH + H_2O \rightarrow R - CH_2OH + CO_2 + NH_3$$

$$R\text{-}CH(NH_2) - COOH + 2H_2O \rightarrow R - COOH + NH_3 + 4H$$

Khi phân giải các axit amin chứa S (như mêtionin, xistin, xistein), VSV giải phóng ra khí H_2S :

$$HOOC\text{-}CH_2NH_2\text{-}CH_2\text{-}SH + 2H_2O \rightarrow H_2S + NH_3 + CH_3COOH + CHOOH$$

d) *Ứng dụng*

Quá trình amôn hóa protein thường gặp trong sản xuất và đời sống. Nắm được quá trình này, chúng ta có thể vận dụng vào các quá trình chế biến và bảo quản nông sản phẩm, đặc biệt là những nông sản quý như : trứng, sữa, thịt hộp, cá hộp... Chúng ta cũng vận dụng quá trình này trong chế biến thức ăn cho người và gia súc.

3.2.2. Quá trình amôn hoá urê, axit uric

a) *Urê*

- Urê là một loại hợp chất hữu cơ đơn giản chứa tới 46,6% N.

- Urê thường có trong nước tiểu động vật và người. Urê có thể điều chế dưới điều kiện áp suất 150-200at và 150-190^{0}C.

$$2NH_3 + CO_2 \xrightarrow{t^0 \text{ cao + xúc tác}} CO(NH_2)_2 \text{ (Urê)}$$

- Vi khuẩn amôn hoá urê : *Planosarcina ureae, Micrococcus ureae, Sarcina ureae, Sarcina hansenii, Bacillus pasteurii, Bac. hesmogenes v.v...*

Nhiều loại xạ khuẩn và nấm mốc cũng có khả năng phân giải urê.

Vi khuẩn urê thường thuộc loại hảo khí hoặc yếm khí không bắt buộc. Chúng phát triển tốt trong môi trường trung tính hoặc hơi kiềm. Chúng không sử dụng được cacbon trong urê, urê chỉ được dùng làm nguồn cung cấp nitơ cho chúng. Chúng có men ureaza làm xúc tác quá trình phân giải urê thành NH_3, CO_2, H_2O.

$$CO(NH_2)_2 + 2H_2O \rightarrow (NH_4)_2CO_3$$

$$(NH_4)_2CO_3 \rightarrow 2NH_3 + CO_2 + H_2O$$

Split Unregistered Version - http://www.simpopdf.com

b) *Axit uric* : là một hợp chất nitơ hữu cơ chứa trong nước tiểu (khoảng 0,5g/l). Chúng được phân giải thành urê và axit tactronic. Sau đó urê được tiếp tục phân giải như trên.

3.2.3. Quá trình amôn hoá kitin

- Kitin là một hợp chất cao phân tử bền vững. Cấu trúc của kitin gần với cấu trúc của xenlulo, nhưng trong phân tử của các gốc glucozơ, người ta thấy gốc hidroxin ở nguyên tử C thứ hai được thay thế bằng những gốc amin đã được axetin hoá.

- VSV phân giải kitin :

Nhiều loại VSV có khả năng phân giải kitin. Đáng chú ý nhất là những loại thuộc các giống khác sau : *Achromobacter, Flavobacterium, Bacillus, Cytophaga, Pseudomonas, Penicillium.*

- Quá trình phân giải kitin được nghiên cứu khá kĩ ở vi khuẩn *Bac. chitinovorum* và xạ khuẩn *Streptomyces griseus*. Chúng có khả năng sinh ra các men ngoại bào : Kitinaza và Kitobiaza. Kitinaza tác dụng đồng thời lên các phần khác nhau của phân tử kitin và làm phân giải thành kitobio và kitotrio (một phần N - axetilglucozamin cũng được sinh ra). Kitotrio sẽ được tiếp tục phân giải thành các gốc đơn phân tử (monomer) nhờ xúc tác của men kitobiaza.

3.3. Quá trình nitrat hóa

3.3.1. Định nghĩa

Dưới tác dụng của một số loài VSV đặc biệt, NH_4^+ được hình thành do quá trình amôn hoá hoặc NH_4^+ ở các loại phân hoá học sẽ được tiếp tục chuyển hoá thành NO_2^- (nitrit) rồi sau đó thành NO_3^- gọi là quá trình nitrat hoá.

3.3.2. Vi sinh vật chủ yếu

Quá trình này chia làm hai giai đoạn khác nhau do hai loại vi khuẩn đảm nhiệm :

+ *Giai đoạn 1* : Giai đoạn nitrit hoá

Vi khuẩn tham gia vào giai đoạn chuyển hoá NH_3 thành NO_2^- thuộc về 4 giống : *Nitrosomonas, Nitrocystis, Nitrosolobus, Nitrosospira.*

Quá trình nitrit hoá được trình bày theo phương trình sau :

Men xúc tác cho quá trình oxi hoá này là men thông thường của quá trình hô hấp hảo khí.

$$NO_2^- \rightarrow NO_3^-$$

Split Unregistered Version - http://www.simpopdf.com

+ *Giai đoạn 2 :* Giai đoạn nitrat hoá

Vi khuẩn tham gia vào giai đoạn này gồm các giống sau :

Nitrobacter, Nitrospira, Nitrococcus.

Cơ chế của quá trình được biểu thị bằng sơ đồ sau :

$$NO_2^- + NO_3^- + \text{năng lượng}$$

Vi khuẩn nitơrat hóa thuộc loại tự dưỡng hóa năng.

Ngoài quá trình nitrat hóa do VSV tự dưỡng hoá năng còn có quá trình nitrat hoá do nhiều loại VSV tự dưỡng. Chúng không có khả năng đồng hoá CO_2 trong không khí nhưng có khả năng chuyển NH_3 thành nitrit rồi thành NO_3^-.

Nhóm VSV dị dưỡng gồm nhiều loại vi khuẩn và xạ khuẩn thuộc các giống (chi) *Alcaligenes, Anthrobacter, Corynebacterium, Achromobacter, Pseudomonas.* Ngoài việc nitrat hoá các chất NH_3^+ hay NO_2^-, nhiều loại trong số các VSV dị dưỡng nói trên còn có thể tiến hành quá trình nitrat hoá đối với nhiều hợp chất chứa nitơ khác (amit, amin, oxim, hidroxamat...).

3.3.3. Tác hại của quá trình nitrat hóa

- NO_3^- dễ bị rửa trôi.
- NO_3^- làm chua đất.
- NO_3^- là nguồn N của vi khuẩn phản nitrat hoá làm cho đất mất N.
- NO_2^-, NO_3^- độc đối với cây.

3.4. Quá trình phản nitrat hoá

3.4.1. Định nghĩa

NO_3^- trong tự nhiên, dưới tác dụng của một số VSV đặc biệt sẽ được chuyển hoá thành N_2, gọi là quá trình phản nitrat hoá.

3.4.2. Vi sinh vật

- *Pseudomonas denitrificans ; Ps. acruginosa ; Ps. stutzeri ; Ps. fluorescens.*

- Một số loại vi khuẩn tự dưỡng hóa năng cũng có khả năng thực hiện quá trình này như : *Thiobacillus denitrificans ; Hidrogenomonas agilis.*

Vi khuẩn phản NO_3 là nhóm vi khuẩn phân bố rộng rãi trong tự nhiên. Chúng thường là vi khuẩn yếm khí tuỳ tiện. Trong điều kiện có

Split Unregistered Version - http://www.simpopdf.com
oxi, nó có thể dùng oxi của không khí, trong điều kiện không có oxi của không khí nó dùng oxi của NO_3^-. Chúng có thể sản sinh men NO_3^- reductaza hoặc NO_2^- reductaza. Vi khuẩn phản nitrat thường hoạt động mạnh trong môi trường trung tính hay hơi kiềm.

3.4.3. Cơ chế quá trình có thể tóm tắt như sau :

Quá trình phản nitrat hoá khử NO_3^- đến N_2 như sau :

$$NO_3^- \rightarrow NO_2^- \rightarrow NO \rightarrow N_2O \rightarrow N_2$$

Thiobacillus denitrificans là VSV dinh dưỡng hoá năng, oxi hoá phân tử S lấy năng lượng để tiến hành quá trình tổng hợp chất hữu cơ của cơ thể. Trong điều kiện không có oxi, nó dùng oxi của NO_3^- để oxi hoá S, khử NO_3^- để có N_2 :

$$5S + 6KNO_3 + 2CaCO_3 \rightarrow 3K_2SO_4 + 2CaSO_4 + 2CO_2 + 3N_2\uparrow$$

3.5. Quá trình cố định N_2

- Nitơ là nguyên tố dinh dưỡng quan trọng không thể thiếu được, không chỉ đối với cây trồng, mà ngay cả đối với VSV. Nguồn dự trữ nitơ trong tự nhiên rất lớn, chỉ tính riêng trong không khí, nitơ chiếm khoảng 78,16% thể tích của không khí. Người ta ước tính rằng, trong bầu không khí bao trùm lên 1ha đất đai chứa khoảng 8 triệu tấn nitơ, lượng nitơ này có thể cung cấp dinh dưỡng cho cây trồng hàng chục triệu năm (nếu như cây trồng đồng hoá được chúng).

- Trong cơ thể các loài sinh vật trên Trái Đất chứa khoảng $10 - 25.10^9$ tấn nitơ. Trong các vật trầm tích chứa khoảng 4.10^{15} tỉ tấn nitơ. Nhưng tất cả nguồn nitơ trên cây trồng đều không tự đồng hoá được, mà phải nhờ VSV. Thông qua hoạt động sống của các loài VSV, nitơ nằm trong các dạng khác nhau được chuyển hóa thành dễ tiêu cho cây trồng sử dụng.

Hàng năm cây trồng lấy đi từ đất hàng trăm triệu tấn nitơ. Bằng cách bón phân, con người trả lại cho đất được khoảng trên 40%, lượng thiếu hụt còn lại cơ bản được bổ sung bằng nitơ do hoạt động sống của VSV. Vì vậy việc nghiên cứu, sử dụng nguồn đạm sinh học này được xem là một giải pháp quan trọng trong nông nghiệp, đặc biệt trong sự phát triển nền nông nghiệp bền vững của thế kỉ XXI này.

Quá trình cố định nitơ phân tử là quá trình đồng hoá nitơ của không khí thành đạm amôn dưới tác dụng của một số nhóm VSV có hoạt tính nitrogenaza.

Split Unregistered Version - http://www.simpopdf.com

Bản chất của quá trình cố định nitơ phân tử được hai nhà bác học là Hellriegel và Wilfarth tìm ra năm 1888, gồm 2 nhóm VSV tham gia đó là :

3.5.1. Quá trình cố định nitơ phân tử nhờ vi sinh vật sống tự do và hội sinh

Là quá trình đồng hoá nitơ của không khí dưới tác dụng của các chủng giống VSV sống tự do hoặc hội sinh, có sự tham gia của hoạt tính nitrogenara.

Thuộc về nhóm này có tới hàng nghìn chủng VSV khác nhau, trong đó phải kể đến một số VSV sau :

a) *Vi khuẩn Azotobacter*

- Năm 1901, nhà bác học Beyjeirinh đã phân lập được từ đất một loài VSV có khả năng cố định nitơ phân tử cao, ông đặt tên cho loài VSV này là *Azotobacter*. Vi khuẩn *Azotobacter* khi còn non có tiên mao, có khả năng di động nhờ tiên mao (Flagellum) ; Là vi khuẩn hình cầu (song cầu khuẩn) ; Gram âm không sinh nha bào, hảo khí, kích thước tế bào dao động 1,5 - 5,5µm, khuẩn lạc dạng S màu trắng trong, lồi, nhày. Khi già, khuẩn lạc có màu vàng lục hoặc màu nâu thẫm, tế bào được bao bọc lớp vỏ dày và tạo thành nang xác, gặp điều kiện thuận lợi, nang xác này sẽ nứt ra và tạo thành các tế bào mới.

- Vi khuẩn *Azotobacter* thích ứng ở pH = 7,2 - 8,2, ở nhiệt độ 28 - 30^0C, độ ẩm 40 - 60%. *Azotobacter* đồng hoá tốt các loại đường đơn và đường kép, cứ tiêu tốn 1 gam đường glucozơ, nó có khả năng đồng hoá được 8 - 18mg N. Ngoài ra, *Azotobacter* còn có khả năng tiết ra một số vitamin thuộc nhóm B như B_1, B_6 ..., một số axit hữu cơ như : axit nicotinic, axit pantotenic, biotin, auxin. Các loại chất kháng sinh thuộc nhóm Anixomyxin.

- Thuộc về giống *Azotobacter* có rất nhiều loài khác nhau : *Azotobacter chrococcum ; Azotobacter axitum ; Azotobacter araxii ; Azotobacte v.v...*

b) *Vi khuẩn Beijerinskii*

- Năm1893 nhà bác học Ấn Độ Stackê đã phân lập được một giống vi khuẩn ở ruộng lúa nước pH rất chua, có khả năng cố định nitơ phân tử, ông đặt tên là vi khuẩn *Beijerinskii*. Giống Vi khuẩn *Beijerinskii* có hình cầu, hình bầu dục hoặc hình que ; Gram âm không sinh nha bào, hảo khí, một số loài có tiên mao, có khả năng di động ; Kích thước tế bào dao động 0,5 - 2,0 × 1,0 - 4,5µm. Khuẩn lạc thuộc nhóm S, rất nhày, lồi, không màu hoặc màu nâu tối khi già, không tạo nang xác.

SplitUnregisteredVersion - http://www.simpopdf.com

- Vi khuẩn *Beijerinskii* có khả năng đồng hoá tốt các loại đường đơn, đường kép, cứ tiêu tốn 1 gam đường glucozơ nó có khả năng cố định được 5 - 10mg N.

Khác với vi khuẩn *Azotobacter*, vi khuẩn *Beijerinskii* có tính chống chịu cao với axit, nó có thể phát triển ở môi trường pH = 3, nhưng vẫn phát triển ở pH trung tính hoặc kiềm yếu, vi khuẩn *Beijerinskii* thích hợp ở độ ẩm 70 - 80% ở nhiệt độ 25 – 28^{0}C. Vi khuẩn *Beijerinskii* phân bố rộng trong tự nhiên, nhất là ở vùng nhiệt đới và á nhiệt đới.

c) *Vi khuẩn Clostridium*

- Năm1939, nhà bác học người Nga Vinogratxkii đã phân lập, tuyển chọn được một giống vi khuẩn yếm khí, có khả năng cố định nitơ phân tử cao, ông đặt tên cho vi khuẩn này là vi khuẩn *Clostridium*. Đây là trực khuẩn gram dương, sinh nha bào, khi sinh nha bào nó kéo méo tế bào ; Kích thước tế bào dao động 0,7 - 1,3 × 2,5 - 7,5µm ; Khuẩn lạc thuộc nhóm S, màu trắng đục, lồi, nhày. Vi khuẩn *Clostridium* ít mẫn cảm với môi trường, nhất là môi trường thừa P, K, Ca và có tính ổn định với pH. Nó có thể phát triển ở pH = 4,5 - 9,0, độ ẩm thích hợp 60 - 80%, nhiệt độ 25 - 30^{0}C. Vi khuẩn *Clostridium* đồng hoá tốt tất cả các nguồn thức ăn nitơ vô cơ và hữu cơ, cứ tiêu tốn 1 gam đường glucozơ, thì nó đồng hoá được 5 - 12mgN.

- Vi khuẩn *Clostridium* có nhiều loài khác nhau : *Clostridium butirium ; Clostridium beijerinskii ; Clostridium pectinovorum ; Clostridium gracias v.v...*

3.5.2. Quá trình cố định nitơ phân tử cộng sinh

- Là quá trình đồng hóa nitơ của không khí dưới tác dụng của các loài VSV cộng sinh với cây bộ Đậu có hoạt tính *nitrogenaza.*

- Năm 1886, Hellriegel và Uynfac đã khám phá ra bản chất của quá trình cố định nitơ phân tử. Họ đã chứng minh được khả năng của cây họ Đậu lấy được nitơ khí quyển là nhờ vi khuẩn nốt sần (VKNS) sống ở vùng rễ cây họ Đậu. Vi khuẩn *Rhizobium* là loại trực khuẩn gram âm không sinh nha bào, hảo khí ; Kích thước tế bào dao động 0,5 -1,2 × 2,0-3,5µm ; Khuẩn lạc thuộc nhóm S, nhày, lồi, màu trắng trong hoặc trắng đục, kích thước khuẩn lạc dao động 2,3 - 4,5mm sau một tuần nuôi trên môi trường thạch bằng ; Vi khuẩn *Rhizobium* có tiên mao, có khả năng di động, chúng thích hợp ở pH = 6,5 - 7,5, nhiệt độ 25 - 28^{0}C, độ ẩm 50 - 70%. Khi già có một số loài tạo được nang xác, khuẩn lạc sẽ chuyển sang màu nâu nhạt. Vi khuẩn *Rhizobium* gồm nhiều loài khác nhau : *Rh. leguminosarum ; Rh. phaseoli ; Rh. trifolii ; Rh. lupini ; Rh. japonicum ; Rh. meliloti ; Rh. cicer ; Rh. vigna ; Rh. lotus v.v...*

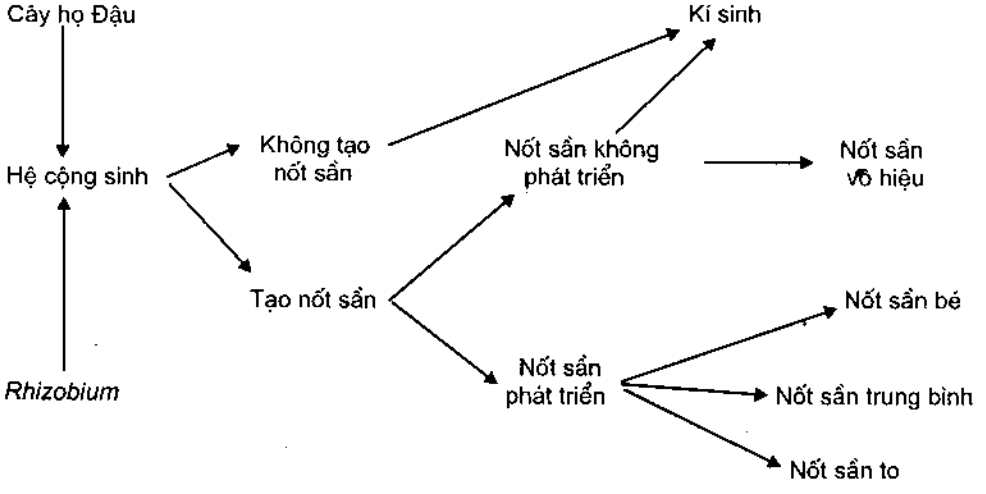
Split Unregistered Version - http://www.simpopdf.com

- Hiện nay người ta tạm chia VKNS thành 4 nhóm lớn :

+ *Sinorhizobiumfredy* : là những loài mà trong hoạt động sống của chúng sản sinh ra axit hay là chúng làm axit hóa môi trường.

+ *Bradyrhizobium* : là những loài mà trong hoạt động sống của chúng sản sinh ra chất kiềm, hay là chúng làm kiềm hóa môi trường.

+*Agrobacterium* và *Phillobacterium* : hai giống này là VKNS nhưng không cộng sinh ở cây họ Đậu mà cộng sinh ở rễ, thân, kẽ lá cây rừng và những cây thuỷ hải sản. Hai giống này không có ý nghĩa nhiều trong nông nghiệp.



***Hình 8.4**. Sơ đồ tạo thành hệ cộng sinh ở cây họ Đậu*

3.5.3. Các vi sinh vật cố định nitơ phân tử khác

Ngoài những giống VSV cố định nitơ phân tử nói trên, còn vô số những giống khác đều có khả năng cố định nitơ phân tử, chúng có nhiều ý nghĩa trong sản xuất nông, lâm, ngư nghiệp.

- Vi khuẩn :

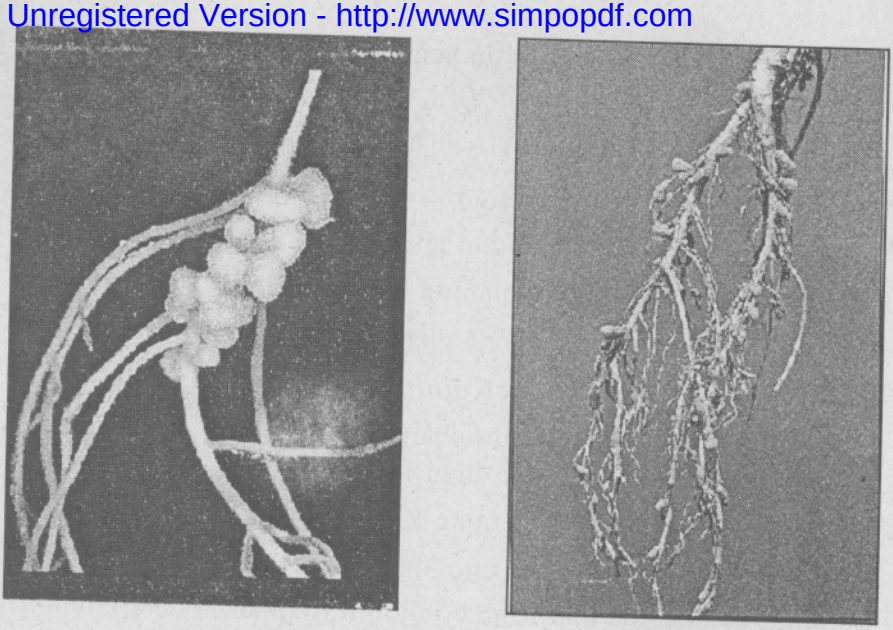
+ Nhóm vi khuẩn cố định nitơ phân tử hảo khí : *Azotomonas insolita ; Azotomonas fluorescens ; Pseudomonas azotogenis ; Azospirillum v.v...*

+ Nhóm vi khuẩn cố định nitơ phân tử hảo khí không bắt buộc : *Klebsiella pneumoniae ; Aerobacter aerogenes v.v...*

+ Nhóm vi khuẩn cố định nitơ phân tử yếm khí quang hợp : *Rhodospirillum rubrum ; Chromatium* sp *; Chlorobium* sp *; Rhodomicribium* sp *v.v...*

+ Nhóm vi khuẩn cố định nitơ phân tử yếm khí không quang hợp : *Desulfovibrio desulfuricans ; Methanobacterium* sp...

nd Split Unregistered Version - http://www.simpopdf.com



Hình 8.5. Nốt sần ở rễ cây đậu xanh, đậu tương

- Xạ khuẩn : Một số loài thuộc giống : *Streptomyces ; Actinomyces ; Frankia ; Nocardia ; Actinopolispora ; Actinosynoema...*

- Nấm : *Thodotorula....*

- Tảo, Vi khuẩn lam : *Glococapsa* sp *; Lingbyaps ; Plectonema ; Boyryanum ; Anabaena azollae ; Anabaena ambigua ; Anabaena cycadae ; Anabaena cylindrica v.v...*

3.5.4. Cơ chế của quá trình cố định nitơ phân tử

- Suốt thời gian dài, cơ chế của quá trình cố định nitơ phân tử là một bí ẩn đầy hấp dẫn của tự nhiên. Con người phải sử dụng những điều kiện kĩ thuật rất cao, rất tốn kém (400 – 500^{0}C, 200 - 1000 atm với những chất xúc tác rất đắt tiền) để phá vỡ mối liên kết 3 của phân tử nitơ để có phân đạm hoá học.

Trong khi đó, VSV với sự trợ giúp của hoạt tính nitrogenaza lại phá vỡ mối liên kết 3 của phân tử nitơ một cách dễ dàng ngay trong điều kiện rất bình thường về nhiệt độ và áp suất.

- Có thể nói quá trình cố định nitơ phân tử là quá trình khử N_2 thành NH_3 có xúc tác của enzym nitrogenaza, khi có mặt của ATP.

$$N_2 + AH_2 + ATP \xrightarrow{\text{nitrogenaza}} NH_3 + A + ADP + P$$

(AH_2 là chất cho electron).

Split Unregistered Version - http://www.simpopdf.com

Năm 1992, các nhà khoa học đã hoàn thiện được cơ chế của quá trình cố định nitơ phân tử như sau :

$$N \equiv N \rightarrow NH = NH \rightarrow H_2N - NH_2 \rightarrow NH_3$$

$$N_2 + 8H^+ + 8e^- + 16Mg.ATP + 16O \longrightarrow 2\,NH_3 + 16\,Mg.ADP + 16P$$

Nitrogenaza được cấu tạo bởi hai phần :

+ F_e - protein có khối lượng phân tử khoảng 6.10^4.

+ M_o- F_e - protein có khối lượng phân tử khoảng $2{,}2.10^5$.

3.5.5. Vai trò của quá trình cố định nitơ phân tử

- Nhờ có quá trình cố định nitơ phân tử đã làm giàu cho đất từ 30 đến 120kg N/ha, tùy từng loại đất và điều kiện đồng hóa, đẩy ra từ keo đất được 60 – 80kg P_2O_5/ ha và 50 – 60kg K_2O/ ha/ năm.

- Cứ 3 năm trồng cây họ Đậu cho 300 – 600kg N/ ha.

- Sử dụng cơ chế của quá trình cố định nitơ phân tử để áp dụng trong công nghệ sản xuất ra phân đạm sinh học bón cho cây trồng và các chế phẩm VSV bón vào đất.

IV - PHÂN VI SINH VẬT CỐ ĐỊNH NITƠ PHÂN TỬ (ĐẠM SINH HỌC)

Vài thập kỉ nay ở Việt Nam, chế phẩm VSV và phân VSV cố định nitơ đã được nhiều người dân biết đến. Những loại chế phẩm này đã thực sự góp phần làm tăng năng suất, chất lượng nông sản của các loại cây trồng và thúc đẩy phát triển nền nông nghiệp bền vững ở nước ta.

Có rất nhiều tên gọi chế phẩm VSVCĐN khác nhau : Nitragin ; Riđafo ; Rhizobin ; Rizolu ; Azotobacterin ; Flavobacterin ; Azogin ; Enterobacterin v.v...

4.1. Định nghĩa

Phân bón VSV cố định nitơ (Biological nitrogen fixing fertilzer) (tên thường gọi : phân VSV cố định đạm, phân đạm vi sinh) là sản phẩm chứa một hay nhiều chủng, giống VSV còn sống đã được tuyển chọn với mật độ đạt tiêu chuẩn hiện hành, có khả năng cố định nitơ, cung cấp các hợp chất chứa nitơ cho đất và cây trồng ; tạo điều kiện nâng cao năng suất cây trồng và chất lượng nông sản. Phân bón VSV cố định nitơ không gây ảnh hưởng xấu đến người, động, thực vật và môi trường sinh thái.

4.2. Quy trình sản xuất

4.2.1. Phân lập tuyển chọn chủng vi sinh vật cố định nitơ (VSVCĐN)

Muốn có chế phẩm VSVCĐN tốt, phải có chủng VSV có cường độ cố định nitơ cao, sức cạnh tranh lớn, thích ứng ở pH rộng, phát huy được ở

nd Split Unregistered Version - http://www.simpopdf.com
nhiều vùng sinh thái khác nhau. Vì vậy công tác phân lập, tuyển chọn chủng VSVCĐN và đánh giá đặc tính sinh học của các chủng khuẩn là việc làm không thể thiếu được trong quy trình sản xuất chế phẩm VSVCĐN. Thông thường đánh giá một số chỉ tiêu sau : thời gian mọc ; kích thước khuẩn lạc và kích thước tế bào VSV ; điều kiện sinh trưởng, phát triển (nhu cầu dinh dưỡng, nhu cầu oxi, pH và nhiệt độ thích hợp) ; khả năng cạnh tranh và cường độ cố định nitơ phân tử. Chủng giống VSV sau khi tuyển chọn, được bảo quản phù hợp với yêu cầu của từng loài và sử dụng cho sản xuất chế phẩm dưới dạng chủng giống gốc.

4.2.2. Nhân sinh khối

- Từ chủng VSV tuyển chọn, người ta tiến hành nhân sinh khối VSV theo phương pháp lên men chìm hoặc lên men xốp. Sinh khối VSV cố định nitơ được nhân qua cấp 1, 2, 3 trong các điều kiện phù hợp với từng chủng loại VSV và mục đích sản xuất. Các sản phẩm phân VSV sản xuất từ vi khuẩn được tạo ra chủ yếu bằng phương pháp lên men chìm (Submerged culture). Trong sản xuất công nghiệp, môi trường dinh dưỡng chuẩn không được sử dụng vì giá thành quá cao. Các nhà sản xuất đã phải tìm môi trường thay thế từ các nguồn nguyên liệu sẵn có, đó là : tinh bột ngô, sắn, rỉ mật, nước chiết ngô, thay cho nguồn dinh dưỡng cacbon, nước chiết men, nước chiết đậu tương, amoniac thay cho nguồn dinh dưỡng nitơ.

- Trong quá trình sản xuất, việc kiểm tra và điều chỉnh các yếu tố môi trường (pH, liều lượng, tốc độ khí, áp suất, nhiệt độ...) là hết sức cần thiết. Các yếu tố này theo Walter (1996) nên được điều chỉnh tự động. Các hệ thống lên men hiện nay đã được trang bị hiện đại, có công suất từ hàng chục đến hàng trăm ngàn lít.

- Trên cơ sở nghiên cứu, khảo sát tình hình thực tế ở một số quốc gia gần đây về cố định nitơ sinh học NifTAL (Hoa Kì) và trung tâm cố định nitơ (Úc) đã nghiên cứu và chế tạo thành công nồi lên men đơn giản để tạo ra sinh khối vi khuẩn, có thể sử dụng trong điều kiện bán công nghiệp ở các nước phát triển. Nồi lên men đơn giản kiểu này đang được sử dụng tại Thái Lan, Ấn Độ và một số quốc gia khác, trong đó có Việt Nam.

4.2.3. Xử lí sinh khối, tạo sản phẩm

- Sinh khối VSV được phối trộn với chất mang vô trùng hoặc không vô trùng để tạo ra chế phẩm trên nền chất mang vô trùng hoặc không vô trùng ; hoặc được bổ sung các chất phụ gia, chất dinh dưỡng, bảo quản để tạo ra chế phẩm dạng lỏng hoặc cô đặc, làm khô để tạo ra chế phẩm dạng đông khô hoặc khô.

Split Unregistered Version - http://www.simpopdf.com

- Để đảm bảo chất lượng trong quá trình sản xuất chế phẩm VSV nói chung và chế phẩm VSV cố định nitơ nói riêng, cần thiết phải kiểm tra chất lượng ở các công đoạn sản xuất sau :

+ Giống gốc và lên men cấp 1.

+ Lựa chọn chất mang và chuẩn hóa chất mang.

+ Lên men sinh khối.

+ Xử lí và phối trộn sinh khối.

+ Đóng gói và bảo quản.

4.3. Phương pháp sử dụng chế phẩm VSVCĐN

Có rất nhiều cách bón chế phẩm VSVCĐN, dựa vào từng loại cây trồng khác nhau, mà định ra phương pháp bón khác nhau sao cho hiệu quả cao nhất.

- Đối với chế phẩm VSVCĐN tự do, thường được hồ vào hạt hoặc rễ cây khi còn non, hay bón trực tiếp vào đất. Nhưng nhìn chung bón càng sớm càng tốt.

- Đối với chế phẩm VSVCĐN cộng sinh, thường được trộn vào hạt trước khi gieo hạt giống hoặc tưới phủ sớm, không muộn quá 20 ngày sau khi cây mọc.

4.3.1. Bón chế phẩm VSVCĐN vào đất

Theo phương pháp này có nhiều cách bón chế phẩm VSVCĐN :

- Có thể trộn đều chế phẩm với đất nhỏ tơi, sau đó đem rắc đều vào luống trước khi gieo hạt trên ruộng cạn ; hoặc rắc đều ra mặt ruộng (nếu là ruộng nước).

- Có thể đem chế phẩm ủ hoặc trộn với phân chuồng hoai, sau đó bón đều vào luống rồi gieo hạt (nếu là ruộng cạn) ; hoặc rắc đều ra mặt ruộng (nếu là ruộng nước).

- Người ta có thể trộn chế phẩm VSV với đất hoặc với phân chuồng hoai, sau đó đem bón thúc sớm cho cây (càng bón sớm càng tốt).

Phương pháp này nhằm tăng số lượng VSV hữu ích vào đất.

4.3.2. Phương pháp phun chế phẩm VSVCĐN lên cây hoặc vào đất

Theo phương pháp này, khi cây đã nảy mầm, thì dùng chế phẩm được hoà vào nước sạch, tưới trực tiếp vào cây hay vào đất (người ta thường gọi là phương pháp tưới phủ sớm).

4.4. Hiệu quả của chế phẩm VSVCĐN

4.4.1. Phân vi khuẩn nốt sần

- Cố định nitơ phân tử do cộng sinh giữa vi khuẩn nốt sần và rễ cây bộ Đậu, hàng năm cung cấp thêm cho đất và cây trồng 40 - 552kg N/ha. Kết quả nghiên cứu của Viện cây trồng nhiệt đới Cộng hoà Liên bang Nga

Split Unregistered Version - http://www.simpopdf.com
cho thấy : cứ 3 năm trồng cây đậu đỗ, làm giàu cho đất 300 - 600kg N/ha ; cho 13-15 tấn mùn ; cải thiện quá trình khoáng hoá trong đất và đẩy ra từ keo đất 60 - 80 kg P_2O_5/ha ; 80 – 120kg K_2O/ha. Bón chế phẩm VSVCĐN làm giàu cho đất 50 – 120kg N/ha/năm. Có thể thay thế được 20 – 60kg đạm Urê/ha, giảm tỉ lệ sâu, bệnh từ 25% đến 50% so với không bón phân VSV.

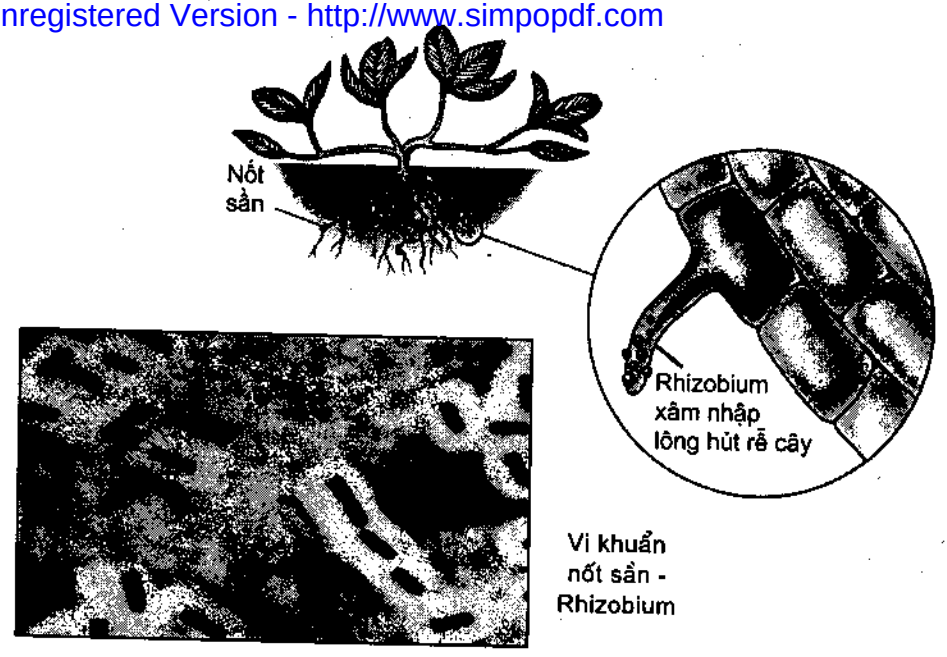
- Trong hơn 20 năm, qua các công trình nghiên cứu và thử nghiệm phân vi khuẩn nốt sần tại Việt Nam cho thấy ; phân vi khuẩn nốt sần có tác dụng nâng cao năng suất lạc vỏ 13,8 – 17,5% ở các tỉnh phía Bắc và miền Trung ; 22% ở các tỉnh miền Nam. Các kết quả nghiên cứu cũng cho thấy : sử dụng phân vi khuẩn nốt sần kết hợp với lượng đạm khoáng tương đương 30 – 40kg N/ha mang lại hiệu quả kinh tế cao, năng suất lạc đạt trong trường hợp này có thể tương đương như khi bón 60 và 90kg N/ha. Hiệu lực của phân vi khuẩn nốt sần thể hiện đặc biệt rõ nét trên vùng đất nghèo dinh dưỡng và vùng đất mới trồng cây bộ Đậu. Lợi nhuận do phân vi khuẩn nốt sần được xác định đạt 442.000VNĐ/ha với tỉ lệ lãi suất/1đồng chi phí đạt 9,8 lần (Ngô Thế Dân và CTV 2001).

BẢNG 1. HIỆU LỰC CỦA PHÂN VI KHUẨN NỐT SẦN TẠI MỘT SỐ VÙNG TRỒNG LẠC Ở MIỀN BẮC

Loại đất	Điều kiện thí nghiệm	Năng suất lạc vỏ (tạ/ha)		Hiệu lực của phân VKNS (tạ/ha)	So với đối chứng (%)
		Đối chứng	Phân VKNS		
Bạc màu	P60, K60, N20-30, 5 tấn phân chuồng	19,72	22,72	3,0	115,2
Phù sa sông Hồng	P60, K60, N30, 5 tấn phân chuồng	23,1	26,31	3,21	113,8
Đất đồi Feralit	P60, K60, N20-30, 5 tấn phân chuồng	15,76	18,53	3,76	117,5
Luân canh rau – lạc	P60, K40, N20, 500kg vôi	14,7	16,3	1,7	111
Luân canh rau – lạc	40kg Urê, 300kg lân, 400kg vôi, 3 tấn phân hữu cơ	-	-		138
Luân canh lúa (rau) – lạc	P60, K40, N30, 3 tấn phân hữu cơ, 100kg vôi	22,0	24,6	2,6	112

(Nguồn : Nguyễn Xuân Thành. 1996)

Split Unregistered Version - http://www.simpopdf.com



Hình 8.6. Cơ chế của quá trình cố định nitơ phân tử ở cây họ Đậu

V - CHẾ PHẨM VI SINH VẬT DÙNG TRONG PHÒNG TRỪ SÂU, BỆNH HẠI CÂY TRỒNG

5.1. Chế phẩm vi sinh vật từ virus

5.1.1. Những nhóm virus chính gây bệnh côn trùng

a) *Nhóm virus đa diện ở nhân (NPV) :*

- Nhóm NPV gồm những virus gây bệnh côn trùng, thuộc họ *Baculoviridae*, có thể vùi là hình khối đa diện và chúng kí sinh trong nhân tế bào vật chủ. Thể vùi của NPV ở tằm gồm 17 loại axit amin. Trong thể vùi chứa nhiều virion hình que.

- Sâu bị bệnh do NPV trở nên ít hoạt động, ngừng ăn ; cơ thể chúng có màu sắc sáng hơn sâu khoẻ ; căng phồng, trương phù, chứa toàn nước ; khi có tác động cơ giới lên bề mặt cơ thể dễ dàng bị phá vỡ và giải phóng dịch virus. Các sâu bị chết bệnh do NPV đều bị treo ngược trên cây. Nếu sâu bị chết do NPV ở tế bào thành ruột thì phần đầu lại bám chặt vào các bộ phận của cây.

- NPV có tính chuyên hoá rất cao, đứng thứ 2 sau GV (nhóm virus hạt). Thường NPV của loài côn trùng nào thì gây bệnh cho loài đó. Riêng NPV của sâu xanh *Baculovirus heliothis* thì có thể gây bệnh cho 7 loài sâu xanh *Heliothis* trên thế giới. Một số NPV khác có thể gây bệnh cho 2 hoặc vài loài côn trùng. Các virus NPV thường kí sinh trong tế bào hạ bì, thể

Split Unregistered Version - http://www.simpopdf.com
mỡ, khí quản, dịch huyết tương và biểu mô ruột giữa. NPV có thể gây bệnh cho côn trùng thuộc 7 bộ : cánh cứng, hai cánh, cánh màng, cánh vảy, cánh mạch, cánh thẳng và cánh nửa.

b) *Nhóm virus hạt (GV)*

GV virus thuộc họ *Baculoviridae*, có thể vùi dạng hạt. Mỗi thể vùi chỉ chứa có một virion, hiếm khi chứa hai virion. Virion của virus hạt cũng có dạng que.

Sâu bị bệnh do GV thường còi, chậm lớn, cơ thể phân đốt rất rõ ràng, tầng biểu bì cơ thể trở nên sáng màu, đôi khi có màu phớt hồng, huyết tương có màu trắng sữa. Virus hạt có tính chuyên hoá cao nhất trong các virus gây bệnh côn trùng. Virus hạt gây bệnh cho sâu xám mùa đông *Agrotis segetum*, không gây bệnh cho các loài sâu xám khác gần gũi với sâu xám mùa đông. Virus hạt chỉ gây bệnh cho côn trùng thuộc bộ cánh vảy. Chưa thấy côn trùng thuộc bộ khác bị bệnh do GV. Virus hạt thường xâm nhiễm mô mỡ, lớp hạ bì và huyết tương. Người ta đã nghiên cứu được siêu cấu trúc của GV ở 9 loài côn trùng.

c) *Nhóm virus đa diện ở dịch tế bào (CPV)*

Virus đa diện ở dịch tế bào thuộc họ *Reoviridae*, kí sinh trong chất dịch tế bào ở các tế bào biểu mô ruột giữa của côn trùng. Virus CPV cũng tạo thành thể vùi. Trong thể vùi của CPV chứa các virion hình cầu gồm 2 sợi ARN. Sâu bị nhiễm CPV sẽ chậm lớn, đôi khi đầu quá to so với cơ thể. Ở giai đoạn cuối của sự phát triển bệnh lí, màu sắc cơ thể sâu có màu sáng giống như phấn trắng, đặc biệt là ở mặt bụng cơ thể. Nếu sâu non tuổi lớn bị nhiễm CPV, thì đến pha trưởng thành sẽ bị chết với tỉ lệ khá cao. Côn trùng bị nhiễm CPV thường tạo thành khối u.

Bệnh do CPV được phát hiện ở côn trùng thuộc 5 bộ : cánh cứng, hai cánh, cánh màng, cánh vảy, cánh mạch. Virus CPV có phổ kí chủ rộng, Sự lan truyền của bệnh tăng lên do sự lan truyền qua kí chủ khác loài. Các mẫu CPV phân lập từ các kí chủ khác nhau thì có tính độc khác nhau. Người ta đã nghiên cứu được siêu cấu trúc của CPV ở 12 loài côn trùng. Nhóm CPV ít được sử dụng trong biện pháp sinh học (BPSH) hơn so với NPV và GV.

Virus được nhiễm vào cơ thể sâu vật chủ, và phát triển trong đó đến khi đạt sinh khối lớn nhất, người ta tiến hành giết sâu vật chủ và xử lí sinh khối virus. Sản phẩm tạo ra có thể là chế phẩm dạng nước hoặc dạng bột khô.

5.1.2. Một số chế phẩm NPV

- Chế phẩm virus NPV sâu xanh : được sản xuất theo quy trình công nghệ đã nêu trên, được thử nghiệm và áp dụng trên đồng ruộng trừ sâu xanh trên bông và thuốc lá ở Sơn La, Hà Nội, Đồng Nai, Sông Bé, Ninh

Split Unregistered Version - http://www.simpopdf.com
Thuận v.v... đều cho kết quả tốt và bảo vệ được năng suất cây trồng. Chế phẩm virus sâu xanh cùng với Ong mắt đỏ là những tác nhân sinh học quan trọng trong hệ thống PTTH sâu hại bông, song chế phẩm có giá thành cao và người nông dân chưa quen sử dụng nên phạm vi áp dụng chế phẩm này còn hạn chế.

- Chế phẩm virus NPV sâu đo đay : Cho đến nay chưa tìm được môi trường thức ăn nhân tạo nuôi sâu này. Do đó, để có sâu vật chủ nhân virus, phải nuôi bằng thức ăn tự nhiên, vì vậy, chế phẩm virus sâu đo đay được sản xuất bằng phương pháp thủ công như sau : Dùng nguồn NPV của sâu đo đay phun lên đồng đay nơi có nhiều sâu, thu gom sâu chết bệnh lại để nghiền lọc lấy dịch virus. Sau đó lại đem phun lên đồng đay. Cứ như vậy, có thể tạo ra chế phẩm virus tại chỗ để trừ sâu đo đay. Việc sản xuất và sử dụng chế phẩm virus sâu đo đay tại chỗ là một biện pháp có triển vọng, rẻ tiền, có hiệu quả kinh tế, người nông dân vùng trồng đay có thể chấp nhận được.

- Chế phẩm virus NPV sâu róm thông : Chế phẩm virus phòng trừ sâu róm thông cũng bằng phương pháp thủ công như sản xuất chế phẩm virus sâu đo xanh đay. Hiệu quả diệt sâu róm thông của chế phẩm virus đạt 55,2 - 83,3%. Chế phẩm này được áp dụng thành công trừ sâu róm thông ở Thanh Hoá. Sử dụng chế phẩm virus sâu róm thông đã hạn chế sử dụng thuốc hoá học và tỉ lệ kí sinh tự nhiên của một số ong kí sinh sâu róm thông tăng lên.

5.2. Chế phẩm vi sinh vật từ vi khuẩn

5.2.1. Khái quát chung về vi khuẩn gây bệnh cho côn trùng và chuột

- Vi khuẩn có ở khắp nơi trên Trái Đất, có thể xâm nhập vào tất cả các phần cơ thể của mọi sinh vật nói chung và của côn trùng nói riêng. Chúng có thể ở khoang miệng, ruột, hệ thống hô hấp, cơ quan sinh dục,... Vi khuẩn có quan hệ với côn trùng rất đa dạng và được chia thành nhóm vi khuẩn hình thành bào tử và không hình thành bào tử.

+ Vi khuẩn hình thành bào tử bao gồm tất cả vi khuẩn gây bệnh bắt buộc. Những vi khuẩn gây bệnh bắt buộc là vi khuẩn luôn liên quan với một loại bệnh nhất định ở côn trùng. Trong tự nhiên, vi khuẩn gây bệnh bắt buộc thường chỉ thích nghi với một phổ kí chủ hẹp.

+ Vi khuẩn không hình thành bào tử bao gồm một loài gây bệnh hoàn toàn không bắt buộc và tất cả những loài vi khuẩn có tiềm năng gây bệnh cho côn trùng. Vi khuẩn gây bệnh không bắt buộc có thể làm tổn hại hoặc xâm nhiễm vào những mô của cơ thể côn trùng mẫn cảm với chúng, nhưng không thể xếp chúng vào nhóm vi khuẩn gây bệnh bắt buộc. Trước khi xâm nhập vào xoang máu, vi khuẩn gây bệnh không bắt buộc thường sinh sản

Split Unregistered Version - http://www.simpopdf.com
trong ruột côn trùng. Vi khuẩn gây bệnh không bắt buộc có thể nuôi cấy trên môi trường thức ăn nhân tạo. Vi khuẩn có tiềm năng gây bệnh, bình thường không sinh sản ở trong ruột côn trùng, nhưng chúng có thể xâm nhập vào xoang máu. Những vi khuẩn này phát triển được trên môi trường thức ăn nhân tạo, không chuyên tính với từng nhóm côn trùng riêng biệt.

- Vi khuẩn sử dụng trong biện pháp sinh học BPSH trừ dịch hại thuộc bộ *Eubacteriales*, đặc biệt là thuộc họ *Enterobacteriaceae, Micrococcaceae, Bacillaceae* và một số giống thuộc họ *Pseudomonadeceae* (bộ *Pseudomonadales).*

+ Họ *Pseudomonadeceae* gồm các loại vi khuẩn hình que, gram âm, không hình thành bào tử. Các loài *Pseudomonas aeruginosa, P. chlororaphis, P. fluorescens,...* là những vi khuẩn có tiềm năng gây bệnh cho côn trùng.

+ Họ *Enterobacteriaceae* gồm các loài vi khuẩn sống ở ruột côn trùng. Chúng có dạng hình que, gram âm, không hình thành bào tử. Phát triển tốt trên môi trường dinh dưỡng bình thường. Vi khuẩn thuộc họ này có loài là kí sinh bắt buộc, không bắt buộc và hoại sinh.

+ Họ *Bacillaceae* gồm vi khuẩn hình thành bào tử, gram dương, hình que. Có ý nghĩa trong BPSH là các loài thuộc giống *Bacillus.*

5.2.2. Một số vi khuẩn được nghiên cứu ứng dụng trong phòng chống côn trùng và chuột hại

- Vi khuẩn *Coccobacillus acridiorum :*

Đây là vi khuẩn gây bệnh cho côn trùng đầu tiên được D'Herelle nghiên cứu và mô tả vào năm 1911 tại Mexico. Vi khuẩn có dạng hình que nhỏ, gram âm và được gọi tên ban đầu là *C. acridiorum*, gây bệnh nhiễm trùng máu cho châu chấu, có thể nuôi trên môi trường nhân tạo. Sản phẩm từ vi khuẩn *Coccobacillus acridiorum* được áp dụng tương đối thành công ở Mexico, Colombia, Argentia. Theo hệ thống phân loại hiện đại, vi khuẩn có thể là loài *Enterobacter cloacae var. acridiorum.*

- Vi khuẩn gây bệnh sữa cho ấu trùng bọ hung :

Bệnh sữa được phát hiện đầu tiên ở ấu trùng bọ hung ở Nhật Bản *Popillia japonica* từ năm 1921 gồm 2 dạng cơ bản là dạng A và B. Vi khuẩn gây nên 2 dạng bệnh này được mô tả với tên *Bacillus popolliae* (dạng bệnh A) và *B. lentimormus* (dạng bệnh B). Trong 2 loài vi khuẩn này thì loài *B. popolliae* gặp phổ biến hơn, chiếm 88% trường hợp và được chú ý nghiên cứu hơn. Loài *B. popolliae* là vi khuẩn kí sinh bắt buộc, gram dương, bào tử có tính kháng cao với các điều kiện bất lợi của môi trường, lây nhiễm bệnh cho bọ hung qua đường tiêu hoá. Sau khi xâm nhập vào vật chủ 3-4 ngày thì vi khuẩn bắt đầu sinh bào tử, tới ngày thứ 13-16 thì bào tử của vi khuẩn đạt tới mức tối đa. Trên môi trường thức

Split Unregistered Version - http://www.simpopdf.com
ăn nhân tạo, vi khuẩn không hình thành bào tử, vì vậy phải nuôi nhân vi khuẩn này trên ấu trùng bọ hung Nhật Bản. Sau 20 ngày ủ bệnh, một ấu trùng bọ hung Nhật Bản tích luỹ tới 20 tỉ bào tử. Từ các sâu bị bệnh, có thể gom vi khuẩn và sản xuất thành chế phẩm dạng bột chứa 100 triệu bào tử trong 1 gam chế phẩm.

- Vi khuẩn *Bacillus cereus* :

Là vi khuẩn rất phổ biến trong tự nhiên, gram dương, hình thành bào tử nhưng không tạo thành tinh thể độc. Tính gây bệnh cho côn trùng của vi khuẩn này rất khác nhau. Người ta cho rằng tính gây bệnh của *B. cereus* chủ yếu liên quan tới sự tạo thành men photpholipaza và một loại ngoại độc tố như của *Bacillus thuringiensis*.

- Vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* :

Đây là vi khuẩn gây bệnh côn trùng quan trọng nhất, được nghiên cứu sử dụng rộng rãi để trừ nhiều sâu hại trên thế giới. Vi khuẩn *B. thuringiensis* hình que, gram dương, hình thành bào tử và tinh thể độc tố. Tính độc hay tính diệt sâu của vi khuẩn *B. thuringiensis* phụ thuộc vào các độc tố do vi khuẩn sinh ra trong quá trình sinh trưởng và phát triển của chúng. Theo Kreig, Langenbrusch (1981) có gần 525 loài thuộc 13 bộ côn trùng đã ghi nhận bị nhiễm vi khuẩn *B. thuringiensis*, trong đó nhiều nhất là ở bộ cánh vảy (có 318 loài), sau đó là bộ hai cánh (59 loài), bộ cánh màng (57 loài), bộ cánh cứng (34 loài) ; các bộ khác có từ 1-12 loài bị nhiễm vi khuẩn này.

+ Vi khuẩn *Serratia marcescens* :

Đây là một vi khuẩn hình que, gram âm, không hình thành bào tử, kí sinh không bắt buộc trên côn trùng. Tính gây bệnh cho côn trùng của vi khuẩn này được ghi nhận trong tài liệu từ năm 1886 (Masera, 1936). Vi khuẩn *S. marcescens* đã gây dịch cho bọ hung *Melolontha melolontha*, tằm và được sử dụng thành công trừ sâu đục thân ngô. Vi khuẩn có tính gây bệnh cao cho châu chấu *Melanoplus bivittatus*, một số rệp sáp *Pseudococcus*, sâu non *Pieris brassicae*, *Limantria dispar*, *Euproctis chrysorrhoea*, *Agrotis segertum*, bọ xít *Eurygaster* v.v...

- Vi khuẩn *Salmonella enteridis* :

Đây là vi khuẩn gây bệnh thương hàn ở chuột và một số loài gặm nhấm khác. Vi khuẩn *S. enteridis* là kí sinh bắt buộc, gram âm, không hình thành bào tử. Vi khuẩn *S. enteridis* phân lập được từ xác chết của chuột trong các trận dịch từ năm 1893 đến 1897 ở Nga và năm 1893 ở Pháp. Năm 1950, Prokhorov đã phân lập được một chủng mới gây bệnh cho chuột, kí hiệu là N0 5170. Vi khuẩn này có tính chọn lọc rất cao thể hiện ngay với từng loài gặm nhấm, chúng không nguy hiểm cho người và động vật nuôi trong nhà (ngựa, trâu bò, lợn, gà, vịt, ngỗng, chó, mèo...).

Split Unregistered Version - http://www.simpopdf.com

Tính độc của vi khuẩn *S. enteridis* thay đổi do liên tục cấy truyền trên môi trường thức ăn nhân tạo cũng như trong bảo quản dài hạn trên các môi trường đó. Đặc biệt tính độc sẽ giảm nhanh khi môi trường bị axit hoá.

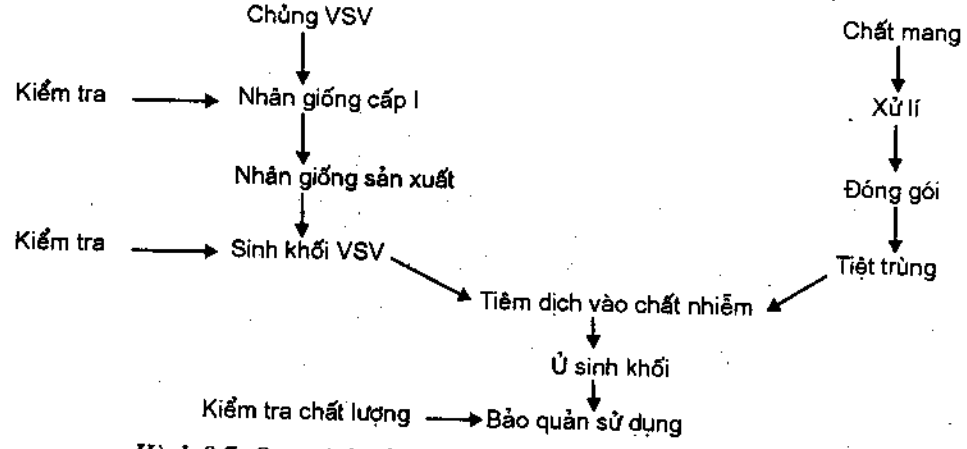
5.2.3. Một số chế phẩm vi khuẩn phòng trừ sâu bệnh

- Chế phẩm *Bacillus thuringiensis* (BT) :

Từ năm 1970 ở Việt Nam bắt đầu nghiên cứu sản xuất BT. Viện Công nghiệp thực phẩm, Viện Bảo vệ thực vật, Đại học khoa học tự nhiên, ĐHQG Hà Nội, Trung tâm vi sinh, Tổng công ti hoá chất...đang sản xuất loại chế phẩm này trên quy mô công nghiệp với chủng *Bacillus thuringiensis var. kurstaki*. Bước đầu các chế phẩm BT đã được đưa vào sử dụng trừ một số sâu hại như sâu tơ, sâu xanh bướm trắng v.v...

- Chế phẩm VSV phòng trừ chuột :

Chế phẩm VSV diệt chuột của Liên Xô (cũ) *Bacterodensid* là sản phẩm được sản xuất từ vi khuẩn *Salmonella enteriditis* có tác dụng gây bệnh và làm chết các loại chuột nhà, chuột đồng, chuột cống, chuột đen... Chế phẩm đã được sử dụng rộng rãi tại Liên Xô (cũ), Mông Cổ và Cu Ba, mang lại hiệu quả phòng trừ chuột cao. Tại Việt Nam, chế phẩm VSV phòng trừ chuột mang tên BIORAT (công ti BIOFARM- Cuba, MIROCA - Viện Khoa học kĩ thuật nông nghiệp Việt Nam, Bả diệt chuột sinh học- Viện Bảo vệ thực vật) đã được thử nghiệm trên các đối tượng chuột của Việt Nam. Kết quả thử nghiệm cho thấy chế phẩm có tác dụng tốt trong việc gây ốm và làm chết các loại chuột, lại không gây ảnh hưởng xấu đến các loại gia súc, gia cầm. Sản phẩm VSV phòng trừ chuột đã được đăng kí vào danh mục thuốc bảo vệ thực vật được phép sử dụng tại Việt Nam và được ứng dụng rộng rãi tại nhiều địa phương trong cả nước. Quy trình sản xuất chế phẩm VSV phòng trừ chuột được tóm tắt trong sơ đồ dưới đây :



Hình 8.7. Quy trình sản xuất chế phẩm VSV phòng trừ chuột

olit Unregistered Version - http://www.simpopdf.com

5.3. Chế phẩm vi sinh vật diệt sâu hại từ nấm

- Nấm đối kháng có thể kìm hãm sinh trưởng phát triển của các nấm gây bệnh cây. Dưới đây là một số nấm đối kháng thường gặp.

Các nấm *Penicillium oxalicum, P. frequentans, P. vermiculatum, P. nigricans, P. chrysogetum* là những loài đối kháng của nấm *Pythium* spp, *Rhioctonia solani, Sclerotium cepivorum, Verticillium alboatrum* (martin et al., 1985). Cơ chế tác động của nấm *Penicillium* chưa được biết rõ ràng.

- *Trichoderma* là nhóm nấm đối kháng được nhiều nước nghiên cứu để trừ bệnh hại cây. Những loài phổ biến là : *T. hamatum, T. harzianum.* Các nấm *Trichoderma* có thể kìm hãm nấm gây bệnh cây thông qua các cơ chế tiết kháng sinh, men đặc trưng và có thể kí sinh trên các nấm gây bệnh cây. Hiện tượng kí sinh của nấm *Trichoderma* trên nấm gây bệnh cây được gọi là hiện tượng "giao thoa sợi nấm". Trước tiên sợi nấm của *Trichoderma* vây quanh sợi nấm gây bệnh, sau đó các sợi nấm *Trichoderma* thắt chặt lấy các sợi nấm gây bệnh, cuối cùng nấm *Trichoderma* xuyên qua sợi nấm gây bệnh, làm thủng màng ngoài của nấm gây bệnh, gây nên sự phân huỷ các chất nguyên sinh trong sợi nấm gây bệnh cây.

- Nấm *Aspergillus niger* đối kháng với các nấm *Fusarium solani, Rhizoctonia solania, Alternaria alternata.* Nấm *Aureobasidium pollulans* và *Sporobolomyces roseus* là đối kháng với nấm *Septoria nodorum.* Nấm *Cercospora kikuchii* đối kháng nấm *Diaporthe phaseolorum var. sojae.*

HƯỚNG DẪN ÔN TẬP

1. VSV đất, các nhóm chính và cơ chế hoạt động.
2. VSV trong quá trình hình thành và kết cấu mùn.
3. VSV trong quá trình chuyển hoá các hợp chất chứa cacbon trong đất ? (quá trình chuyển hoá xenlulo, xilan, pectin, lignin, tinh bột).
4. VSV trong quá trình chuyển hoá các hợp chất chứa nitơ trong đất (quá trình cố định nitơ phân tử, quá trình amôn hoá, quá trình nitrat hoá, quá trình phản nitrat hoá).
5. Các loại phân đạm sinh học, quy trình sản xuất, cách sử dụng và hiệu quả bón cho cây nông, lâm nghiệp.
6. Các loại chế phẩm VSV dùng trong bảo vệ thực vật. Quy trình sản xuất, cách sử dụng và hiệu quả diệt côn trùng gây hại cây trồng (chế phẩm từ virus, chế phẩm từ vi khuẩn, chế phẩm từ nấm).

Split Unregistered Version - http://www.simpopdf.com

Chương 9

VI SINH VẬT ỨNG DỤNG TRONG CHĂN NUÔI, THÚ Y

I – VI SINH VẬT ỨNG DỤNG TRONG THÚ Y

1.1. Quan hệ giữa cơ thể - vi sinh vật - môi trường

Mỗi bệnh truyền nhiễm có quá trình phát sinh, phát triển và ngừng tắt của nó, các quá trình đó tuân theo những quy luật nhất định.

Mọi bệnh trạng của người và gia súc không phải xảy ra một cách ngẫu nhiên, vô cớ, mà tất cả các bệnh trạng đều có những yếu tố chi phối nhất định. Nghiên cứu những yếu tố này tức là nghiên cứu những tác động qua lại giữa cơ thể với những yếu tố nội, ngoại sinh có liên quan tới sức khoẻ, thực chất đó là mối tương quan giữa cơ thể với VSV gây bệnh cùng những yếu tố của môi trường ngoại cảnh.

Mối quan hệ giữa cơ thể vật chủ - VSV - môi trường ngoại cảnh là mối quan hệ khăng khít, là nguyên nhân của sự không ổn định về sức khoẻ, đưa đến phát sinh bệnh, mối quan hệ đó bao gồm :

- Sức gây bệnh của VSV và khả năng nhiễm bệnh của động vật.
- Tính thụ cảm, sức chống đỡ và sức miễn dịch của cơ thể.
- Các yếu tố ngoại cảnh.

1.1.1. Điều kiện để bệnh phát triển

a) *Yếu tố gây bệnh hay tác nhân gây bệnh*

Yếu tố gây bệnh hay tác nhân gây bệnh bao gồm các yếu tố sinh học, lí học, hoá học... Tác nhân gây bệnh là một nguyên nhân cần thiết nhưng chưa đủ để gây nên bệnh mà còn phải có đủ về số lượng và độc lực, đồng thời phải có sự hỗ trợ của yếu tố bên trong là vật chủ và yếu tố bên ngoài là môi trường ngoại cảnh, thì bệnh mới có thể phát sinh được, nhưng tác nhân gây bệnh là một yếu tố bắt buộc phải có, là điều kiện cần thiết đóng vai trò quyết định trong việc tạo nên dịch bệnh, là nguyên nhân đưa đến các hậu quả.

- Tác nhân gây bệnh có thể truyền bệnh theo chiều dọc :

Mẹ → con → cháu...

- Hoặc truyền theo chiều ngang :

Truyền trực tiếp, truyền gián tiếp, truyền bệnh do vận chuyển, do xe cộ.

Split Unregistered Version - http://www.simpopdf.com

Truyền theo không khí, gió, bụi...

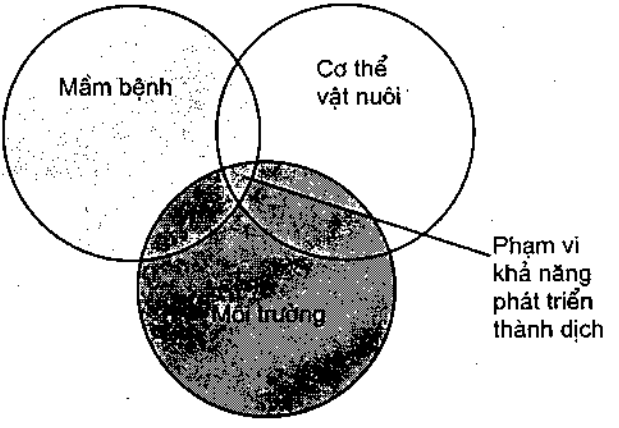
Tác nhân nào bắt buộc phải có để bệnh phát sinh thì được gọi là tác nhân gây bệnh chủ yếu.

b) *Yếu tố cơ thể hay còn gọi là yếu tố bên trong*

Yếu tố bên trong là cơ thể động vật với các đặc trưng của chúng như loài cảm nhiễm, giống cảm nhiễm, tuổi cảm nhiễm, giới tính cảm nhiễm, đặc tính di truyền, trạng thái sinh lí, trạng thái bệnh lí, tình trạng sức khoẻ của động vật, các yếu tố di truyền v.v...

c) *Yếu tố môi trường ngoại cảnh hay còn gọi là yếu tố bên ngoài*

Các yếu tố của môi trường ngoại cảnh có nhiều và có thể làm ảnh hưởng đến sự phát sinh và phát triển của bệnh như các yếu tố của tự nhiên (khí hậu, thời tiết, địa lí, địa hình, nhiệt độ, ánh sáng, không khí, độ ẩm...) ; các yếu tố do con người tạo ra (chuồng trại, vệ sinh, dinh dưỡng, chăm sóc, dụng cụ nuôi dưỡng...).



Hình 9.1. *Mối quan hệ giữa cơ thể - mầm bệnh - môi trường ngoại cảnh*

1.2. Hiện tượng nhiễm trùng

Nhiễm trùng là hiện tượng xảy ra khi mầm bệnh là VSV xâm nhập vào cơ thể động vật trong những điều kiện nhất định của ngoại cảnh.

- Trước đây người ta cho rằng : nhiễm trùng là kết quả tác hại của VSV gây bệnh (gọi là mầm bệnh) khi nó xâm nhập và phát triển trong cơ thể, vai trò chủ yếu gây nên nhiễm trùng là mầm bệnh, còn cơ thể chỉ đóng vai trò thụ động như một môi trường cung cấp nguyên liệu dinh dưỡng cho mầm bệnh.

Nhận thức này hoàn toàn không đúng vì chỉ coi trọng vai trò của VSV gây bệnh, tách VSV ra khỏi cơ thể và những yếu tố của môi trường ngoại cảnh, vì vậy đã không giải thích được một hiện tượng trong thực tế là cùng trong một hoàn cảnh nhiễm trùng, có con vật mắc bệnh, có con không mắc, có con vật mắc bệnh nặng, có con vật mắc bệnh nhẹ, có con vật chết, có con lành ; nhận thức đó cũng không dựa vào một đặc tính cơ bản của sinh vật là tính phản ứng của cơ thể đối với mọi kích thích.

Split Unregistered Version - http://www.simpopdf.com

- Metsnhicop lần đầu tiên đã đưa ra một khái niệm đúng đắn về nhiễm trùng : "Nhiễm trùng là một cuộc đấu tranh giữa hai sinh thể".

Nhiễm trùng là một trạng thái đặc biệt của cơ thể, là kết quả xảy ra khi mầm bệnh là VSV gây bệnh xâm nhập vào cơ thể, gặp những điều kiện thích hợp cho sự phát triển, sinh sôi nảy nở và phát huy tác hại của nó, nhưng đồng thời cũng kích thích cơ thể phản ứng lại, cơ thể huy động mọi cơ năng bảo vệ để chống đỡ. Hiện tượng đấu tranh giữa hai sinh thể này (cơ thể và VSV) diễn ra trong điều kiện nhất định của ngoại cảnh, nên nó còn chịu ảnh hưởng của nhiều yếu tố khác.

- Sau đó Paplop cũng coi nhiễm trùng là một quá trình sinh vật học phức tạp, bắt đầu bằng cuộc đấu tranh giữa VSV và cơ thể bị xâm nhiễm. Đây là một khái niệm cơ bản quán triệt trong mọi mặt của công tác phòng chống bệnh truyền nhiễm của người và gia súc.

Những VSV kí sinh trong cơ thể, nhưng không xâm nhập vào mô thì không gọi là nhiễm trùng. Trong số những VSV kí sinh này, phần lớn là không gây bệnh, nhưng khi sức đề kháng của cơ thể suy giảm thì chúng có thể gây bệnh như vi khuẩn tụ huyết trùng, đóng dấu lợn. *Salmonella* bình thường chúng vẫn cư trú trong cơ thể gia súc khoẻ, nhưng nếu có điều kiện là chúng có thể gây bệnh, chúng được gọi là VSV gây bệnh cơ hội.

1.2.1. Khả năng gây nhiễm trùng của vi sinh vật gây bệnh

a) *Số lượng vi sinh vật*

Độc lực đi đôi với số lượng VSV gây bệnh nhiễm vào trong cơ thể, số lượng xâm nhập càng nhiều thì bệnh thể hiện càng nặng, có loại mầm bệnh chỉ cần số lượng rất ít cũng đủ gây bệnh (virus dịch tả lợn, vi khuẩn *Pasteurella, Brucella*), nhưng có loại phải cần nhiều mới gây bệnh được (virus loét da, quăn tai).

Tính đặc trưng cho độc lực của một VSV gây bệnh được xác định bằng liều tối thiểu gây chết 50% động vật (MLD = Minimal Lethal Dose), tức là lượng VSV gây bệnh ít nhất có thể làm chết 50% động vật thí nghiệm trong những điều kiện nhất định.

- Đường xâm nhập của VSV :

+ Mỗi loại VSV gây bệnh có một đường xâm nhập thích hợp, đường xâm nhập thích hợp là đường mà ở đó VSV dễ dàng phát triển và gây bệnh.

+ Khi gặp đường xâm nhập thích hợp thì chỉ cần số lượng ít VSV gây bệnh cũng phát huy được độc lực của nó, nếu đường xâm nhập không thích hợp thì phải có số lượng nhiều mới gây được bệnh, hoặc gây bệnh không điển hình, hoặc không gây được bệnh, hoặc ngược lại, gây miễn dịch.

Split Unregistered Version - http://www.simpopdf.com

- VSV gây bệnh phát huy được độc lực hay không còn tuỳ thuộc vào cơ thể cảm thụ, một VSV có thể có độc lực với loài động vật này, với cá thể này, nhưng lại không gây bệnh với loài khác, cá thể khác, vì vậy khái niệm độc lực không chỉ nói về đặc tính của VSV gây bệnh mà còn nói lên khả năng chống đỡ của cơ thể. Khả năng này làm cho mỗi bệnh truyền nhiễm có tính chất dịch tễ học riêng biệt, điều đó có ý nghĩa rất quan trọng trong công tác phòng chống bệnh truyền nhiễm.

1.3. Phương thức gây bệnh của vi sinh vật

- Sau khi vào cơ thể, VSV gây bệnh có thể gây tác hại tại chỗ như gây viêm, thuỷ thũng, hoại tử ngay chỗ xâm nhập. Sau đó VSV vào khắp cơ thể theo phương thức lan dần do tiếp xúc hoặc theo mạch máu và mạch lâm ba, gây nên những chứng trạng nghiêm trọng như bại huyết, nhiễm trùng huyết..., hoặc theo đường dây thần kinh gây nên rối loạn toàn thân, ngoài ra chúng còn gây nên những tổn thương cục bộ ở xa chỗ xâm nhập.

- Những tổn thương cục bộ còn có thể sinh ra do tính hướng tổ chức đặc biệt của VSV gây bệnh. Rất nhiều VSV gây bệnh có xu hướng khu trú và phát triển chủ yếu ở những loại tổ chức nhất định, tích chất này đặc biệt rõ ở một số loài virus và ngay trong cùng một loài virus có thể có những hướng tổ chức khác nhau như virus đậu hướng dịch hoàn, virus đậu hướng da, virus hespes hướng thần kinh.

- Tính hướng tổ chức là kết quả của quá trình tiến hoá và thích nghi của VSV gây bệnh và cũng là kết quả của sự chống đỡ của cơ thể. Do có nhiều phương thức tác hại khác nhau như vậy, nên VSV gây bệnh có thể gây ra những triệu chứng cục bộ hoặc toàn thân. Triệu chứng toàn thân là những biểu hiện chung cho nhiều bệnh nhiễm trùng, triệu chứng cục bộ là những biểu hiện riêng cho từng bệnh. Dựa trên phương thức tác hại của VSV gây bệnh, dựa vào sự hiểu biết các hiện tượng toàn thân và cục bộ, có thể chẩn đoán được bệnh.

- Một điều đáng chú ý là nhiễm trùng không nhất định phải có triệu chứng biểu hiện ra ngoài, có những bệnh mà các ca bệnh không có triệu chứng so với các ca có triệu chứng chiếm một tỉ lệ khá cao, gây nhiều khó khăn cho điều tra dịch tễ học và công tác phòng bệnh.

Như vậy, nhiễm khuẩn là một quá trình mà VSV xâm nhập vào cơ thể và tồn tại được trong cơ thể vật chủ, trong quá trình đó cơ thể có những phản ứng chống lại.

1.4. Quá trình truyền lây

1.4.1. Nguồn bệnh

Nguồn bệnh là khâu đầu tiên, khâu xuất phát của quá trình truyền lây. Gramasepxki cho rằng nguồn bệnh là nơi mầm bệnh cư trú, sinh sôi nảy

Split Unregistered Version - http://www.simpopdf.com
nở một cách tự nhiên và từ đó được bài ra ngoài. Xuất phát từ đặc điểm kí sinh của VSV gây bệnh, nên nguồn bệnh chỉ có thể là một sinh vật đang mang và bài mầm bệnh là VSV.

Có nhiều loại nguồn bệnh :

a) *Động vật đang phát bệnh*

Gồm có gia súc, gia cầm, dã thú đang mắc bệnh ở các thể. Người đang mắc một số bệnh cũng có thể là nguồn bệnh cho gia súc. Về mặt dịch tễ, những con mắc thể rõ rệt ít nguy hiểm hơn con mắc thể không rõ rệt, con mắc bệnh nặng ít nguy hiểm hơn con mắc bệnh nhẹ.

b) *Động vật mang trùng*

Động vật mang trùng có thể là gia súc, gia cầm, dã thú, chim trời, côn trùng, tiết túc và người. Động vật mang trùng không có triệu chứng bệnh, nhưng VSV gây bệnh vẫn phát triển trong cơ thể và vẫn được bài ra ngoài. Hiện tượng mang trùng có thể bao gồm : con đang ở thời kì nung bệnh ; con mới lành bệnh nhưng còn bài mầm bệnh ; con lành bệnh mang trùng và con khoẻ mang trùng. Loại nguồn bệnh động vật mang trùng là loại nguồn bệnh nguy hiểm nhất, chính loại nguồn bệnh này thường làm cho dịch tái phát trong ổ dịch cũ hoặc làm bệnh lan rộng từ nơi này sang nơi khác.

c) *Nguồn bệnh là người hay gia súc*

Có nhiều bệnh truyền nhiễm của gia súc có thể lây sang người, lúc này gia súc đóng vai trò nguồn bệnh (bệnh dại, sảy thai truyền nhiễm, *Leptospirosis...*). Khi bệnh đã truyền sang người thì cũng có thể lây truyền giữa người với nhau. Có những bệnh của động vật gây nguy hiểm cho người và động vật (như bệnh nhiệt thán), có những bệnh nhẹ ở động vật nhưng lại rất nặng ở người (bệnh xoắn khuẩn do *Leptospira*). Các dã thú và gia súc đóng vai trò quan trọng trong việc gây nên các ổ dịch, vì chúng thường mang trùng.

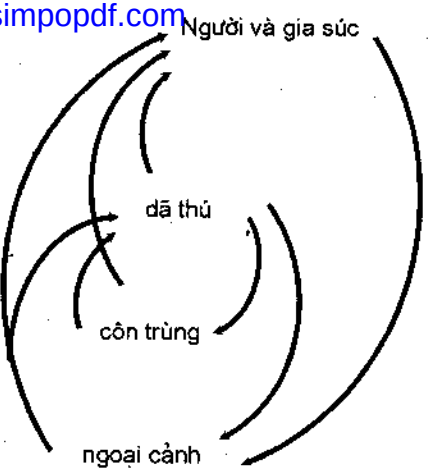
Ngoài ra có một số bệnh của người lại là nguồn bệnh, có thể lây sang cho gia súc, và gia súc trở thành nguồn bệnh để sau này lây sang người (bệnh lao). Đó là những bệnh truyền lây giữa người và động vật (*anthropozoonosis*).

d) *Nguồn dịch thiên nhiên*

Nguồn dịch thiên nhiên là nguồn bệnh sẵn có trong thiên nhiên, ở những vùng nhất định, có sinh cảnh nhất định, có hệ sinh thái nhất định, ở đó người và gia súc chưa hề đi đến. Những vùng đó thường là vùng núi rừng hoang vu và cũng có thể là đồng bằng, sa mạc. Mầm bệnh tồn tại trong các vùng đó chủ yếu là thú rừng, nhất là loài gặm nhấm, bệnh

nd Split Unregistered Version - http://www.simpopdf.com

thường xuyên lưu hành trong các đàn dã thú, những con này có thể phát bệnh chết, nhất là khi bị đói ăn, thời tiết không thích hợp, nhưng chúng thường bị ở thể ẩn, thể khoẻ mang trùng. Bệnh truyền từ con bệnh sang con lành, chủ yếu bằng sinh vật môi giới hút máu : côn trùng, tiết túc.



Hình 9.2. Vòng lây trong nguồn dịch thiên nhiên

Các côn trùng đó không phát bệnh mà chỉ đóng vai trò nhân tố truyền lây hoặc nguồn bệnh và mầm bệnh tồn tại theo dây chuyền *dã thú - côn trùng - dã thú*. Trong một số bệnh, mầm bệnh được dã thú bài ra ngoại cảnh, có thể tồn tại ở đó trong một thời gian (đất, nước, cây cỏ) để rồi nhập vào dã thú lành, trong trường hợp này bệnh truyền theo dây chuyền *dã thú - ngoại cảnh - dã thú*. Khi người hoặc gia súc đi vào những vùng đó, mầm bệnh sẽ từ dã thú, từ côn trùng hoặc từ ngoại cảnh xâm nhập vào và gây ra bệnh, bệnh phát ra từ người và gia súc thường là nặng.

1.5. Yếu tố truyền lây

Yếu tố truyền lây là khâu thứ hai của quá trình truyền lây, nó đóng vai trò trung gian đưa mầm bệnh từ nguồn bệnh tới gia súc thụ cảm. Trên yếu tố truyền lây, mầm bệnh chỉ tồn tại một thời gian nhất định rồi sẽ bị tiêu diệt, thời gian tồn tại đó phụ thuộc vào loại mầm bệnh, loại yếu tố truyền lây.

Các yếu tố truyền lây gồm có những yếu tố sinh vật và những yếu tố không sinh vật.

1.5.1. Côn trùng tiết túc

Côn trùng tiết túc làm vai trò yếu tố truyền lây theo hai cách : truyền lây cơ học và truyền lây sinh học.

- Trong cách truyền lây cơ học, giữa côn trùng và mầm bệnh không có mối quan hệ sinh vật học nào cả, mầm bệnh dính ngoài thân của côn trùng hoặc ở trong cơ thể côn trùng (trong vòi hút, trong ruột). Thời gian tồn tại của mầm bệnh trên thân côn trùng bằng thời gian nó sống ở ngoại cảnh hoặc trên một đồ vật.

- Trong cách truyền lây sinh học có nhiều trường hợp khác nhau, mầm bệnh chỉ có thể nhân lên mà không có biến đổi nào cả ; hoặc mầm bệnh có thể có sự sinh trưởng nhân lên theo chu kì trong kí chủ trung

nd Split Unregistered Version - http://www.simpopdf.com
gian với biến đổi về hình thái, sinh lí ; hoặc mầm bệnh có thể có biến đổi về sinh trưởng theo chu kì chứ không nhân lên.

1.5.2. Các loài động vật khác

Tất cả các loài động vật khác có tiếp xúc với những chất nhiễm trùng đều là những yếu tố truyền lây cơ học, mầm bệnh dính ở trên thân động vật hoặc tạm thời đi qua đường tiêu hoá của động vật, như chim đến rỉa một xác động vật bị nhiệt thán thì mỏ, chân, lông của nó có vi khuẩn và nha bào nhiệt thán, trong phân của nó cũng có bài vi khuẩn một thời gian. Các yếu tố truyền lây này có thể mang mầm bệnh đi xa. Trong các loài động vật truyền mầm bệnh, cần chú ý đến loài gặm nhấm, nhất là chuột vì chúng có khả năng truyền bệnh và có khả năng tiếp xúc thường xuyên với động vật nuôi.

Các loài cầm thú có khả năng mang trên thân của chúng những kí chủ truyền bệnh, như chuột mang bọ chét chứa vi khuẩn dịch hạch, chim trời mang mò mạt truyền bệnh đậu.

1.5.3. Người

Người cũng là một yếu tố truyền lây quan trọng trong các bệnh truyền lây của động vật, đặc biệt những người do nghề nghiệp mà phải tiếp xúc với gia súc hay sản phẩm gia súc, mầm bệnh dính vào tay, chân, quần áo, giày dép hoặc tạm thời đi qua đường tiêu hoá của người.

1.5.4. Đất, nước

Đất bị ô nhiễm mầm bệnh do các chất bài tiết của động vật mang bệnh, do chôn xác động vật bệnh, do các chất thải không xử lí của các nhà máy chế biến thú sản và các phòng thí nghiệm VSV. Các mầm bệnh có nha bào (uốn ván, nhiệt thán, độc thịt) có thể tồn tại khá lâu trong đất. Các loài vi khuẩn tồn tại lâu ở đất gây ra những bệnh truyền nhiễm, gọi là bệnh thổ nhưỡng.

Nước cũng bị nhiễm như đất và còn bị nhiễm do đất. Nước đọng, đục, có nhiều chất hữu cơ thì chứa nhiều VSV hơn và tồn tại trong một thời gian dài hơn, vì ánh sáng mặt trời khó đi qua và hơn nữa nước lại không bị pha loãng.

Từ đất và nước, mầm bệnh vào cơ thể một cách trực tiếp bằng đi qua các vết thương ở niêm mạc, ở da, hoặc một cách gián tiếp thông qua nước ăn, nước uống.

1.5.5. Không khí

Mầm bệnh có trong không khí là do dính vào bụi hoặc bọt nước nhỏ bay trong không khí. Không có những bụi và bọt đó thì không khí không thể có mầm bệnh trừ bào tử của nấm mốc. Không khí trong chuồng có bụi là do quét dọn khô, chải cọ, trở rơm cỏ, do không thoáng khí. Bọt nước có

Split Unregistered Version - http://www.simpopdf.com

trong không khí là do gia súc kêu, ho, hắt hơi bắn ra không khí. Bụi có thể tồn tại lâu trong không khí và được gió thổi đi xa, khi rơi xuống nó lại được gió đưa trở lại không khí. Nhưng chỉ một số ít mầm bệnh có thể tồn tại lâu trong bụi (lao, nhiệt thán, bào tử nấm mốc v.v...), vì vậy phương thức truyền bệnh bằng bụi tuy rất nguy hiểm nhưng chỉ giới hạn trong một số bệnh.

Phương thức truyền bệnh bằng bọt nước phổ biến hơn phương thức truyền bằng bụi. Tác hại của bụi và bọt nước phụ thuộc vào độ ẩm, nhiệt độ và chuyển động của không khí.

1.5.6. Đồ vật, dụng cụ

Mọi đồ vật dùng cho động vật bệnh hoặc tiếp xúc với con bệnh đều mang mầm bệnh và có thể truyền bệnh, đây là yếu tố truyền lây khá phổ biến.

1.5.7. Thức ăn, nước uống

Thức ăn, nước uống là loại yếu tố truyền lây phổ biến nhất, vì đa số bệnh truyền nhiễm của động vật nuôi lây bằng đường tiêu hoá, các chất bài tiết của con bệnh, đất, nước, dụng cụ đựng hoặc chế biến, các động vật khác và côn trùng đều có thể nhiễm mầm bệnh vào thức ăn, nước uống.

Bản thân thức ăn có thể bị hư hỏng và biến thành môi trường sinh sống cho những VSV gây bệnh cho động vật. Thức ăn, nước uống có thể chứa những độc tố của VSV phát triển trong đó.

1.5.8. Xác chết của vật nuôi

Mọi sản phẩm và chất bài tiết lấy từ động vật bệnh : thịt, sữa, trứng, da, lông, sừng, phân, nước tiểu đều có thể chứa mầm bệnh và truyền bệnh cho động vật khoẻ và cho người. Thú sản có thể truyền bệnh đi rất xa trong điều kiện giao thông hiện nay và phương thức buôn bán phát triển mới. Cùng với động vật mang trùng, thú sản là yếu tố truyền lây quan trọng nhất và làm bệnh lan rộng nhất.

Xác các con vật bị bệnh truyền nhiễm chết chứa nhiều mầm bệnh có khả năng gây bệnh, vì vậy mổ các xác chết để xử lí rất nguy hiểm, vì đã tạo điều kiện cho mầm bệnh được phát tán ra ngoài và bệnh có thể lan rộng thêm.

Trong ngành thú y có một điều đặc biệt nguy hiểm là : nhiều xác chết còn có thể sử dụng được cho người và cho động vật, nên những xác đó có thể được phân tán do mổ thịt và mầm bệnh mang đi khắp nơi, làm bệnh lan rộng, tạo thêm nhiều ổ dịch mới. Mầm bệnh càng có nhiều yếu tố truyền lây, càng khó tiêu diệt, nhất là yếu tố sinh vật.

1.6. Cơ chế và phương thức truyền lây

Bệnh được truyền từ cơ thể bệnh qua cơ thể khoẻ bằng các yếu tố truyền lây theo những quy luật nhất định, gọi đó là cơ chế truyền lây của Gramasevxki :

Split Unregistered Version - http://www.simpopdf.com

Nơi khu trú đầu tiên của mầm bệnh trong cơ thể, đó là nơi có đủ điều kiện cho mầm bệnh sinh sản, nhân lên và sau đó nó được bài xuất ra ngoài. Hai điều kiện nói trên của nơi khu trú đầu tiên rất cần thiết cho sự lưu tồn của mầm bệnh, căn cứ vào khái niệm đó, thì nơi khu trú đầu tiên của virus dại là tuyến nước bọt. Cần phân biệt với nơi khu trú thứ hai là nơi chỉ có ý nghĩa về bệnh học.

- Nơi khu trú đầu tiên quyết định con đường bài xuất và nơi lưu lại ngoại cảnh của mầm bệnh : nếu nơi khu trú đầu tiên là phổi thì bài xuất qua đường hô hấp và tồn tại ở trong không khí ; nếu mầm bệnh ở trong ruột thì bài xuất qua phân và lưu lại ở đất, nước, cây cỏ.

- Nơi lưu lại ngoài ngoại cảnh quyết định con đường xâm nhập vào cơ thể : mầm bệnh ở trong không khí thì phải qua đường hô hấp mà xâm nhập vào phổi - là nơi khu trú đầu tiên, để đảm bảo cho truyền lây lại tiếp tục được thực hiện.

Như vậy, từ khi bài xuất khỏi cơ thể cho đến lúc xâm nhập vào cơ thể, quá trình truyền lây là một dây chuyền liên tục của các hiện tượng được ràng buộc với nhau, dây chuyền đó đảm bảo cho mầm bệnh tồn tại và bệnh truyền nhiễm được lưu hành trong thiên nhiên. Căn cứ vào cơ chế truyền lây của Gramasevxki, thì có 4 phương thức truyền bệnh chính :

+ Lây theo đường hô hấp : Nơi khu trú đầu tiên là phổi ; đường truyền lây là không khí, mũi ; yếu tố truyền lây là bụi, bọt nước.

+ Lây theo đường tiêu hoá : Nơi khu trú đầu tiên là ruột ; đường truyền lây là phân, miệng ; yếu tố truyền lây chủ yếu đối với động vật là thức ăn, nước uống, ruồi, chuột.

+ Lây theo máu : Nơi khu trú đầu tiên là máu côn trùng, tiết túc, máu động vật ; yếu tố truyền lây là côn trùng, tiết túc hút máu.

+ Lây qua da và niêm mạc : có nhiều nơi khu trú đầu tiên, do đó có nhiều đường truyền lây và nhiều loại yếu tố truyền lây.

1.7. Các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình truyền lây

Ba khâu của quá trình truyền lây : nguồn bệnh hay mầm bệnh ; nhân tố truyền lây ; động vật thụ cảm, chịu ảnh hưởng của nhiều yếu tố. Đặc biệt các khâu thứ nhất và thứ ba là những khâu sinh vật, những khâu này có nhiều biến đổi dưới tác động của các yếu tố làm ảnh hưởng đến quá trình truyền lây, làm cho bộ mặt của dịch biến đổi qua các thời gian và không gian.

Bệnh truyền nhiễm có thể xảy ra lẻ tẻ hay thành dịch địa phương (dịch vùng) hay thành dịch lưu hành hoặc thành dịch đại lưu hành (đại

Split Unregistered Version - http://www.simpopdf.com
dịch), đặc tính đó thuộc về mỗi bệnh, thuộc về mối quan hệ giữa động vật và mầm bệnh, nhưng vẫn chịu tác động của các yếu tố khác. Có thể chia thành ba yếu tố sau :

1.7.1. Yếu tố tự nhiên

Các yếu tố tự nhiên bao gồm các yếu tố của địa lí, địa hình thổ nhưỡng, thời tiết, khí hậu, thảm thực vật, môi trường ngoại cảnh v.v..., các yếu tố này ảnh hưởng có lợi hoặc không có lợi tới một hoặc nhiều khâu của quá trình truyền lây.

1.7.2. Yếu tố xã hội

Bệnh truyền nhiễm của động vật nuôi xảy ra trong xã hội loài người, nên bệnh dịch của động vật nuôi cũng chịu sự chi phối quyết định của quy luật xã hội.

Mức sống, trình độ văn hoá, trình độ dân trí, trình độ phát triển của khoa học kĩ thuật, các hoạt động kinh tế, các phong tục tập quán, trình độ tổ chức xã hội, chiến tranh và hoà bình v.v... đều ảnh hưởng đến quá trình truyền lây dịch ở động vật nuôi, bao trùm lên trên các yếu tố, đó là chế độ xã hội.

Đối với nguồn bệnh và mầm bệnh, con người có thể tiêu diệt, hoặc ngược lại làm cho chúng phát triển thông qua việc nuôi dưỡng, quản lí, tiêu độc và các hoạt động khác.

Đối với nhân tố truyền lây và động vật cảm thụ, các hoạt động của con người đều có ảnh hưởng làm giảm hoặc tăng lên, ngăn cản hoặc khuyến khích sự lây lan.

1.7.3. Yếu tố thuộc về đàn gia súc

Các yếu tố thuộc về đàn gia súc còn gọi là yếu tố quần thể, các yếu tố này ảnh hưởng lớn đến sự lây lan qua các đặc điểm sau đây :

a) *Mật độ đàn gia súc*

Mật độ đàn càng lớn thì các cá thể càng gần nhau, càng tạo điều kiện thuận lợi cho sự lây lan, mật độ đàn cao sẽ kéo theo các ảnh hưởng có hại đến sức khoẻ của đàn gia súc như ô nhiễm không khí, thiếu oxi do diện tích sống bị thu hẹp, gia súc dễ bị kích động, dễ bị thương do chen chúc, dẫm đạp lên nhau ; mặt khác khi trong đàn có con bị bệnh thì lại dễ dàng truyền bệnh và lây lan nhanh.

b) *Đặc điểm sinh lí của đàn gia súc*

Đối với những giống gia súc có năng suất cao như các giống lai tạo hay giống ngoại, thì yêu cầu đáp ứng cho các giống này cũng đòi hỏi cao

Split Unregistered Version - http://www.simpopdf.com
hơn các giống nội về các mặt như chế độ dinh dưỡng phải đảm bảo cung cấp đủ lượng và chất, vấn đề nhiệt độ, độ ẩm, vệ sinh nuôi dưỡng cũng phải thích hợp (tắm, chải sạch sẽ, yên tĩnh, thoáng mát..) ; hoặc công tác phòng chống bệnh cũng phải chú ý hơn ; hoặc có những côn trùng, tiết túc như ve, mòng thường thích bám vào trâu bò ngoại hơn là trâu bò nội ; hoặc có những mầm bệnh như các kí sinh trùng đường máu thường gây bệnh nặng ở trâu bò ngoại hơn trâu bò nội.

1.8. Sức miễn dịch quần thể

Một động vật không có miễn dịch đặt vào trong một hoàn cảnh nhiễm khuẩn hay đặt vào trong một đàn không có miễn dịch thì rất dễ bị bệnh, vì xung quanh nó có nhiều nguồn bệnh, nhưng nếu đặt nó vào trong một đàn đã có miễn dịch thì nó khó mắc bệnh và có thể coi như nó có miễn dịch, bởi vì xung quanh nó có nhiều con đã có miễn dịch nên ngăn chặn được sự lây lan.

II – VI SINH VẬT ỨNG DỤNG TRONG CHĂN NUÔI

2.1. Công nghệ vi sinh trong sản xuất các chế phẩm sinh học phục vụ chăn nuôi

Trong tự nhiên tồn tại VSV với số lượng và chủng loại rất lớn, bao gồm nhóm VSV có lợi và nhóm VSV có hại. Ngày nay việc sử dụng nhóm VSV có lợi trong sản xuất chế phẩm sinh học và chế biến thức ăn đã trở nên phổ biến và rất đa dạng. Nhiều sản phẩm dùng cho đời sống con người nói chung và trong chăn nuôi động vật nói riêng đã được sản xuất ở quy mô công nghiệp, làm hình thành ngành công nghệ vi sinh.

2.1.1. Công nghệ sản xuất sinh khối tảo

Đã từ lâu tảo được dùng làm thức ăn cho người, năm 1967, công ti Sosa Texcoco (Pháp) đã trở thành cơ sở sản xuất công nghiệp tảo *Spirulina* đầu tiên trên thế giới và sau đó thì nhiều nước khác cũng đã tổ chức sản xuất loại tảo này.

Đặc điểm chung của tảo :

- Tốc độ sinh trưởng, phát triển của tảo rất nhanh, khó nhiễm tạp khuẩn, vì chúng thích hợp được với các điều kiện môi trường khá đặc biệt, nên có thể dễ sản xuất ở quy mô công nghiệp để thu nhận sinh khối. Trong điều kiện tối ưu của phòng thí nghiệm, tảo hoàn thành một vòng đời mất 1 ngày, còn ở điều kiện tự nhiên là 3-5 ngày.

- Nguồn dinh dưỡng chủ yếu cho tảo là CO_2 và các muối khoáng $(NH_4)_2SO_4$; $MgSO_4$; KNO_3 ; K_2HPO_4, tảo hấp thu CO_2, nhả O_2 làm cho môi trường trong sạch, thoáng khí.

Split Unregistered Version - http://www.simpopdf.com

- Do tảo có chứa chất diệp lục (*chlorophil*) nên có khả năng quang hợp như cây xanh :

$$CO_2 + 4H_2O \rightarrow CH_2O + 3H_2O + O_2$$

Sản phẩm quang hợp của tảo rất đa dạng, có thể là tinh bột, glucogen, leucosin, mannit, paramilon, chất dầu...

Hiệu suất sử dụng năng lượng mặt trời của tảo cao tới 3 - 4%, còn đậu tương và lúa chỉ đạt 0,25%. Hiệu suất sử dụng CO_2 đạt 30% (*Chlorella*), 80 - 85% (*Spirulina*), trong khi cây trồng nói chung chỉ đạt dưới 10%. Do vậy năng suất nuôi tảo cao hơn nhiều so với trồng trọt.

BẢNG 9.1. HÀM LƯỢNG PROTEIN TRONG MỘT SỐ NÔNG SẢN

Đối tượng nuôi trồng	Lượng sinh khối (kg/ha/năm)	Lượng protein (kg/ha/năm)
Ngô	3.600	400
Đậu tương	6.250	1.500
Tảo *Spirulina*	25.000	15.000

- Tảo có giá trị dinh dưỡng cao : trước hết là protein và các axit amin : hàm lượng protein là 40-55% (tảo *Chlorella*), 70% (tảo *Spirulina*) ; hàm lượng axit amin gần với quy định của protein tiêu chuẩn. Tổng các axit amin không thay thế có thể chiếm tới 42%, đặc biệt là lizin cao hơn nhiều so với lúa mạch. Giá trị về vitamin trong tảo cũng rất lớn, hàm lượng vitamin A ; B ; K và nhiều yếu tố sinh trưởng khác cao hơn nhiều so với các loại thức ăn khác.

Tảo *Spirulina* chứa hàm lượng vitamin B_{12} hơn hẳn tảo *Chlorella* và chứa nhiều xantophil là chất tạo lòng đỏ tươi cho trứng và màu vàng của thịt gà, ngoài ra một số tảo lam còn chứa hoạt chất có giá trị y học.

2.1.2. Phương pháp nuôi trồng tảo

Việc nuôi trồng tảo bằng phương pháp thủ công trong hồ ao đã được tiến hành ở Nhật Bản với nguyên liệu là phân, nước tiểu súc vật và muối khoáng.

Một số nước đã tiến hành nuôi tảo theo phương pháp công nghiệp, người ta dùng các bể nuôi hoặc ống chất dẻo trong suốt hình chữ U, có hệ thống thiết bị cơ giới để cung cấp CO_2, quấy đảo, bể nuôi thiết kế có năng lượng ánh sáng mặt trời kết hợp với đèn chiếu sáng nhân tạo, năng suất có thể đạt 11g tảo/m^2/ngày.

Split Unregistered Version - http://www.simpopdf.com

Quy trình sản xuất tảo :

Nuôi cấy → Thu hồi tảo → Làm lọc sơ bộ rồi lọc → Phá vỡ tế bào → Sấy khô → Nghiền → Đóng gói.

Tảo *Spirulina* đã được nuôi thử ở quy mô khá lớn từ nguồn nước khoáng ở Bình Thuận hoặc từ nguồn nước thải của nhà máy phân đạm Bắc Giang. Việc nuôi cấy tảo *Spirulina* từ nước thải của các bể khí sinh học có thể phát triển rộng ở các vùng nông thôn để vừa góp phần cải thiện điều kiện môi trường sống, vừa tạo ra nguồn thức ăn bổ sung cho chăn nuôi hoặc cho nghề nuôi trồng thuỷ sản.

Ở nước ta có thể xây dựng một số cơ sở sản xuất tảo bán công nghiệp ở gần các nhà máy sản xuất nhiều khí CO_2 (nhà máy rượu, bia) hay ở các nơi có nguồn nước khoáng giàu bicacbonat.

Những chủng tảo lam có hoạt tính cố định nitơ cao đã được sản xuất thành các chế phẩm dùng để lây nhiễm cho ruộng lúa, nhằm giảm bớt việc sử dụng phân đạm hoá học. Các thực nghiệm ở một số vùng nông thôn cho thấy, mỗi sào lúa có thể tiết kiệm được mỗi vụ từ 2-3kg urê.

2.1.3. Ứng dụng tảo trong dinh dưỡng vật nuôi

Tảo đã được dùng làm thức ăn cho người từ lâu ở nhiều nước trên thế giới, người ta đã chứng minh tảo có tác dụng rất tốt đối với các vận động viên thể thao và trẻ em.

Ở nước ta cũng đã thử nghiệm đưa tảo *Spirulina* vào khẩu phần ăn cho bộ đội (30g tảo khô/ ngày). Đã sử dụng rộng rãi tảo trong chăn nuôi gà và cho kết quả làm tăng màu lòng đỏ trứng và làm thịt vàng, gà sinh trưởng tốt và ít mắc bệnh.

Kết quả thí nghiệm tại trại gà Cầu Diễn với tỉ lệ 1% tảo bổ sung đã cho kết quả tốt và cũng đã sử dụng tảo để nuôi thuỷ sản, tăng được tỉ lệ nuôi sống của cá bột trong điều kiện nuôi với mật độ cá dày.

2.2. Công nghệ sản xuất sinh khối nấm men

2.2.1. Đặc điểm chung của nấm men

- Nấm men có tốc độ sinh trưởng, phát triển nhanh chóng, nên khả năng tổng hợp sinh khối cao hơn nhiều so với chăn nuôi và trồng trọt.

- Nấm men sử dụng nguồn dinh dưỡng là các chất phi thực phẩm, đó là dịch thuỷ phân, gỗ, mùn cưa, vỏ bào, là phế phụ phẩm ngành công nghiệp (bồng rượu, dịch kiềm sunfit, rỉ đường...) và phụ phẩm ngành nông nghiệp (rơm, rạ, lõi ngô, vỏ lạc...), ngoài ra còn có các thành phần muối khoáng.

Split Unregistered Version - http://www.simpopdf.com

Hiệu suất chuyển hoá trong sản xuất protein nấm men từ các nguyên liệu phế phụ phẩm rất cao :

+ 1 kg rỉ đường sản xuất được 0,25kg protein.

+ 1 tấn bỗng rượu sản xuất được 22,70kg protein.

+ 113-136 kg bã mía sản xuất được 18-25kg protein.

+ 1 kg n-parafin sản xuất được 0,55kg protein.

- Giá trị dinh dưỡng cao và không gây độc cho động vật, hàm lượng protein đạt khoảng 40-60%, đặc biệt là axit amin không thay thế được rất cao, gần giống với protein của động vật.

- Thành phần vitamin trong nấm men cũng rất cao và hoạt tính của nó cao hơn gấp 2-3 lần vitamin tổng hợp.

Nấm men không những có nhiều protein, vitamin mà còn chứa nhiều enzym, kích tố, những chất này có ảnh hưởng rất tốt đến quá trình trao đổi chất nhưng lại không gây độc cho cơ thể động vật.

2.2.2. Phương pháp nuôi cấy nấm men thu sinh khối

Hiện nay các chủng nấm men được dùng để sản xuất chủ yếu thuộc về 3 giống : *Saccharomyces, Candida và Torulopsis*, khả năng chuyển hoá của 3 giống này rất cao và đa dạng, quy trình công nghệ tương đối đơn giản.

a) *Sản xuất sinh khối nấm men từ hidrat cacbon thông thường*

- Rỉ đường : Hiện nay phần lớn sản lượng nấm men dùng cho người và gia súc trên thế giới được sản xuất từ rỉ đường mía và rỉ đường củ cải. Trong rỉ đường mía có đường saccarozơ (35-40%), đường khử 30% và các chất sinh trưởng (biotin, inozit, axit pantotenic..).

- Tinh bột : tinh bột dùng nuôi cấy men phải qua thuỷ phân thành đường nhờ axit hoặc enzym amilaza của VSV hay mầm thóc (mạch).

- *Xenlulo* (gỗ, vỏ bào, rơm rạ, lõi ngô, bã mía..) : Muốn sử dụng được nguồn nguyên liệu này cũng phải qua thuỷ phân bằng axit hoặc enzym.

- Dịch kiềm sunfit (nước thải nhà máy giấy) : thành phần chủ yếu là đường pentozơ mà chỉ có nấm men sử dụng tốt.

- Bã rượu : theo tính toán thì $1m^3$ nước bã rượu dùng để nuôi nấm men có thể thu được 10-15kg nấm men khô. Nếu sử dụng hết bã rượu của nhà máy rượu Hà Nội thì mỗi năm có thể thu được 150 tấn sinh khối nấm men khô, chứa 65-70 tấn protein.

b) *Sản xuất protein nấm men từ dầu mỏ và khí đốt*

Trong khoảng 30 năm gần đây, sản phẩm dầu mỏ là nguyên liệu được dùng để nuôi cấy nấm men thu protein. Hiện nay nhiều công trình nghiên

Split Unregistered Version - http://www.simpopdf.com
cứu sản xuất protein từ dầu mỏ và khí đốt đang được xúc tiến và triển khai mạnh ở nhiều nước với công suất nhà máy lên tới 100.000-150.000 tấn/năm, đây có thể là hướng giải quyết sự thiếu hụt protein trong tương lai.

- Người ta ước tính trữ lượng dầu thế giới khoảng 750-800 tỉ tấn, khí đốt khoảng 53.000 tỉ mét khối. Hiện nay hàng năm khai thác khoảng 4,5-5 tỉ tấn dầu có chứa 0,9-1 tỉ tấn n-parafin (hàm lượng n-parafin trong dầu mỏ là 20%). Như vậy nếu chỉ dùng 10% lượng n-parafin hay 45 tỉ mét khối khí đốt để nuôi men thì có thể thoả mãn nhu cầu về protein của thế giới.

- Sản xuất protein nấm men từ n-parafin có mạch C trên 9 (công nghiệp hoá dầu chỉ sử dụng hợp chất có mạch C 1-8), do đó tận dụng được nguồn phế thải, giá thành hạ.

- Hiệu suất chuyển hoá cao : 1 kg n-parafin cho 0,55kg protein nấm men.

- Thiết bị đầu tư không lớn như sử dụng các nguyên liệu khác (gỗ, rỉ đường, tinh bột..).

- Nghiên cứu giống nấm men dễ hơn, những phải chọn được chủng nấm men có sinh trưởng tốt ở nhiệt độ 40°C (nhiệt độ cần để làm tăng độ hoà tan parafin).

2.2.3. Ứng dụng protein nấm men trong chăn nuôi

Nấm men được sử dụng cho chăn nuôi gia súc, gia cầm dưới dạng bột sinh khối men khô, bổ sung vào khẩu phần thức ăn.

Các sản phẩm của nấm men được sản xuất ở nhiều nước có hàm lượng protein cao, không độc đã cho kết quả nuôi dưỡng rất tốt đối với động vật nuôi. Một hiệu quả có ý nghĩa quan trọng nữa là nguồn protein từ nấm men đã góp phần giải quyết sự thiếu hụt thức ăn đạm có giá trị dinh dưỡng cao trong chăn nuôi.

2.3. Công nghệ sản xuất sinh khối vi khuẩn

Sinh khối vi khuẩn có các tác dụng sau :

- Thành phần giá trị dinh dưỡng cao : hàm lượng protein trong tế bào vi khuẩn rất cao : 60-70%, có loại lên đến 87%, hàm lượng các axit amin trong protein vi khuẩn cân đối hơn nấm men.

- Có thể sản xuất sinh khối vi khuẩn từ xenlulo (rơm rạ, bã mía, mùn cưa, dăm bào...), Srinivan và Han (1969) đã phân lập được 2 loài có khả năng cộng sinh là *Cellulomonas* (*Xenlulomonas)* và *Alcaligenes* trong môi trường có xenlulo, sự kết hợp 2 loại này sẽ phát triển nhanh hơn so với nuôi cấy riêng rẽ.

Split Unregistered Version - http://www.simpopdf.com

Các nhà khoa học Mỹ đã phân lập từ bã mía một loại vi khuẩn phân giải chất xơ mạnh và đã sử dụng để sản xuất protein từ bã mía, lõi ngô, rơm rạ không qua khâu thuỷ phân bằng H_2SO_4, hiệu suất chuyển hoá cao, 113-136kg bã mía cho 18-23kg protein.

2.4. Công nghệ sản xuất enzym

Trước đây con người đã tiến hành sản xuất chế phẩm enzym từ động, thực vật với khối lượng khá lớn (hàng vạn tấn/năm) nhưng không kinh tế và chưa đáp ứng được nhu cầu tiêu dùng, do lượng enzym trong cơ thể động, thực vật rất hạn chế. VSV trái lại có thể tổng hợp được một lượng lớn các enzym khác nhau. Do vậy VSV là đối tượng chính được sử dụng để sản xuất enzym trong vòng 30 năm trở lại đây, vì có các đặc điểm :

- Do tốc độ sinh trưởng nhanh, nên VSV cũng có tốc độ tổng hợp enzym nhanh, do đó cho phép thu được khối lượng sản phẩm lớn trong một thời gian ngắn.

- Enzym VSV có hoạt tính rất cao, đáp ứng được khả năng phân giải, tổng hợp nhanh các chất cần cho sinh trưởng của tế bào VSV.

- Số lượng, tính đa dạng và hoạt tính enzym có ở VSV mà thực vật không thể nào so sánh được. Vì vậy mà VSV có thể sử dụng được rất nhiều dạng dinh dưỡng khó đồng hoá và rẻ tiền để nuôi cấy sản xuất.

- Quy trình công nghệ sản xuất enzym dễ thực hiện, hiệu suất thu hồi cao, do enzym dễ hoà tan trong môi trường và tỉ lệ enzym sinh ra là khá lớn so với kích thước và khối lượng tế bào.

2.4.1. Một số enzym vi sinh vật chủ yếu

Trong số rất nhiều enzym thì các enzym ngoại bào amilaza, proteinaza và xitolaza được sử dụng nhiều trong chăn nuôi.

a) *Enzym amilaza*

Enzym này bao gồm nhiều nhóm men khác nhau, đó là amilaza, glucoamilaza, glucozidaza, dextrinaza v.v...

- Amilaza : thuỷ phân tinh bột và các polisaccarit để thành dextrin có phân tử lượng thấp và mantozơ. Amilaza do nhiều loại nấm mốc và một số loại vi khuẩn sinh ra.

- Glucoamilaza : enzym này có tác dụng thuỷ phân tinh bột thành dextrin có phân tử lượng thấp, sau đó tạo thành glucozơ mà không cần có một enzym nào khác tham gia, enzym này do nhiều loại nấm mốc và vi khuẩn sinh ra.

- Glucozidaza (mataza) : có tác dụng thuỷ phân mantozơ thành glucozơ.

- Dextrinaza : thuỷ phân liên kết 1-6 glucozit trong isomantozơ và dextrin thành những đường có thể lên men được.

Split Unregistered Version - http://www.simpopdf.com

b) *Enzym proteinaza*

Proteinaza là nhóm enzym thuỷ phân các liên kết peptit (-CO-NH-) trong phân tử protein hoặc polipeptit để cho ra các axit amin ; proteinaza do nhiều loại VSV sinh ra.

c) *Enzym xitolaza*

Xitolaza là tên gọi chung của hệ enzym gồm xenlulaza, hemixenlulaza, pentozanaza ; enzym này có nhiều trong tế bào VSV, song việc chọn giống có hoạt tính cao và tách enzym ra ở trạng thái tinh khiết còn gặp khó khăn nên chưa mở rộng sản xuất ở quy mô công nghiệp được.

2.4.2. Phương pháp nuôi cấy VSV để thu enzym

Các biện pháp làm tăng khả năng sinh enzym có hoạt tính cao :

- Phân lập, chọn lọc trong tự nhiên : Từ các mẫu vật có khả năng chứa các VSV có hoạt tính sinh enzym cao như các mẫu hạt ngũ cốc, các loại củ quả chứa tinh bột bị phân huỷ, các mẫu đất để chọn ra những chủng có năng lực sản xuất enzym cao.

- Phương pháp gây đột biến : Để nâng cao hoạt tính enzym, người ta tiến hành gây đột biến bằng tác nhân vật lí, hoá học đối với các chủng phân lập chọn lọc được.

- Phương pháp cấy chuyển gen : thực hiện việc tách và cấy chuyển đoạn ADN có gen mã hoá sinh tổng hợp một enzym nào đó từ tế bào cho sang tế bào nhận, để thực hiện quá trình nuôi cấy thu enzym dễ dàng thuận lợi hơn.

- Muốn thu được lượng enzym lớn có hoạt tính cao, cần phải có môi trường thích hợp. Để nuôi cấy giống sinh amilaza, môi trường cần có chất cảm ứng là tinh bột hoặc dextrin với nồng độ 0,7-6% tuỳ theo từng loại VSV và có sự phối hợp với thành phần có chứa N là $NaNO_3$, hoặc NH_4NO_3 có bổ sung thêm các nguyên tố vi lượng như S ; Mn ; Mg ; K ; P v.v...

- Để nuôi cấy giống sinh proteinaza, môi trường cần có chất cảm ứng là pepton, gluten, bột đậu tương, bột mì, cám mì hoặc mầm mạch, có thể phối hợp thêm N vô cơ như $(NH_4)_2HPO_4$ sẽ tốt hơn. Nguồn cacbon là các đường mono-disaccarit (glucozơ, fructozơ, saccarozơ) và tinh bột (0,5-2%) nếu nuôi cấy vi khuẩn và xạ khuẩn.

- Nuôi cấy giống sinh xenlulaza sẽ cần chất cảm ứng là xenlulo (giấy lọc, bã củ cải hay lõi ngô.. .) hoặc có thể là tinh bột 1%. Nguồn N chủ yếu là N vô cơ (muối nitrat) có bổ sung thêm N hữu cơ và yếu tố sinh trưởng (cao nấm men, cao ngô.. .)

Hiện nay trên thế giới sử dụng 2 phương pháp là nuôi cấy bề mặt và nuôi cấy chìm để sản xuất enzym.

Split Unregistered Version - http://www.simpopdf.com

a) *Phương pháp nuôi cấy bề mặt* là phương pháp nuôi cấy mà VSV sẽ mọc trên bề mặt của môi trường.

- Môi trường thường dùng là các nguyên liệu tự nhiên như cám mì, cám gạo, ngô mảnh, đậu tương, trong đó chủ yếu dùng cám, vì cám có đủ các chất dinh dưỡng và cấu trúc xốp ẩm, thích hợp cho sự phát triển của VSV. Trên môi trường cám phải tuỳ theo đối tượng VSV và mục đích nuôi cấy khác nhau mà bổ sung thêm các chất cảm ứng và một số thành phần khác cho thích hợp.

Môi trường phải đạt độ ẩm 48-60%, điều chỉnh độ pH thích hợp, môi trường phải khử trùng ở 1 - 1,5atm trong 45 - 60 phút. Sau khi cấy giống, đặt khay vào phòng nuôi, điều chỉnh nhiệt độ, độ ẩm môi trường và lượng không khí thích hợp, thời gian nuôi cấy khoảng 36-60 giờ tuỳ thuộc vào chủng giống.

Căn cứ vào quá trình phát triển của nấm mốc có thể phân thành 3 thời kì :

+ Thời kì đầu : 10-14 giờ đầu bào tử nảy mầm, giống dễ nhạy cảm với nhiệt độ, nhưng cần ít không khí.

+ Thời kì giữa : kéo dài 14-18 giờ, mốc phát triển nhanh, hô hấp mạnh, lúc đầu mốc mọc thành lớp lông tơ trắng xám, sau đó có sự kết tinh bánh, thời kì này có sự toả nhiệt và thải CO_2 mạnh, nên phải thông gió để giảm nhiệt và thải CO_2.

+ Thời kì cuối : kéo dài 10-20 giờ, quá trình trao đổi chất giảm nên cần giữ nhiệt độ và thông gió vừa phải để mốc sinh enzym tốt. Sau khi kết thúc sấy khô, để độ ẩm còn dưới 12%, thu được chế phẩm enzym thô, có thể sử dụng hoặc chiết tách lấy enzym thuần khiết.

- Ưu điểm của phương pháp nuôi cấy bề mặt :

+ Nồng độ và hoạt tính enzym cao.

+ Chế phẩm dễ sấy khô, ít bị giảm hoạt tính, dễ vận chuyển và sử dụng.

+ Không cần thiết bị phức tạp, tiêu thụ năng lượng ít nên thích hợp với nhiều vùng sản xuất.

- Nhược điểm :

Cần mặt bằng lớn và chi phí lao động cao, cơ giới hoá trong sản xuất khó, tuy rằng hiện nay người ta đã nghiên cứu cơ giới hoá việc nuôi cấy phương pháp bề mặt bằng việc nuôi cấy trong các thùng quay có thổi khí mạnh v.v... nhưng việc nuôi trên khay vẫn được áp dụng phổ biến do đơn giản và thuận lợi.

c) *Phương pháp nuôi cấy chìm*

Phương pháp nuôi cấy : Tiến hành nhân giống từ ống nghiệm qua bình tam giác có lắc đảo, nhân tiếp từ bình sang thùng có thể tích

Split Unregistered Version - http://www.simpopdf.com
bằng 5-10% thể tích thùng lên men chính, để 24-36 giờ, sau đó cấy chuyển sang thùng lên men chính với tỉ lệ cấy giống 2-5%.

Quá trình nuôi cấy phải thổi khí và cấy liên tục, thời gian kéo dài 2-4 ngày, trong quá trình nuôi cấy, phải dùng NaOH và H_2SO_4 để điều chỉnh độ pH.

2.4.3. Phương pháp tách và làm sạch chế phẩm enzym

a) *Tách từ môi trường rắn (nuôi cấy bề mặt)*

- Để chiết tách có thể sử dụng phương pháp : khuếch tán bằng nước hay dung dịch NaCl 1%, ngâm môi trường trong dung dịch (lượng dung dịch cao gấp 3 lần) khoảng 30 phút, sau đó lọc. Phương pháp này có thể chiết được 90-95% enzym. Dịch thu được có màu nâu sẫm chứa 10-15% chất khô, sau đó bổ sung 0,1% natri benzoat và làm lạnh ngay xuống 10-12^{0}C để bảo quản. Dịch chiết có thể cô đặc tới 50-55% chất khô hoà tan, sau đó đưa vào máy phun sấy sẽ thu được chế phẩm dạng bột.

- Để kết tủa có thể dùng phương pháp sau :

+ Phương pháp kết tủa enzym bằng dung môi hữu cơ (rượu, axeton...) : các protein có thể tan trong các dung môi hữu cơ và kết tủa do các dung môi làm giảm hằng số điện tích của môi trường nên làm tăng lực hút tĩnh điện, làm cho các protein có phân tử lượng thấp tương tác với nhau, tạo thành một kết tủa lắng xuống.

Phương pháp kết tủa bằng muối trung tính : dùng $(NH_4)_2SO_4$, vì tan tốt trong nước và không ảnh hưởng tới hoạt tính enzym, khi nồng độ muối tăng lên, protein sẽ đạt tới mức hoà tan tối đa sau đó tách khỏi dung dịch. Sử dụng các nồng độ khác nhau để kết tủa, ở nồng độ 50% của bão hoà tách được amilaza, ở nồng độ 70% tách được proteinaza.

b) *Tách từ dịch nuôi cấy chìm*

Lọc dịch nuôi cấy sẽ thu được dung dịch chứa 1-3% chất khô, dịch lọc cần cô để giảm thể tích 4-10 lần trong chân không ở 25-30°C, rồi sau đó chiết tách enzym như các phương pháp trên.

Dịch enzym thô qua cô có thể phun sấy thành bột song còn chứa tạp chất, nhưng nếu qua kết tủa mới phun sấy sẽ thu được enzym tinh khiết.

2.4.4. Ứng dụng enzym trong chăn nuôi

- Tuy đã biết hơn 1000 loại enzym khác nhau nhưng cũng chỉ các enzym thuỷ phân mới được sử dụng rộng rãi trong hơn 30 ngành kinh tế khác nhau, đó là các enzym amilaza và enzym proteaza. Lượng các enzym sản xuất hàng năm : proteinaza từ vi khuẩn là 500 tấn/năm, proteinaza từ nấm mốc là 10 tấn/năm, amilaza là 300 tấn/năm, pectinaza là 10 tấn/năm.

Split Unregistered Version - http://www.simpopdf.com

- Sử dụng trong nông nghiệp : Enzym có ứng dụng nhiều trong nông nghiệp, đặc biệt là trong chăn nuôi, với mục đích là làm tăng giá trị dinh dưỡng, tăng hệ số tiêu hoá thức ăn, giảm chi phí thức ăn... Enzym được dùng ngày càng nhiều ở các nước trên thế giới.

- Các chế phẩm enzym có thể được chế ở 2 dạng :

+ Dạng thô : môi trường nuôi cấy VSV cho enzym.

+ Dạng tinh : dịch chiết từ môi trường nuôi cấy VSV cho enzym.

Trong các chế phẩm này thường là phức hợp của các enzym amilaza, proteinaza, pectinaza, xenlulaza.

2.5. Công nghệ sản xuất axit amin

Khoảng vài chục năm gần đây, người ta rất chú ý đến việc sản xuất các axit amin, những chất này có ý nghĩa rất lớn trong đời sống của người, động vật cũng như nhiều lĩnh vực kinh tế khác. Bởi vậy axit amin không chỉ trực tiếp tham gia vào việc tạo nên protein, enzym và các polipeptit của động vật mà còn thực hiện hàng loạt chức năng quan trọng trong quá trình tổng hợp các vitamin, các chất kích thích sinh trưởng, các hoocmon, các chất kháng sinh.

2.5.1. Sản xuất axit amin bằng vi sinh vật

Hiện nay axit amin đã được sử dụng nhiều trong chăn nuôi nhằm làm cân đối về dinh dưỡng trong khẩu phần thức ăn như lizin, methionin, leuxin, izolexin, valin... Trong thực tế chỉ có các axit amin dạng L mới có ý nghĩa. Để sản xuất axit amin, người ta đã dùng các phương pháp sau :

- Thuỷ phân các nguyên liệu tự nhiên có chứa protein bằng axit, kiềm hoặc enzym. Ngày nay, phương pháp này vẫn còn được sử dụng nhưng không thể thoả mãn yêu cầu của thực tế, vì nó đòi hỏi chi phí về trang thiết bị, về nguyên liệu khá lớn, không đem lại hiệu quả kinh tế cao.

- Sử dụng phương pháp hoá học cũng được dùng nhiều trong sản xuất, nhưng nhược điểm lớn của phương pháp này là chỉ cho những axit amin dạng raxemic, tức là hỗn hợp của 2 dạng D và L, việc tách riêng axit amin dạng L ra sẽ rất tốn kém.

- Phương pháp hoá học kết hợp với sinh tổng hợp được dùng khá rộng rãi để sản xuất một số các axit amin, vì bằng phương pháp hoá học có thể thu được dễ dàng các hợp chất dạng L và các tiền chất khác của axit amin, sau đó dùng VSV nhất định để chuyển thành axit amin.

- Phương pháp dùng VSV lên men trực tiếp nguyên liệu để sản xuất axit amin có ưu việt hơn, vì :

+ Đây là một phương pháp thu được hầu hết axit amin dạng L.

Split Unregistered Version - http://www.simpopdf.com

+ Ít tốn kém về đầu tư trang thiết bị.

+ Nguyên vật liệu dùng trong sản xuất rẻ tiền, nên hạ được giá thành.

Phương pháp này dựa vào khả năng thải vào môi trường nuôi cấy những sản phẩm trao đổi chất của VSV, trong trường hợp này là axit amin. Kết quả nghiên cứu đã chứng minh VSV có khả năng tích luỹ axit amin trong môi trường dinh dưỡng, đã là cơ sở cho những phương pháp sản xuất axit amin bằng VSV sau này.

2.5.2. Cơ chế điều chỉnh sinh tổng hợp axit amin

- Rất hiếm khi tìm thấy trong thiên nhiên những VSV đột biến có hoạt lực cao trong sinh tổng hợp các axit amin, do vậy phải có sự tác động của con người để gây đột biến như dùng ethilenimin, diethilsunfat ; các đồng vị phóng xạ như Co^{60}, hidro nặng, tia rơnghen, tia tử ngoại v.v...

- Sở dĩ một số VSV đột biến có khả năng tích luỹ lượng lớn axit amin nào đó, là do :

Quá trình "ức chế ngược" tức là hệ kiểm tra quá trình tổng hợp axit amin nào đó bị hư hại, làm cho axit amin này tổng hợp một cách vô tổ chức, quá nhiều so với nhu cầu nội bào của tế bào.

Bình thường một tế bào không bao giờ tích tụ thừa các chất trao đổi, chúng chỉ tổng hợp các chất với số lượng vừa đủ. Kết quả này là do VSV có cơ chế điều chỉnh sự tạo thành các chất trao đổi và tính hợp lí hoá trong trao đổi chất của mọi cơ thể sống bình thường. Trong trường hợp nào đó, cơ chế điều chỉnh của tế bào có thể bị sai lệch hoặc bị phá huỷ, sẽ dẫn đến sự tích tụ nhiều một loại axit amin. Vậy có thể điều chỉnh được quá trình sinh tổng hợp này để thu sản phẩm nhiều hơn, nếu biết được nguyên nhân của sự tích tụ thừa axit amin riêng lẻ trong dịch nuôi. Sau này người ta đã xác định được là, đa số VSV chỉ tích tụ axit amin riêng lẻ trong dịch lên men khi môi trường không đủ dinh dưỡng. Lợi dụng tính chất này khi nuôi cấy, người ta làm cho môi trường thiếu chất dinh dưỡng để thu được nhiều enzym.

2.5.3. Sản xuất công nghiệp axit amin

- Để có được một giống VSV có khả năng sinh tổng hợp một loại axit amin cao, phải tiến hành các bước chọn lọc rất công phu, tỉ mỉ. Song để có được một giống cho hiệu quả sản xuất cao thì cần nghiên cứu gây đột biến và cải tiến môi trường để có được chủng có giá trị công nghiệp cao và hiệu suất sản sinh axit amin lớn.

- Một vấn đề có ý nghĩa lớn trong các bước nghiên cứu là : dựa vào đặc điểm của chủng VSV được chọn, đặc điểm của môi trường nuôi cấy

Split Unregistered Version - http://www.simpopdf.com
mà tìm ra những nguyên liệu thay thế có khả năng sử dụng trong công nghiệp sản xuất vừa dễ kiếm lại rẻ tiền, như nguồn hidrat cacbon thường được dùng là rỉ đường, dịch thuỷ phân gỗ hay tinh bột, sản phẩm dầu mỏ (parafin, khí đốt), nguồn các chất sinh trưởng có thể là cao ngô, nước chiết hay dịch thuỷ phân, nguyên liệu động, thực vật.

2.5.4. Ứng dụng axit amin trong chăn nuôi

Axit amin được dùng trong chăn nuôi chủ yếu là ở dạng bổ sung vào khẩu phần thức ăn nhằm làm hoàn thiện hơn về dinh dưỡng. Trong số các axit amin thì lizin và methionin được sử dụng nhiều nhất.

Đối với gia súc, gia cầm càng cần có sự bổ sung lizin do nhu cầu về lizin của chúng rất cao (4,2-5,5% so với protein trong khẩu phần), mà thức ăn thực vật lại rất nghèo lizin.

Ở nước ta đã tiến hành nuôi cấy chủng vi khuẩn "VTP 202" (Viện Công nghiệp thực phẩm) trên môi trường có dịch tự phân nấm men của nhà máy bia Hà Nội và đường saccarozơ đã thu 40g lizin trong 1 lít dịch lên men. Chủng "VTP 202" cũng được nuôi cấy trên môi trường rỉ đường mía, dịch nấm men tự phân, muối amôn đã thu được chế phẩm ở dạng sệt màu nâu đen, hàm lượng lizin 15-20%, độ ẩm 35-45%, N toàn phần 3,5-4,5%, protein 22-28%, hidrat cacbon 1-2%, ngoài ra còn có vitamin B_1, biotin và khoảng 10 axit amin khác.

Thực nghiệm cho thấy rằng, chế phẩm lizin thô dùng cho chăn nuôi cho hiệu quả cao hơn lizin tinh khiết bởi vì ngoài lizin, chế phẩm còn có một lượng sinh khối chứa 20-25% protein và nhiều vitamin quan trọng khác. Trong 1kg chế phẩm thô Merka chứa 5mg vitamin B_1, 130 mg B_2, 65mg PP, và còn có các sản phẩm trao đổi khác nữa.

2.6. Công nghệ sản xuất vitamin

Vitamin là yếu tố dinh dưỡng không thể thay thế được, song vitamin không phải là nguồn năng lượng hay nguồn nguyên liệu xây dựng tế bào, nhưng nó là chất có hoạt tính sinh học cao, có tác dụng mạnh đối với quá trình trao đổi chất.

Hiện nay người ta đã biết trên 30 loại vitamin khác nhau, nhiều loại là thành phần coenzym trong các phản ứng sinh hoá, trong thành phần của khoảng 300 enzym trong số 1000 loại enzym đã biết có chứa vitamin.

2.6.1. Phương pháp chung để sản xuất vitamin

- Chiết rút từ nguyên liệu động, thực vật và các nguyên liệu khác như vitamin A có nhiều trong gấc, cà rốt, gan cá. Vitamin C có nhiều trong chanh, cam v.v...

Split Unregistered Version - http://www.simpopdf.com

- Tổng hợp hoá học.

- Tổng hợp nhờ VSV.

Các vitamin được sản xuất theo phương pháp sinh tổng hợp nhờ VSV gồm có vitamin B_{12} ; B_2 ; phức hợp B - D_2. Vitamin C được sản xuất theo phương pháp hỗn hợp hoá học - VSV.

Cơ sở của việc sử dụng VSV để sản xuất vitamin là : một số VSV khi sinh trưởng trên môi trường tự nhiên hoặc môi trường tổng hợp cũng sẽ làm tích luỹ một số vitamin trong tế bào hoặc tiết vào môi trường xung quanh.

2.6.2. Phương pháp sản xuất vitamin

- Vitamin B_2 : Với chủng *Bacillus subtilis* đã được tái tổ hợp gen, người ta có thể sản xuất ra Rhiboflavin (B_2) với sản lượng 4.500mg/lít mà chỉ cần có 24 giờ lên men.

- Vitamin C : trước kia thường được tách ra từ hoa quả, từ năm 1934, người ta phát hiện ra con đường tổng hợp hoá học kết hợp với oxi hoá nhờ VSV.

- Tiền vitamin A : không còn lấy từ cà rốt như trước mà đã có thể sinh tổng hợp ở quy mô công nghiệp nhờ tảo *Dunaliella* hoặc nhờ các nấm sợi như *Neurospora crassa*, hoặc các loài nấm men thuộc chi *Rhocotorula*. Đặc biệt khi lên men với nấm *Blakeslea trispora*, người ta có thể thu được tới 2.500 - 3.000mg caroten/lít dịch lên men.

- Vitamin B_{12} :

Hiện nay vitamin B_{12} chủ yếu được sản xuất bằng phương pháp công nghệ VSV, nhiều VSV có khả năng sinh vitamin B_{12} như các loại xạ khuẩn *Act. Obivaceus, Act. Griceus* ; vi khuẩn : *Bac. megatherium, Lactobacillus casei, Clostridium tetanomirphicum*... và các vi khuẩn sinh mêtan, các tảo đơn bào.

Hiệu suất sinh tổng hợp vitamin B_{12} tuỳ thuộc vào giống VSV và thành phần môi trường nuôi cấy. VSV có thể tổng hợp được khoảng 30 dạng vitamin B_{12} trong đó 2 dạng có hoạt tính đối với người và động vật là 5, 6-dimethildazol và 5-oxi benzylmidazol cobamit.

Sinh tổng hợp vitamin B_{12} bằng vi khuẩn lên men mêtan :

+ Những vi khuẩn mêtan có thể gặp ở tất cả mọi nơi trong thiên nhiên, đặc biệt ở các nơi rác bẩn, ao tù, cống rãnh, nước thải của nhà máy và thành phố... có nhiều hợp chất hữu cơ và trong dạ cỏ của gia súc nhai lại. Ở những nơi này có các nhóm vi khuẩn lên men sinh CH_4 như nhóm

Split Unregistered Version - http://www.simpopdf.com
vi khuẩn phân giải xơ, vi khuẩn amôn hoá, vi khuẩn khử nitrat và các vi khuẩn tạo thành CH_4 từ axit hoặc CO_2 .v.v... đã gây ra các quá trình phân giải các chất hữu cơ tạo thành khí CH_4 và có tích luỹ vitamin B_{12}.

+ Nhiều công trình nghiên cứu đã xác định được vitamin B_{12} có trong bùn, trong nước thải thành phố, có hàm lượng từ 4-10mg/kg chất khô (tuỳ theo mùa và điều kiện lên men) và tìm thấy vitamin B_{12}, trong nước thải của các nhà máy rượu, giấy (có chất thải là bã rượu, bã axeton-butanol) với 19 dạng đồng chất của vitamin.

+ Quá trình lên men các bã thải như bã rượu, bã axeton-butanol để sản xuất vitamin B_{12} công nghiệp đã được nghiên cứu :

* Môi trường lên men gồm dịch lọc bã rượu hay bã axeton-butanol có thêm rỉ đường, muối coban, diamôn photphat và metanol, lên men trong thùng ở nhiệt độ 52-55^{0}C trong thời gian khoảng 3 tuần, sau đó thu được dịch lên men có chứa vitamin B_{12}.

* Dịch lên men được tiến hành tách sinh khối, cô trong nồi chân không rồi cho qua phun sấy sẽ được sản phẩm màu nâu, vị chua, hàm lượng protein tối thiểu 25% và vitamin B_{12} khoảng 25mg/kg, cùng với các vitamin nhóm B khác để dùng cho chăn nuôi.

2.6.3. Sử dụng vitamin trong chăn nuôi

Vitamin B_{12} được dùng để bổ sung vào thức ăn gia súc trong chăn nuôi, nhằm nâng cao hệ số tiêu hoá của thức ăn, đặc biệt là giúp cho gia súc nâng cao được khả năng đồng hoá các nguồn protein thực vật, giảm lượng protein động vật, làm cho tăng trọng nhanh, tăng sản phẩm chăn nuôi.

Một phương pháp sinh học sản xuất vitamin tổng hợp có khả năng thực thi ở nhiều nước có trình độ kinh tế kĩ thuật khác nhau, đó là phương pháp nuôi vi tảo thu sinh khối. Sinh khối vi tảo có hàm lượng khá cao, có thể thoả mãn nhu cầu của động vật nuôi khi bổ sung sinh khối tảo với tỉ lệ nhất định.

2.7. Công nghệ sản xuất dextran

Hiện nay trong chăn nuôi lợn nái đang sử dụng phổ biến chế phẩm dextran-Fe, chế phẩm này được tạo thành do thành phần dextran được gắn gốc sắt (Fe) hoá trị 2.

2.7.1. Phương pháp sản xuất

a) *Phương pháp VSV* : Sử dụng giống *Leuconostoc mensenteroides*.

- Nguyên liệu chủ yếu để sản xuất dextran là saccarozơ ở dạng mật đường hay dạng tinh khiết. Hàng loạt công trình nghiên cứu dùng nguyên

Split Unregistered Version - http://www.simpopdf.com

liệu là các dịch ép củ quả như củ cải đường, nước mía... Để có được dextran dùng trong y học, người ta phải tìm cách nuôi cấy để thu được dextran có phân tử lượng thấp, như vậy sẽ bớt được khâu thuỷ phân các dextran có phân tử lượng cao. Phân tử lượng của dextran thu được trong nuôi cấy VSV phụ thuộc vào 4 yếu tố :

+ Chủng loại VSV:

+ Nồng độ ban đầu của đường.

+ Thể thu (acceptor) glucozơ.

+ Nhiệt độ lúc tổng hợp dextran.

Khi không có thể thu glucozơ, nồng độ đường saccarozơ chứa trong dung dịch : nếu là 10% thì dextran sinh ra có phân tử lượng thấp hơn 1.000.000 ; nhưng nếu nồng độ saccarozơ tăng lên đến 70% thì sẽ tạo nên dextran có khối lượng phân tử thấp hơn rõ rệt.

- Điều kiện lên men : nhiệt độ và thời gian nuôi cấy tuỳ thuộc vào mỗi chủng vi khuẩn khác nhau, thường từ 20-30^{0}C trong 1-7 ngày. Độ pH thích hợp cho sinh trưởng, phát triển của vi khuẩn sản xuất là 6,5-8,0, độ pH thích hợp nhất cho sinh tổng hợp là 7.

- Kết tủa dextran : Sau khi nuôi cấy, để thu được dextran, cần phải tiến hành li tâm tách tế bào và các chất không tan, sau đó dùng cồn metanol để kết tủa dextran (1-5 lần thể tích metanol so với dịch lên men).

b) *Phương pháp enzym trong tổng hợp dextran*

Đây là phương pháp tách enzym ngoại bào dextransaccaraza từ VSV, sau đó dùng enzym này để xúc tác các phản ứng polime hoá đường saccarozơ invitro thu dextran.

- Nuôi cấy VSV thu enzym : Enzym ngoại bào thu được từ sự nuôi cấy chủng vi khuẩn *Leuconostoc mensenteroides*. Trong quá trình nuôi cấy, độ pH môi trường giảm dần đến 6, 7, cần bổ sung kiềm để giữ pH ổn định, sau 8 đến 12 giờ, lượng enzym tích luỹ đạt mức tối đa, sẽ kết thúc lên men.

- Dịch lên men được lọc kĩ, li tâm để loại tạp chất và xác tế bào, sau đó điều chỉnh dịch lọc ở pH từ 5-5,2, bảo quản dịch ở 15°C.

- Quá trình enzym-polime hoá thu dextran : sau khi có chế phẩm enzym sẽ tiến hành quá trình polime hoá đường saccarozơ thành dextran. Điều kiện chủ động khống chế quá trình enzym-polime hoá nhằm thu loại dextran có phân tử lượng thích hợp để sử dụng trong ngành y dược học là :

Split Unregistered Version - http://www.simpopdf.com

+ Nhiệt độ 15^0C trong 8 giờ.

+ Khống chế nồng độ saccarozơ ban đầu.

+ Có thể dùng cách tăng nồng độ enzym lên song song với việc tăng nhiệt độ phản ứng lên 30^0C.

Bước kết thúc là tiến hành kết tủa bằng dung dịch metanol 40-50% để thu dextran.

Nhiều nước trên thế giới đã sản xuất dextran bằng công nghệ lên men nhờ vi khuẩn *Leuconostoc mensenteroides* và một số loài khác. Dược phẩm dextran trên thị trường có nhiều tên khác nhau : Dextran ; Poliglukin, Xincol.

2.7.2. Ứng dụng của dextran trong chăn nuôi

Sử dụng trong chăn nuôi là chế phẩm dextran-Fe, chế phẩm được nhiều nước sản xuất mang các tên như Dextran-Fe 100, Dextran-Ferium, Urso Feran-100... có tác dụng phòng bệnh thiếu máu, bệnh tiêu chảy, tăng cường sức đề kháng và tăng khả năng sinh trưởng đối với gia súc non, đặc biệt là đối với lợn con bú sữa, vì lúc này lợn bị mất nguồn hồng cầu và các chất dinh dưỡng từ máu và nhau thai của con mẹ, nên lợn con phải tự hoạt động để tạo hồng cầu, làm nhiệm vụ chuyển oxi và các chất dinh dưỡng đến mô bào, nhưng do hệ tạo máu của chúng chưa hoàn chỉnh nên chúng thường bị thiếu máu. Để cấu tạo hồng cầu, cần có Fe (nhân Hem), lợn con mỗi ngày cần từ 7-11mg Fe, song sữa mẹ chỉ cung cấp 2mg Fe/ngày để tạo hemoglobin và một số men chuyển hoá, men hô hấp cytochrom : cytochromoxidaza, catalaza và peroxidaza. Nếu trong 4 tuần đầu không bổ sung Fe kịp thời cho chúng, sẽ xuất hiện hội chứng thiếu máu do thiếu Fe và gây rối loạn chuyển hóa sinh học trong chu trình Crepbs. Kết quả thực nghiệm cho thấy, có bổ sung dextran thì tỉ lệ mắc bệnh ở lợn con giảm từ 47-58%, tỉ lệ nuôi sống tăng 29-34%.

2.8. Công nghệ vi sinh trong bảo quản thức ăn gia súc

2.8.1. Mục đích ý nghĩa của công tác bảo quản

- Bảo quản, dự trữ thức ăn là một khâu vô cùng quan trọng trong công tác chăn nuôi, nếu việc bảo quản dự trữ thức ăn không tốt sẽ làm tổn thất không nhỏ về khối lượng và phẩm chất của thức ăn, làm hao hụt, hư hỏng, gây thiệt hại về kinh tế và ảnh hưởng đến việc chăn nuôi.

- Bảo quản dự trữ thức ăn chính là tìm cách ngăn cản, trấn áp và tiêu diệt các loại VSV gây nhiễm, đồng thời hạn chế đến mức tối đa các quá trình sinh hoá diễn ra trong thức ăn bảo quản, trên cơ sở đó nhằm mục

đích cuối cùng là giữ nguyên trạng thái và phẩm chất ban đầu của thức ăn dự trữ hoặc cũng có thể theo một hướng khác là nhằm chuyển thức ăn về một dạng mới thơm ngon hơn, dễ vận chuyển và hấp thu hơn, mà vẫn đảm bảo giá trị dinh dưỡng vốn có của thức ăn.

Split Unregistered Version - http://www.simpopdf.com

Trong quá trình chế biến đã đồng thời bao gồm cả các biện pháp bảo quản và ngược lại khi áp dụng các biện pháp bảo quản cũng đồng thời bao gồm cả tính chất chế biến.

- Thức ăn bị hư hao trong quá trình bảo quản, dự trữ thường do các nguyên nhân sau :

+ Do tác dụng tự phân huỷ của enzym trong tế bào thức ăn.

+ Do tác dụng phân huỷ của tế bào VSV.

+ Do sự phá hoại của côn trùng và động vật.

Vì vậy muốn bảo quản tốt cần phải có các biện pháp tích cực, nhằm hạn chế các tác nhân trên, trong đó đặc biệt chú ý đến tác dụng tự phân huỷ của enzym tế bào và sự phân huỷ của VSV, từ đó đề ra các phương pháp bảo quản hữu hiệu. Song dù là biện pháp nào thì mục tiêu của bảo quản cần hướng tới là : làm chậm hoặc ngăn ngừa tác động huỷ hoại của các nhân tố có hại đối với thức ăn.

2.8.2. Nguyên tắc bảo quản thức ăn

Có rất nhiều phương pháp bảo quản thức ăn, song nhìn chung các phương pháp đều phải tuân thủ theo 3 nguyên tắc sau :

a) *Nguyên tắc Bioza (bios = sự sống)*

Theo nguyên tắc này, thức ăn được cất giữ ở điều kiện vệ sinh cao, với môi trường vô trùng tuyệt đối để luôn luôn giữ nguyên trạng thái tươi sống ban đầu của nguyên liệu, tức là bảo đảm quá trình hoạt động sinh lí bình thường của thức ăn, ngăn cản hoạt động của VSV, như để thức ăn trong nhà kính vô trùng, có máy điều hoà nhiệt độ, được giữ ở 20^0C.

Phương pháp này không thích hợp với điều kiện khí hậu nhiệt đới và đòi hỏi thiết bị đắt tiền, do vậy ở nước ta không hoặc ít ứng dụng.

b) *Nguyên tắc Abioza (Abiosis = không sống)*

Theo nguyên tắc này người ta dùng các biện pháp đình chỉ hoàn toàn sự sống của các VSV gây nhiễm. Dưới tác dụng của các yếu tố diệt khuẩn, bản thân khối nguyên liệu được bảo quản cũng thay đổi trạng thái, không còn tươi sống nữa. Nguyên tắc này có 3 phương pháp thường được sử dụng :

- Thanh trùng ở nhiệt độ cao : Dưới tác dụng của nhiệt, bản thân các tế bào của VSV bị tiêu diệt hoặc các enzym quan trọng của chúng bị bất

Split Unregistered Version - http://www.simpopdf.com
hoạt động vậy không gây nhiễm được. Phương pháp này còn gọi là "sử dụng quá trình nhiệt nóng".

- Chiếu xạ và siêu âm : các tia bức xạ dạng a, b, g, tia X, các tia hồng ngoại, tử ngoại gây tác dụng oxi hoá hoặc ion hoá, do đó có thể làm thay đổi cấu trúc của tế bào VSV, phá vỡ vách tế bào hoặc làm bất hoạt hệ enzym của chúng. Phương pháp này giá thành rất cao và đôi khi không an toàn cho gia súc khi sử dụng, nên ít hoặc không sử dụng.

- Dùng các loại hoá chất bảo quản : Nhiều hợp chất vô cơ cũng như hữu cơ có tác dụng sát trùng, cơ chế tác dụng của nó thể hiện : phá huỷ thành phần cấu trúc tế bào, ngăn ngừa sự sinh tổng hợp enzym và các protein cấu trúc khác, gây rối loạn quá trình thẩm thấu qua vách tế bào. Điều lưu ý là các hoá chất sử dụng đều có thể gây độc hại cho gia súc khi sử dụng thức ăn này, do vậy phương pháp này không hoặc ít được dùng.

c) *Nguyên tắc Anabioza (Anabisi = dạng sống ngầm, sống tiềm tàng)*

Theo nguyên tắc này, người ta áp dụng các biện pháp nhằm hạn chế sự phát triển của VSV và hoạt tính của các enzym, nhưng không giết chết hoặc đình chỉ hoàn toàn. Theo nguyên tắc này, có các biện pháp sau :

- Bảo quản thức ăn ở trạng thái lạnh.
- Bảo quản thức ăn bằng cách phơi hay sấy khô.
- Bảo quản thức ăn bằng cách tạo áp suất thẩm thấu cao.
- Bảo quản thức ăn bằng axit.
- Bảo quản thức ăn bằng khí trơ và khí cacbonic.
- Bảo quản thức ăn bằng cách tạo điều kiện cho một quá trình lên men có lợi.

Trong thực tế, tuỳ theo điều kiện và hoàn cảnh cụ thể mà vận dụng một trong những nguyên tắc trên, nhưng dù là áp dụng nguyên tắc nào thì vẫn là sự tác động vào VSV. Do đó có thể xác định nguyên tắc chung của bảo quản thức ăn là hạn chế, ngăn chặn hoặc đình chỉ hoàn toàn sự hoạt động phân giải của VSV đối với thức ăn, mà trong đó enzym của tế bào vẫn hoạt động bình thường hoặc giảm hoạt động hay bị đình chỉ hoàn toàn.

2.9. Các biện pháp cơ bản trong công tác bảo quản thức ăn trong chăn nuôi

2.9.1. Biện pháp khống chế số lượng vi sinh vật xâm nhập vào thức ăn

Mục đích của biện pháp này là làm giảm tối thiểu số lượng VSV có trong thức ăn trước khi bảo quản và sự xâm nhập của VSV trong quá trình bảo quản, bao gồm :

a) *Biện pháp vô khuẩn*

Dùng các phương pháp khử trùng bằng nhiệt độ cao, hoá chất, tia phóng xạ...đối với thức ăn có khối lượng nhỏ, nhưng giá trị sử dụng cao như các thức ăn bổ sung về đạm, vitamin, dextran-Fe, huyết thanh...

Split Unregistered Version - http://www.simpopdf.com

b) *Biện pháp loại trừ VSV*

Dùng các biện pháp lọc, rửa hoặc tác nhân vật lí, hoá học để làm giảm số lượng VSV có trong thức ăn như rửa sạch đất bẩn đối với thức ăn xanh, củ quả. Dùng tia tử ngoại, phơi nắng, hoặc sấy khô đối với thức ăn hạt, hoặc các nguyên liệu động, thực vật trước khi nghiền thành hỗn hợp thức ăn.

c) *Biện pháp làm giảm sự xâm nhập của VSV vào thức ăn*

Sự xâm nhập của VSV vào thức ăn trong quá trình vận chuyển, bảo quản luôn luôn xảy ra, do đó cần được chú ý xử lí. Một số loại thức ăn chưa qua chế biến những do có màng ngăn cách tự nhiên như áo của bắp ngô, vỏ của hạt, vỏ của khoai, sắn... có tác dụng bảo vệ rất tốt, nếu các màng này bị tổn thương thì VSV dễ nhiễm vào và gây hỏng thức ăn.

Khi bảo quản thức ăn củ, quả, nếu không loại trừ các củ, quả thối ngay từ đầu, hoặc trong khi bảo quản không phát hiện các củ, quả thối để loại bỏ thì sẽ lây nhiễm sang các củ, quả khác.

2.9.2. Biện pháp khống chế điều kiện ngoại cảnh có liên quan đến hoạt động sống của vi sinh vật

Các yếu tố ngoại cảnh như nhiệt độ, độ ẩm, độ pH, thành phần và nồng độ các chất có trong môi trường, sự thông khí... đều có thể ảnh hưởng đến sự sinh trưởng và phát triển của VSV, vì vậy có thể sử dụng những tác nhân vật lí, hoá học để làm thay đổi các yếu tố này, tạo hoàn cảnh bất lợi cho hoạt động sống của VSV, dẫn đến làm chậm hoặc làm ngừng các quá trình phân huỷ của chúng đối với thức ăn được bảo quản.

a) *Các tác nhân vật lí ảnh hưởng đến sinh trưởng, phát triển của VSV*

- Nhiệt độ cao gây ức chế hoặc tiêu diệt VSV, nhiệt độ thấp gây ức chế sinh trưởng.

- Điều kiện khô làm ngừng quá trình trao đổi chất của VSV, do thiếu nước tự do trong thức ăn.

- Tia phóng xạ có năng lượng bức xạ lớn gây tác dụng kìm hãm sinh trưởng, do tác động lên ADN của VSV.

- Sự thông khí hay hạn chế không khí đối với VSV yếm khí hay hảo khí.

b) *Các nhân tố hoá học ảnh hưởng đến sinh trưởng, phát triển của VSV*

- Chất có tác dụng làm thay đổi áp suất thẩm thấu của môi trường, tạo áp suất thẩm thấu cao làm tiêu nguyên sinh chất của VSV như NaCl 2%, đường 70%.

- Chất làm thay đổi độ pH của môi trường như các axit lactic, axit axetic, các chất kiềm NaOH, KOH...

- Chất làm ức chế hoạt động của các enzym của VSV như khói bếp, kháng sinh và các chất ức chế như natribenzoat.

Split Unregistered Version - http://www.simpopdf.com

- Các chất diệt khuẩn.

2.9.3. Các phương pháp bảo quản thức ăn

Muốn bảo quản tốt thức ăn, phải dựa trên 3 nguyên tắc chung và 2 biện pháp cơ bản nêu trên để định ra phương pháp bảo quản thích hợp cho từng loại thức ăn.

Trước hết phải chuẩn bị những công việc cần thiết trước khi đem bảo quản như làm sạch thức ăn, đóng gói vào bao bì, vệ sinh kho tàng... sau đó mới định ra phương pháp bảo quản thích hợp với từng loại thức ăn và phù hợp với thực tế sản xuất.

a) *Phương pháp vật lí*

Phương pháp này có thể áp dụng đối với tất cả các loại thức ăn.

- Phương pháp làm khô :

Thức ăn được xử lí nhiệt để làm khô như thức ăn xanh, thức ăn củ, quả đem thái rồi phơi khô, sau đó bảo quản nơi sạch, khô ráo, thoáng khí.

- Phương pháp làm lạnh :

Sử dụng môi trường nhiệt độ thấp để bảo quản lượng thức ăn lớn đã được xử lí, bao gói, có thể dùng kho lạnh, nhà lạnh.

- Phương pháp kín :

Sử dụng biện pháp ngăn chặn thức ăn với môi trường để tránh lây nhiễm VSV, hoặc tạo môi trường không có oxi gây ức chế VSV hảo khí phát triển. Thức ăn có thể đóng hộp, đóng túi chất dẻo, sau đó bảo quản nơi khô ráo, hoặc bảo quản nơi kín như bảo quản khoai, sắn bằng vùi trong cát.

- Phương pháp chiếu xạ :

Sử dụng các tia xạ để bảo quản là phương pháp tiên tiến hiện nay vì có nhiều ưu điểm :

+ Có khả năng diệt trừ VSV và côn trùng, nên thức ăn đạt tiêu chuẩn vệ sinh thực phẩm.

+ Độ xuyên sâu của tia ion hoá cao nên cho phép xử lí các sản phẩm có bao bì, có độ dày từ 20-30cm, cho nên xử lí dễ dàng, đồng đều và không bị nhiễm trùng lại.

+ Có khả năng cơ giới tự động hoá, do đó đạt năng suất cao và cần ít nhân lực.

+ Không để lại dư lượng độc, nên không gây độc cho gia súc khi sử dụng như dùng hoá chất để bảo quản.

Tuy vậy phương pháp này cũng có nhược điểm là làm thay đổi màu sắc, mùi vị của thức ăn nếu như cường độ và liều lượng chiếu xạ không

phù hợp với từng loại sản phẩm và tính chất của từng sản phẩm được bảo quản.

Split Unregistered Version - http://www.simpopdf.com

b) *Phương pháp hoá học*

Các chất hoá học được sử dụng trong công tác bảo quản với nhiều hình thức khác nhau

- Sát trùng kho : Một số chất hoá học có tác dụng diệt côn trùng có hại và diệt khuẩn mạnh dùng để sát trùng kho trước khi đưa thức ăn vào bảo quản như các chất malathion, CH_3Br ; Cl_3NO_2... để phun xông kho.

- Xông thức ăn : Dùng các hóa chất bay hơi có tính sát trùng mạnh như dùng CH_3Br để xông thức ăn, ngoài ra có thể dùng khói bếp để xông cũng có hiệu quả khử trùng cao, vì trong khói bếp có chứa khoảng hơn 70 hợp chất hữu cơ có khả năng sát trùng mạnh như CO_2 ; oxi cacbon ; hidro cacbon ; crezon ; foocmandehit ; fenol ; axit foocmic ; axit axetic v.v...

- Phun hoặc quét phía ngoài thức ăn : Một số loại thức ăn củ, quả, hạt có thể bảo quản bằng việc phun các dung dịch hoá chất như axit benzoic axit socbic 1% trộn với chất bột nấu thành hồ loãng quét phía ngoài những loại thức ăn này.

- Trộn trực tiếp vào thức ăn bảo quản : Phương pháp này thường được sử dụng như dùng các chất có nồng độ cao (muối, đường) để ngâm tẩm thức ăn. Dùng axit socbic, axit benzoic nồng độ 0,1% trộn vào thức ăn dạng lỏng để bảo quản, hoặc trộn $Na_2S_2O_3$ từ 1 - 1,5% vào thức ăn có hàm lượng nước cao hay hạt có dầu.

c) *Phương pháp sinh học*

Là phương pháp sử dụng tác nhân VSV tác động trực tiếp lên thức ăn để tạo ra môi trường hoạt động không thuận lợi cho VSV thối, hỏng, do đó thức ăn được bảo quản.

- Phương pháp làm khô sinh học :

+ Nguyên lí : Lợi dụng sự sinh nhiệt của VSV trong quá trình sống của chúng, đầu tiên là sự sinh nhiệt của những VSV hảo khí không ưa nhiệt, sau đó là sự hoạt động của VSV yếm khí ưa nhiệt. Sự sinh nhiệt cao trong khối thức ăn chủ yếu là do nhóm VSV ưa nhiệt có phạm vi nhiệt độ thích hợp là : 25-40^{0}C, 50-55^{0}C, 70-90^{0}C, chúng là các vi khuẩn có nha bào sống ở trong đất và trong nước như *Streptococcus thermophilus* (70-75^{0}C/15 phút), *Lactobacillus bungaricus* (70^{0}C/30 phút), *Bacillus subtilis* (100^{0}C/15-20 phút).

+ Quá trình lên men sinh nhiệt là kết quả của 3 yếu tố tác động :

* Tác dụng hô hấp của tế bào thực vật.

Split Unregistered Version - http://www.simpopdf.com

* Tác dụng phân giải của enzym tế bào.

* Tác dụng của VSV.

Trong đó tác dụng của VSV đóng vai trò hết sức quan trọng. Nhiệt độ khi lên men có thể đạt tới 70°C, trường hợp đặc biệt, nhiệt độ có thể tăng rất cao gây ra cháy.

+ Phương pháp tiến hành : có 2 cách

* Cỏ được chất đống cao, đường kính 6-7m, đậy kín, nén chặt, sau vài ba ngày thức ăn có trạng thái biến đổi như : khô cứng, màu nâu nhạt hoặc sẫm, có mùi thơm dễ bay hơi như mùi bánh nướng. Trong thức ăn có chứa các sản phẩm lên men là axit lactic 8%, axit axetic 2%, sau khi khô, lượng dinh dưỡng về đường, đạm có thể bị mất đi khoảng 14%.

* Cỏ cũng được chất đống như trên, những đến khi nhiệt độ trong đống cỏ tăng cao thì tãi cỏ ra thành các lớp mỏng vừa phải để làm bay nhanh hơi nước, sẽ thu được dạng thức ăn có trạng thái biến đổi, mùi vị như trên.

b) *Phương pháp ủ xanh*

Để bảo quản thức ủ xanh, có thể dùng biện pháp lên men lactic. Muốn thực hiện lên men tốt cần đảm bảo các điều kiện sau : có độ đường tối thiểu, độ ẩm 75%, nhiệt độ thích hợp trên dưới 30°C và ở trạng thái yếm khí triệt để.

+ Nguyên lí : Lợi dụng vi khuẩn lên men lactic có sẵn trong thức ăn xanh, trong điều kiện yếm khí, vi khuẩn này làm lên men đường có trong thức ăn xanh, khi độ axit đạt 1,5-2% làm cho độ pH của thức ăn hạ xuống 4,2 ; ở điều kiện pH này, hầu hết cácVSV gây thối rữa bị ức chế, nên không gây thối hỏng thức ăn.

+ Phương pháp tiến hành : Cắt thức ăn có độ dài vừa phải, nén chặt trong thùng, bể hoặc hố ủ, đảm bảo độ ẩm và đậy kín. Làm như vậy thì sự hoạt động lên men của các vi khuẩn lactic tăng dần, đầu tiên là vi khuẩn *Streptococcus lactic*, sau đó là *Lactobacter lactic* còn vi khuẩn *Bacterium coli* thì hoạt động giảm dần.

Thức ăn ủ xanh có màu vàng chanh, hơi chua, có mùi thơm. Nếu khi ủ không nén chặt, hoặc hố ủ bị hở làm thức ăn bị mốc, hoặc thức ăn khi ủ quá non, nhiều nước, hoặc thức ăn bẩn thì sẽ bị biến thối.

2.10. Vi sinh vật trong chế biến thức ăn gia súc

Ứng dụng vi sinh trong chế biến thức ăn gia súc là sử dụng các nhóm vi khuẩn, nấm men, nấm mốc có khả năng phân giải nguyên liệu, nhưng không làm hỏng nguyên liệu, mà trái lại, chúng chuyển hoá nguyên liệu sang một dạng thức ăn có mùi vị chua thơm, ngon, hấp dẫn hơn, đồng thời làm tăng khả năng tiêu hoá, hấp thu, tăng giá trị dinh dưỡng của thức ăn.

Split Unregistered Version - http://www.simpopdf.com

Hai nhóm VSV thường được dùng nhiều trong chế biến thức ăn gia súc là nhóm vi khuẩn lên men lactic và nhóm nấm mốc phân giải protein.

2.10.1. Lợi ích của phương pháp lên men

- Lên men là một quá trình chuyển hóa các nguyên liệu dạng gluxit thành rượu và axit hữu cơ, nhờ hoạt động của một số loại VSV đặc chủng, các sản phẩm rượu hoặc axit hữu cơ hình thành là những chất không gây độc mà còn có hương vị chua thơm, ngon, kích thích tiêu hoá.

- Quá trình lên men có lợi diễn ra hoàn tất, thì cùng một lúc đạt được các hiệu quả sau :

+ Các VSV gây lên men phát triển mạnh, tạo ra một khối lượng sinh khối lớn, gây áp đảo về số lượng khiến cho các VSV gây nhiễm và các tạp khuẩn bị kìm hãm không phát triển được trong khối nguyên liệu.

+ Các sản phẩm lên men tiết vào môi trường một khối lượng đáng kể axit lactic có tác dụng giữ tươi và gây chua cho nguyên liệu, do đó tạo nên hương vị thơm chua, ngon, góp phần ức chế sự xâm nhập của các VSV có hại.

+ Tạo ra độ pH thấp, không thích hợp với nhóm VSV gây ôi thối và *E.coli*.

Phương pháp này đơn giản, rẻ tiền, vì không tốn nguyên liệu để sấy, không cần dùng đến các hoá chất đắt tiền và đặc biệt là không gây hại cho gia súc khi sử dụng, do vậy phương pháp này được áp dụng rộng rãi để bảo quản và chế biến thức ăn xanh dạng rau, củ, quả.

2.10.2. Sử dụng nhóm vi khuẩn lactic trong chế biến thức ăn gia súc

Dùng nhóm vi khuẩn lactic cho mục đích chế biến thức ăn gia súc là ứng dụng quá trình lên men có lợi, quá trình này chủ yếu do nhóm vi khuẩn lactic gây ra như *Streptococcus lactic, Lactobater (Lactobacillus) lactic, Lactobater acidophilum*...nhóm vi khuẩn lactic này tồn tại khá phổ biến trong tự nhiên, trong đường tiêu hóa của động vật và có sẵn trong thức ăn xanh, nên khi chế biến thường xảy ra quá trình lên men axit.

a) *Lên men thức ăn xanh* : Có 2 loại :

- Lên men khô : Thức ăn xanh được thái nhỏ, trộn với 20-30% thức ăn tinh, đảm bảo độ ẩm 60-70%, đem nén chặt trong thùng, chậu, hố ủ hoặc dụng cụ kín, trong 3-4 ngày, tuỳ theo nhiệt độ bên ngoài. Nếu nhiệt độ thấp thì kéo dài thời gian và ngược lại, nếu nhiệt độ cao thì rút ngắn thời gian.

- Lên men ướt : Thức ăn thô xanh được thái nhỏ, ngâm ngập nước, đậy kín, để thời gian 3-5 ngày có thể dùng được.

b) *Lên men thức ăn tinh bột*

Các chủng vi khuẩn *Lactobacillus* có khả năng lên men trực tiếp tinh bột sắn, rong, riềng, khoai và các phụ phẩm nông nghiệp khác, đồng thời

Split Unregistered Version - http://www.simpopdf.com
tạo hương vị thơm chua, khử mùi khó chịu và chất độc, tăng protein và tăng tỉ lệ tiêu hoá.

Để tạo điều kiện cho thức ăn lên men tốt phải đảm bảo có đủ độ ẩm, nhiệt độ môi trường thích hợp và nhất là phải ủ kín (yếm khí triệt để). Cần chú ý thức ăn khi đem ủ phải sạch, không non quá, nếu phối hợp được nhiều loại thức ăn để ủ thì càng tốt.

2.10.3. Sử dụng nấm men trong chế biến thức ăn gia súc

Là quy trình lên men mà sản phẩm cuối cùng có thể dễ dàng nhận ra trong thức ăn đó là rượu (C_2H_5OH). Sau khi lên men, giá trị dinh dưỡng của thức ăn được tăng lên rõ rệt, do sự tăng lên của thành phần protein và vitamin nhóm B do nấm men tổng hợp. Quá trình này chủ yếu do các nấm men *Saccharomyces cerevisiae, Torula ustilis, Candida tropicalis* sinh ra.

a) *Lên men thức ăn làm giàu protein*

Sử dụng nấm men *Candida tropicalis* lên men trực tiếp sắn, không cần qua quá trình thuỷ phân ban đầu, làm tăng hàm lượng protein trong sắn tươi lên đến 14,28% và trong sắn khô lên tới 50%. Ngoài ra có thể sử dụng nấm men phối hợp với nấm sợi để lên men làm giàu protein cho các nguyên liệu như sắn, bã sắn, chuối khô, vỏ chuối, bã củ cải đường...

b) *Lên men thức ăn giàu bột đường*

Thức ăn tinh bột đem trộn đều với men giống tốt, thuần khiết theo tỉ lệ nhất định, cho nước sạch trộn đều, đảm bảo độ ẩm 55-60%, cho vào thùng, chum, vại hoặc túi nilon kín, ủ trong điều kiện yếm khí từ 1-3 ngày, tuỳ theo nhiệt độ bên ngoài, tốt nhất ở nhiệt độ 27-32°C. Thức ăn sẽ mềm ra và có mùi thơm rượu, mát, mùi quả chín, độ rượu không tăng cao và không biến chua khi để thức ăn kéo dài.

c) *Tác dụng của thức ăn lên men*

- Nâng cao được tỉ lệ tiêu hoá và giá trị dinh dưỡng của thức ăn.

- Thức ăn được làm mềm, có mùi thơm, ngon, kích thích tiết dịch vị, tăng tỉ lệ tiêu hoá.

- Tăng cường sự chuyển hoá và tổng hợp thành thức ăn có giá trị dinh dưỡng cao như tăng lượng vitamin nhóm B, tăng lượng axit amin không thay thế. Có thể cho thêm urê hoặc $(NH_4)_2SO_4$ vào thức ăn để khi lên men sẽ làm tăng quá trình sinh tổng hợp protein của nấm men từ nguồn N này, làm cho hàm lượng protein trong thức ăn lên men tăng lên đáng kể.

Khử độc, khử mùi hôi khó chịu : Các loại thức ăn như cỏ, rau dại có lông, có mùi không thích hợp với gia súc, thì sau khi ủ men đã khử được mùi hôi khó chịu và phần lớn các chất độc hại cho gia súc.

Split Unregistered Version - http://www.simpopdf.com

- Ngăn ngừa sự thối rữa trong đường ruột : Thức ăn lên men có tác dụng ngăn cản các vi khuẩn thối rữa và kìm hãm các vi khuẩn gây bệnh đường ruột do tác dụng của axit lactic và sự đối kháng của vi khuẩn lactic, do đó thức ăn lên men thường có tỉ lệ tăng trọng cao hơn, tiết kiệm được thức ăn, tăng sức đề kháng, giảm được bệnh, nâng cao được năng suất và hiệu quả kinh tế.

2.10.4. Phương pháp đường hoá

Có nhiều nhóm VSV có khả năng đường hoá tinh bột và chất xơ là do chúng có thể sinh ra enzym amilaza và enzym xenlulaza có hoạt tính cao và có số lượng lớn, điển hình là các loại nấm mốc *Aspergillups niaer, Asp. oryzae, Rhizopus javanicus, Saccharomyces cerevisiae, Cl. butiricum.*

Quá trình đường hoá : Tinh bột ngô, khoai, sắn, gạo, đem đồ chín hoặc có thể để sống, rải đều trên nong, nia, dày khoảng 2-3cm, đảm bảo độ ẩm thường xuyên ở 60-65%, để ở nhiệt độ 30-32^{0}C trong thời gian 2-3 ngày, khi mốc mọc có màu nâu sẫm, cho vào thùng, chum, vại, đậy kín, để ở nhiệt độ 43-47^{0}C trong 1-2 ngày.

- Khối thức ăn sau khi đường hoá được đem nấu chín với thức ăn khác, hoặc có thể ủ men rượu cùng với thức ăn tinh bột khác để nuôi gia súc.

Thức ăn đường hoá có tác dụng tốt trong chăn nuôi, vì nó chuyển hoá được tinh bột là chất khó tiêu hoá, hấp thu thành đường là chất dễ tiêu hoá, hấp thu, do vậy tăng cường được hiệu quả lợi dụng thức ăn, đồng thời mở rộng được nguồn thức ăn dùng cho chăn nuôi, nhất là ở những vùng trồng màu có nhiều ngô, khoai, sắn.

HƯỚNG DẪN ÔN TẬP

1. Quan hệ giữa cơ thể-VSV - môi trường có ảnh hưởng đến quá trình nhiễm trùng và khả năng nhiễm trùng như thế nào ?
2. Quá trình truyền lây, yếu tố truyền lây và phương thức truyền lây có liên quan tới mối quan hệ giữa cơ thể - VSV - môi trường như thế nào ?
4. Nguyên lí và các biện pháp phòng chống bệnh nhiễm trùng.
5. Công nghệ sản xuất sinh khối tảo và ứng dụng của tảo trong chăn nuôi.
6. Đặc điểm chung của nấm men và phương pháp nuôi cấy nấm men thu sinh khối.
7. Một số enzym VSV chủ yếu và ứng dụng chủ yếu.
8. Phương pháp sản xuất axit amin, vitamin, dextran bằng VSV.
9. Nguyên tắc bảo quản và các biện pháp cơ bản trong công tác bảo quản thức ăn.
10. Lợi ích của phương pháp lên men và sử dụng nhóm vi khuẩn lactic và nhóm nấm men để chế biến thức ăn gia súc.

Split Unregistered Version - http://www.simpopdf.com

Chương 10

VI SINH VẬT ỨNG DỤNG TRONG NUÔI TRỒNG THUỶ SẢN

I - VI SINH VẬT ỨNG DỤNG TRONG NUÔI THUỶ SẢN

Nước ta có rất nhiều ao hồ, sông ngòi và cả một bờ biển trải dài suốt từ Bắc tới Nam. Với diện tích mặt nước lợ và ngọt rộng như thế, nếu biết sử dụng một cách khoa học và hợp lí để nuôi trồng thủy sản, sẽ mang lại hiệu quả tốt.

1.1. Thành tựu nghiên cứu ứng dụng vi tảo

- Để nghề nuôi hải sản phát triển ổn định, phải luôn chú trọng tới nguồn giống. Muốn có con giống, ngoài kĩ thuật tạo giống (không đề cập tới trong phạm vi giáo trình này) còn phải có nguồn thức ăn tươi, sống cho chúng. Giai đoạn đầu của sự phát triển ấu thể của tôm, động vật thân mềm hai mảnh vỏ và một số loài cá đều phải dùng vi tảo làm nguồn thức ăn, vì chúng có thành phần dinh dưỡng quý, cần thiết cho sự sinh trưởng và phát triển của ấu thể.

- Việc nuôi vi tảo làm thức ăn cho ấu thể thủy sản biển đã được chú ý từ lâu. Năm 1910, Allen và Nelson đã dùng tảo silic để làm thức ăn cho một số động vật thân mềm hai mảnh vỏ. Năm 1939, Bruce và cộng sự đã phân lập và nuôi tảo đơn bào *Isochrysis galvana* và *Pyramimonas grosii* để nuôi ấu trùng hầu.

Tại Việt Nam, Nhật Bản, Thái Lan, Malaixia và Đài loan, người ta nuôi ấu thể tôm ở giai đoạn zoea bằng tảo silic *Skeletonema costatum* và *Chaetoceros* sp.

Ở nước Anh, tảo *Tetraselmis* đã được nuôi ở quy mô công nghiệp để làm thức ăn cho một số loài hàu (*Crassostrea gigas, C. virginica, Mercenaria, Ostrea edulis*...). Sinh khối *Tetraselmis suecica* và *Cyclotella cryptica* được sản xuất bằng cách sấy phun có giá 170 USD/kg.

- Hiện nay chế độ thức ăn cho con giống hải sản ở hầu hết các trại sản xuất giống là sự phối hợp giữa vi tảo sống với một số thức ăn nhân tạo.

Để được dùng làm thức ăn tươi cho ấu thể thủy sản, các loài vi tảo phải đáp ứng được các điều kiện sau đây :

+ Không làm hại con giống.

Split Unregistered Version - http://www.simpopdf.com

+ Kích thước phù hợp với đường kính miệng của đối tượng nuôi để động vật nuôi nuốt được.

+ Thành tế bào (cell wall) dễ phân giải.

+ Thành phần dinh dưỡng của tế bào phong phú.

- Trong số các chỉ tiêu hoá học của tế bào vi tảo, thành phần axit amin và các axit béo đóng vai trò rất quan trọng đối với sự sinh trưởng và phát triển của ấu thể. Một số axit béo mạch dài không no ở vi tảo là một trong các yếu tố có ý nghĩa quyết định cho sinh trưởng và tỉ lệ sống của cá biển, tôm và động vật thân mềm hai mảnh vỏ. Thiếu một số axit béo có thể là nguyên nhân làm giảm giá trị dinh dưỡng của một số loài vi tảo.

- Thành phần hoá học của sinh khối vi tảo cũng như mức độ chưa bão hoà của các axit béo phụ thuộc nhiều vào điều kiện nuôi cấy như : nhiệt độ, cường độ sáng, dinh dưỡng, áp suất thẩm thấu, pha sinh trưởng v.v...

Vi tảo chứa nhiều chất béo và lượng dầu tương tự thành phần dầu thực vật bậc cao. Trong một số điều kiện nhất định, tảo có thể chứa hàm lượng lipit tới 85% khối lượng khô (KLK). Thông thường, hàm lượng của lipit trong sinh khối tảo dao động từ 20 đến 40% chất khô.

Ở vi tảo, lipit là ester của glixerol và các axit béo mạch dài C_{14} - C_{22}. Các axit béo này có thể bão hoà hoặc không bão hoà. Ví dụ : một số chủng tảo lam *Spirulina* có lượng axit béo không bão hoà khá cao : 25 - 60% axit béo tổng số. Trong vi tảo có nhân (eukaryotic algae), triglyxerit là lipit dự trữ quan trọng và có thể chiếm tới 80% tổng lượng lipit. Những axit béo mạch dài, chưa bão hoà được coi là rất quan trọng, gồm các axit linoleic, arachidonic và eicosapentaenoic. Những axit béo này là thành phần rất quan trọng trong khẩu phần ăn của người và động vật. Tảo *Spirulina platensis* chứa tới 21% axit γ - linoleic trong tổng số axit béo, trong khi *Porphiridium cruentum* lại chứa axit arachidonic là chủ yếu (35% tổng lượng axit béo). Ở *Chroomonas danica* có thành phần axit γ - linoleic (11% tổng lượng axit béo) thì sinh khối tảo *Monodus subterraneous* lại có nhiều axit arachidonic và axit eicosapentaenoic. Cũng nhờ có hàm lượng protein và các axit béo mạch dài chưa no cao, một số vi tảo nước mặn *(Skeletonema, Chaetoceros, Tetraselmis, Pavlova...)* đã trở thành thức ăn tươi sống không thể thiếu được cho ấu thể của động vật thân mềm hai mảnh vỏ (hàu, hào, ngao, ngán, tu hài...).

- Vi tảo là VSV quang hợp do tế bào cơ thể chứa các sắc tố (pigments), chủ yếu là diệp lục (chlorophill). Ngoài ra còn chứa các sắc tố bổ trợ như phicobiliprotein và carotenoit. Những sắc tố này khiến cơ

Split Unregistered Version - http://www.simpopdf.com
thể tảo luôn có màu rất thuận lợi cho sự bắt mồi của các ấu thể thuỷ sản. Mặt khác màu sắc của các ấu thể cũng như cá thể thuỷ sản trưởng thành phụ thuộc rất nhiều vào nguồn thức ăn, trong đó vi tảo giữ vai trò quyết định.

Các carotenoit có gam màu từ vàng đến đỏ. Các loại carotenoit thông thường chiếm tới 0,1% khối lượng khô (KLK) của vi tảo, nhưng ở một số loài, β - caroten chiếm tới 5% KLK. Tảo *Haematococcus pluvialis* lại tích luỹ nhiều astaxanthin.

Carotenoit được sử dụng nhiều vào mục đích khác nhau. Ví dụ chúng được coi là chất màu thực phẩm có nguồn gốc tự nhiên, là tác nhân làm tăng màu sắc cho thịt cá hồi và lòng đỏ trứng gà cũng như tăng thể trạng và khả năng sinh sản ở gia súc nuôi nhốt. β - caroten còn được coi là chất kích thích sinh trưởng, ngăn ngừa ung thư và làm sáng mắt.

Phicobiliprotein là những sắc tố tự nhiên có nhiều trong tảo đỏ. Đa số vi khuẩn lam (*Cyanobacteria*) chứa nhiều Phicobiliprotein, nhưng hàm lượng của chúng phụ thuộc khá nhiều vào yếu tố ngoại cảnh như cường độ và chất lượng ánh sáng, dinh dưỡng nitơ. Sắc tố phicoxianin chiết xuất từ vi khuẩn lam *Spirulina platensis* có giá trị cao trên thị trường.

Vi tảo chứa khối lượng lớn cacbonhidrat dưới dạng sản phẩm dự trữ (tinh bột, glicogen) hoặc các chất điều hoà thẩm thấu (glixerol, trehalose, mannitol, sorbitol...).

Các loài tảo biển như : *Skeletonema costatum, Nitzschia longissima, Thallassiosira pseudopana, Pavlova* sp., *Isochrysis galvana, Nannochloropsis* sp., *Thalassiosira* sp, đã được nuôi cấy thử nghiệm nhằm thu sinh khối phục vụ cho nuôi trồng thủy sản.

- Sản xuất đại trà tảo làm thức ăn cho thủy sản theo kiểu tự dưỡng có thể thực hiện trong điều kiện ánh sáng tự nhiên hoặc sử dụng chiếu sáng nhân tạo. Nhược điểm của phương thức này là các cơ thể tảo che sáng lẫn nhau trong môi trường sống khiến sinh khối tảo thu được ít nếu như không có đủ các điều kiện cần thiết. Chính vì vậy, khả năng sản xuất vi tảo bằng phương pháp dị dưỡng có thể là giải pháp bổ sung hữu hiệu. Gladue và CS (1994) đã chỉ ra một số yếu tố quan trọng quyết định sự thành bại của việc sản xuất tảo theo phương pháp dị dưỡng trong các bể lên men như sau :

+ Tốc độ tăng trưởng cao.

+ Khả năng chống chịu muối (tăng trưởng được trong điều kiện nồng độ muối thấp nhưng chịu được nồng độ muối cao khi đưa vào bể nuôi ấu trùng cá, tôm).

Split Unregistered Version - http://www.simpopdf.com

+ Giá thành sản xuất thấp.

+ Có khả năng đạt mật độ tế bào cao.

+ Chịu được khuấy sục mạnh.

+ Có khả năng bảo quản lâu.

Hiện nay trong nhiều cơ sở sản xuất tôm giống ở nước ta đã tiến hành nuôi tảo *(Skeletonema, Chaetoceros)* trong các bể có dung tích từ 4-8m^3, đạt năng suất 20 - 26.10^4 tế bào/ml.

1.2. Một số tiêu chuẩn cần thiết để nuôi tảo

1.2.1. Tiêu chuẩn bể nuôi tảo

- Hình dạng : hình chữ nhật, hình vuông, hình tròn.
- Kích thước : (3,4 × 2 × 0,8)m ; (3 × 3 × 0,8)m ; ϕ (0,6-1,2)m.
- Dung tích bể : 4-8m^3.
- Đáy bể nghiêng 4°.
- Bể được xây dựng bằng vật liệu : xi măng, gỗ lót vải cao su hoặc nhựa cứng.
- Bể phải có hệ thống cấp - tiêu nước hoàn chỉnh, các ống cấp - tiêu nước có đường kính từ 4-6cm.

1.2.2. Tiêu chuẩn các thiết bị chính

- Hệ thống cấp khí :

Máy nén khí có áp suất hơi từ 2,5-3atm, ống dẫn khí từ máy đến bể làm bằng nhựa cứng. Ngoài ra còn có các van hơi và các ống nối hình chữ T, Y.

- Hệ thống cấp nước :

Máy bơm điện có công suất 4m^3/h ; hệ thống ống dẫn nước và các van, ống nối. Tùy theo lượng nước cần dùng mà xây dựng các bể lọc và bể chứa nước có các dung tích khác nhau.

- Hệ thống cấp nước :

Sử dụng mạng điện 220V phù hợp cho các loại máy chính.

- Các loại lưới, vợt :

Để phục vụ cho quá trình nuôi tảo thường sử dụng các loại lưới vớt thực vật phù du có N°65, N°75 và lưới vớt động vật phù du N°38.

- Các hóa chất chính dùng để nuôi vi tảo biển là : $NaNO_3$, NaH_2PO_4, vitamin B_{12}, biotin, thiamin, HCl, $Na_2SiO_3.9H_2O$, EDTA, $FeCl_3$. Tùy theo từng trường hợp mà thành phần và lượng hóa chất có khác nhau.

Split Unregistered Version - http://www.simpopdf.com

1.2.3. Kĩ thuật gây nuôi tảo

Số lượng bể nuôi tùy thuộc vào hình thức nuôi, nuôi riêng hay nuôi kết hợp. Nếu nuôi riêng thì tổng thể tích bể nuôi tảo gấp 2 lần bể ương nuôi ấu thể. Nếu nuôi kết hợp trong bể nuôi tảo thì số bể nuôi giữ giống cần 3-5 bể loại $1m^3$. Trước khi nuôi, cần phải tiến hành vệ sinh bể bằng nước xà phòng hoặc dung dịch bicacbonat natri 5ppm. Sau một ngày, rửa lại bằng nước ngọt từ 2-3 lần. Bể được phơi dưới ánh sáng mặt trời, sau đó mới cho nước vào bể. Nguồn nước lấy vào bể phải đảm bảo các chỉ tiêu : nước có độ trong cao, không có động vật phù du, độ mặn tương tự như nơi lấy giống tảo, pH từ 7,5- 8, mức nước trong bể không quá 70cm, nhiệt độ từ 20-30°C.

1.2.4. Kĩ thuật nhân giống

a) *Có hai cách nhân giống*

- Khi tảo cấy đã mọc tốt, ta lọc tảo ở tất cả các bể, rồi dồn vào 1 bể để tăng mật độ tế bào nhằm tạo ưu thế lấn át các loài tảo không mong muốn.

- Chọn giống : chọn các tế bào tảo thuần khiết muốn nuôi dưới kính hiển vi, sau đó tiến hành nuôi ở các thể tích nhỏ rồi nhân dần ra thể tích lớn (0,5 ; 1,8 ; 10 ; 20 ; 1000 lít), tiếp theo là nuôi đại trà. Biện pháp này đòi hỏi phải có thời gian, thao tác kĩ thuật cẩn thận. Nếu làm được theo phương pháp này, ta sẽ thu được sinh khối tảo thuần khiết.

Nếu nuôi kết hợp : Sau khi mật độ tảo trong các bể nuôi đạt tới giá trị thích hợp thì chuyển ấu thể tôm hoặc hải sản vào bể tảo, với mật độ trung bình từ 1000 - 1500 ấu thể/ml. Nếu nuôi kết hợp đồng thời thì mật độ ấu thể ban đầu từ 200-500 ấu thể/ml. Giống tảo duy trì tối đa là một tuần, sau đó phải tiến hành nuôi cấy lại, không duy trì giống tảo quá lâu, ảnh hưởng không tốt tới ấu thể của tôm.

b) *Bón phân cho bể nuôi tảo*

Phân được bón hàng ngày vào buổi sáng. Nồng độ tùy thuộc vào hình thức nuôi riêng hay nuôi kết hợp.

c) *Quản lí và thu hoạch*

- Bể được sục khí liên tục trong suốt quá trình nuôi, chiếu sáng trực tiếp bằng ánh sáng mặt trời ; nhiệt độ dao động từ 28-30°C, hàng ngày kiểm tra nhiệt độ, độ mặn, pH của môi trường nuôi và định lượng tảo vào những giờ nhất định. Khi tảo đạt mật độ cao (hàng chục vạn tế bào/ml) thì tiến hành thu tảo. Dùng lưới vớt phù du thực vật N°65 để lấy tảo làm thức ăn nuôi ấu trùng tôm.

Split Unregistered Version - http://www.simpopdf.com

- Để hạn chế nguy cơ gây nhiễm cho ấu thể tôm, tảo cần được xử lí trước khi đưa vào bể nuôi. Chú ý không để tảo bị chết sẽ mất tác dụng dinh dưỡng. Thông thường người ta xử lí đơn giản bằng việc rửa tảo qua nước ngọt đã thanh trùng.

- Trong trường hợp cơ sở nuôi ấu thể không đủ điều kiện nuôi vi tảo tươi thì có thể sử dụng sinh khối tảo khô từ những nguồn cung cấp đáng tin cậy.

Bằng những phương thức như đã nêu trên đây, tảo *Chlorella, Spirulina, Dunaliella. Skeletonema* đã được nuôi trồng và sử dụng ở nhiều cơ sở nuôi thủy hải sản ở Việt Nam.

Cũng cần phải nói thêm là vi tảo không chỉ là nguồn thức ăn quan trọng của nhiều loại ấu thể thuỷ sản, mà sự hiện diện của vi tảo trong các ao nuôi thuỷ sản còn làm cải thiện đáng kể chất lượng nước của ao nuôi, do chúng hấp thu nguồn nitơ dư thừa, nhả oxi thông qua quá trình quang hợp. Mặt khác vi tảo cũng là nguồn thức ăn cho cả các thủy hải sản đã trưởng thành. Đồng thời chúng còn có khả năng ức chế sự phát triển của các loại tảo dại, ức chế sự phát triển của vi khuẩn (chất chlorellin tiết ra bởi tảo *Chlorella*).

BẢNG 10.1. CÁC LỚP VÀ CHI VI TẢO LÀM THỨC ĂN CHO ĐỘNG VẬT TRONG CHĂN NUÔI THUỶ SẢN

(Theo Đặng Đình Kim, 1999)

Lớp	Chi	Đối tượng dùng vi tảo
Bacillariophiceae	*Skeletonema*	PL, PL, BP
	Thalassiosira	PL, PL, BP
	Phaeodactilum	PL, BL, BP, ML, BS
	Chaetoceros	PL, BP, BL, BS
	Nitzschia	BS
	Cyclotella	BS
Haptophiceae	*Isochirysis*	PL, BL, BP, ML, BS
	Pseudoisochrysis	BL, BP, ML
	Dicrateria	BP
	Coccolithus	BP
Prasinophiceae	*Tetraselmis*	PL, BL, BP, AL, BS, MR
	Pyraminonas	BL, BP
Chrysophiceae	*Monochrysis*	BL, BP, BS, MR

Split Unregistered Version - http://www.simpopdf.com

Lớp	Chi	Đối tượng dùng vi tảo
Cryotophiceae	*Chroomonas*	BP
	Cryptomonas	BL, BP
Xanthophiceae	*Olisthodiscus*	BP
Chlorophiceae	*Carteria*	BP
	Chlorococcum	BP
	Brachiomonas	BP
	Dunaliella	BP, BS, MR
	Chlamydomonas	BP, BS, MR
	Chlorella	BL, BP, FZ, MR, BS
	Scenedesmus	BL, ML, BS, MR, FZ
Cyanobacteria	*Spirulina*	FZ, MR, BS, PL, PP, BS, MR

Trong đó : PL - Ấu thể tôm ; BL - Ấu thể thân mềm hai mảnh vỏ ; ML - Ấu thể tôm nước ngọt ; BP - Hậu ấu thể thân mềm hai mảnh vỏ ; AL - Ấu thể bào ngư ; MR - Luân trùng ; BS - Artemia ; FZ - Phù du động vật nước ngọt.

Các loài vi tảo nêu trên có kích thước cỡ từ vài µm đến hơn 100µm. Đa số là các loài nước mặn. Có thể liệt kê một số loài chính như sau :

Skeletonema costatum ; Thallassiosira pseudonana ; Phaeodactilum tricornutum ; Chaetoceros cancitrans ; Isochirysis galbana ; Isochirysis tahiti ; Monochrysis lutheri ; Dunaliella spp *; Chlorella* spp.

Một số loài nước ngọt : *Chlorella* sp. *; Scenedesmus* sp. *; Chlamydomonas* sp. *; Spirulina* sp.

Đa số các vi tảo được sản xuất làm thức ăn tươi sống.

1.3. Vi khuẩn và chất lượng nước ao nuôi

Quá trình nuôi thủy sản sẽ dẫn đến sự tích tụ nhiều chất hữu cơ trong ao nuôi và đây là nguyên nhân gây ô nhiễm cho các thủy vực. Sự phân giải các chất hữu cơ dư thừa này sẽ làm cho nồng độ NH_4^+, NO_3^- vượt quá mức chịu đựng của thủy sản. Chẳng hạn nồng độ NH_4^+ cao hơn 1mg/l sẽ làm cho cá bị chết. Để giải quyết tình trạng này, người ta đã sử dụng các loại vi khuẩn đã được chọn lọc, có tác dụng thúc đẩy nhanh quá trình vô cơ hóa các chất hữu cơ, tạo ra môi trường thuận lợi cho sự phát triển của vi tảo trong các ao nuôi, và vì thế nước thải ra từ các ao nuôi sẽ

Split Unregistered Version - http://www.simpopdf.com
đáp ứng được các tiêu chuẩn về môi trường. Đã có nhiều loại chế phẩm chứa các vi khuẩn có khả năng làm sạch môi trường ao nuôi xuất hiện trên thị trường thế giới và cả trong nước.

II - VI SINH HỌC ỨNG DỤNG TRONG PHÒNG TRỪ DỊCH HẠI THUỶ SẢN

Trong những năm gần đây, diện tích nuôi trồng thủy sản ở nước ta tăng lên nhanh chóng. Cùng với những thành tựu về năng suất và sản lượng thủy sản đã nảy sinh hàng loạt các tai biến về dịch bệnh của tôm cá, chất lượng môi trường nuôi thủy sản bị suy giảm một cách nghiêm trọng. Sự thiếu hiểu biết những điều cơ bản về nguồn gốc gây ra bệnh dịch cũng như quá trình chuyển hóa vật chất trong các ao nuôi đã dẫn đến thiệt hại hết sức to lớn ở các vùng nuôi trồng thủy sản tập trung. Cho đến nay vẫn chưa có giải pháp hữu hiệu khắc phục tình trạng trên. Tuy nhiên, việc hiểu biết điều kiện và nguyên nhân gây bệnh cho thủy sản, gây ô nhiễm môi trường nuôi trồng và chế biến là tiền đề cần thiết để có thể phòng ngừa các tai biến và hạn chế các thiệt hại này.

2.1. Một số bệnh do vi sinh vật

2.1.1. Bệnh do virus

- Bệnh do virus làm cho tôm nuôi chết rất nhiều. Bệnh được phát hiện đầu tiên vào giữa năm 1960, lúc đó khoa học chưa biết đầy đủ về đặc tính của nó. Hiện nay đã nhận biết được 12 loại virus gây bệnh cho tôm he, tôm sú, trong đó có 6 loại virus nguy hiểm. Bệnh virus chưa chữa trị được, việc chẩn đoán bệnh cũng rất đắt tiền, phòng ngừa là chủ yếu.

- Hiện nay bệnh truyền nhiễm do nhóm virus MBV (Monodon Baculo Virus), YHV (Yellow Head Virus), WSSV (White Spot Syndrom Virus) được xem là những tác nhân gây bệnh đáng được quan tâm nhất và làm ảnh hưởng đến sản lượng tôm nuôi hàng năm.

+ MBV được xem là tác nhân gây bệnh làm ảnh hưởng đến năng suất thu hoạch tôm ở Úc và nhiều nước khác.

Trước đây việc chẩn đoán với MBV thường dựa vào sự hiện diện của thể ẩn nhập trong tế bào gan tụy của tôm bị nhiễm bệnh. Hiện nay phương pháp PCR đã được sử dụng để phát hiện tác nhân gây bệnh này.

+ Virus gây bệnh đầu vàng (YHV) đã gây thiệt hại hơn 40 triệu USD trên tôm nuôi ở Thái Lan năm 1992.

Split Unregistered Version - http://www.simpopdf.com

+ Virus gây bệnh đốm trắng ở tôm nuôi (WSSV) tại Thái Lan năm 1997 đã làm thiệt khoảng 500 triệu USD. Bệnh còn xảy ra ở khắp các nước trên thế giới và ảnh hưởng tới nghề nuôi tôm công nghiệp.

+ Hội chứng đốm trắng còn có thể do một số loại virus khác như : VSBV, PRDV HHNBV, SEMBV hoặc WSV. Các virus này rất giống nhau về hình thái và cấu trúc gen. Ở khu vực Đông Nam Á, bệnh đốm trắng được xem là nguy hiểm nhất. Nó có thể nhiễm vào tôm nuôi từ giai đoạn ấu thể. Vì vậy, các biện pháp chọn lựa con giống không mang mầm bệnh đã góp phần làm hạn chế dịch bệnh.

2.1.2. Bệnh do vi khuẩn (Bacteria)

Bệnh do vi khuẩn gây ra rất khác nhau, thường không phải chỉ do 1 loại vi khuẩn mà kết hợp với loại vi khuẩn khác.

- Nhóm vi khuẩn không rõ gram âm hay dương, dạng que, thuộc chi *Vibrio*, cũng thường kết hợp với các loại vi khuẩn gây bệnh khác. Bệnh dễ bùng nổ khi nuôi tôm với mật độ dày, có thể gây chết 100% (theo Lightner, 1983). Khi môi trường sống không thuận lợi, bệnh dễ bùng phát. Một số hoá chất và thuốc dùng để chữa bệnh : EDTA, Furanace, Furazolidone, Erythromycine, Tetramycin và Chloramphenicol.

- Bệnh *Filamentous bacteria* : Bệnh này thường gặp ở các giai đoạn ấu thể của tôm, các sợi nấm bám đầy trên bề mặt cơ thể, làm cho ấu thể khó bơi, ăn yếu và xuất hiện các loại bệnh khác như hoại tử (necrosis). Nếu phát hiện sớm thì chữa trị sẽ có hiệu quả. Trị bệnh bằng $CuSO_4$ với nồng độ 0,15 - 0,25ppm trong 24 giờ.

- Bệnh hoại tử (*necrosis*) :

Có hai dạng : dạng ăn mòn các phần phụ và dạng làm chết các phần phụ. Trong 2 dạng, dạng thứ hai khó chữa hơn. Thường sử dụng Chloramphenicol 10 - 20ppm, Oxitetracylin 5 - 10ppm, hay Furazon 2 -3ppm, trị liên tiếp 3 ngày sẽ khỏi. Nếu phát hiện chậm, tỉ lệ sống của ấu thể (PL_{15}) sẽ thấp.

- Bệnh lột xác dính vỏ (*exuvia entrapment*) :

Bệnh xảy ra thường ở giai đoạn ấu thể (PL), khi lột xác, một phần vỏ dính lại trên các phần phụ như chân ngực, chân bụng, làm tôm khó hoạt động. Nguyên nhân gây bệnh là do hàm lượng NH_4 trong ao nuôi cao, từ 0,01ppm trở lên. Theo tài liệu của Bộ Thuỷ sản, khi bị bệnh này, sử dụng

Split Unregistered Version - http://www.simpopdf.com
10 - 20ppm Formaline, sau đó tăng cường thay nước, tăng thức ăn, bệnh sẽ khỏi.

2.1.3. Bệnh do nấm (Fungi)

Bệnh do nấm thường gặp trên tôm nuôi, trứng cá và cá đã trưởng thành. Sự lây nhiễm do trên cơ thể vật nuôi bị tổn thương và sốc do môi trường. Bệnh có thể là nguyên nhân gây chết nhiều tôm, đặc biệt là trong các trại sản xuất giống. Ở đâu có bệnh nấm (larval mycosis) là ở đó có tôm chết nhiều. Hai loại nấm thường gặp là nấm *Lagenidium callinectes* và *Sirolpidium*.sp, có thể gây chết tới 100% trong 1 - 2 ngày sau khi bị nhiễm. Thực hiện phòng 2 loại nấm này bằng cách sử dụng Treflan và Malachite green.

BẢNG 10.2. CÁCH SỬ DỤNG TREFLAN PHÒNG NẤM

Giai đoạn	Nồng độ (ppm)	Lần cho/ngày
Nauplius	0,01	2
Zoea	0,03	2
Mysis	0,06	2
PL_1 - PL_4	0,08	2
PL_5 trở đi	1	2

Ghi chú : lấy 10ml Treflan 44% (Trifluralin, Elanco) pha trong 1 lít nước cất. Lấy 1ml dung dịch pha với 999ml nước cất sẽ có nồng độ 0,001 ppm, bảo quản trong tủ lạnh và kị ánh sáng.

- Bệnh nấm thuỷ mi : hình thành những sợi nấm nhỏ, mềm, phát sinh trên da ba ba, tôm, mang cá. Sau vài ngày bị bệnh, sợi nấm phát triển thành búi trắng như bông, nhìn thấy rõ bằng mắt thường. Bệnh do một số loài của 2 chi *Saprolegnia* (nấm thuỷ mi) và *Achlia*. Nấm có hình sợi phân nhánh, giữa các tế bào không có vách ngăn, đường kính sợi nấm từ 0,02 - 0,05mm, dài 1 - 3mm. Sợi hình thành nên các bào tử và được lan truyền rất nhanh. Bệnh thường phát sinh trong các thủy vực mật độ nuôi cá quá nhiều, nước bẩn, nhiệt độ nước từ 18 - 25^{0}C.

Để phòng bệnh, cần vét bùn tẩy trùng ao nuôi, bón vôi định kì, chăm sóc, quản lí tốt đối tượng nuôi.

Trị bệnh bằng cách dùng dung dịch xanh metilen nồng độ 1 - 4ppm (1 - 4mg/1 lít nước) tắm cho động vật, thời gian 15 - 30 phút. Với ba ba, ếch, sau khi tắm, để ở trên cạn cho ráo nước từ 30 - 60 phút.

Split Unregistered Version - http://www.simpopdf.com

2.2. Vi tảo gây độc *(Harmful algae)* trong thuỷ vực

- Trong thuỷ vực nước ngọt hoặc nước lợ dùng để nuôi thuỷ sản, bên cạnh những đóng góp tích cực của vi tảo còn có một ít loài có thể gây hại đối với thủy vực. Trong quá trình sinh trưởng và phát triển, khi chúng gặp điều kiện thuận sẽ phát triển rất nhanh, đồng thời tiết ra độc tố (toxin) vào môi trường. Những độc tố này không chỉ gây hại cho cá, động vật nuôi, động vật hoang dã mà cho cả con người khi tiêu thụ thủy sản bị nhiễm độc, uống phải hay tiếp xúc với nguồn nước nhiễm tảo độc. Nguyên nhân là do một số thuỷ sản đã tích luỹ vào cơ thể độc tố của tảo và gây ngộ độc cho người ăn phải những thuỷ sản này. Các loài tảo gây độc *(Harmful microalgae)* trong điều kiện thuận lợi thường phát triển với sinh khối lớn, gây hiện tượng nước có màu, gọi là sự nở hoa của nước (water bloom) tại các thuỷ vực nước ngọt, hoặc hiện tượng thuỷ triều đỏ (red tide) ngoài biển khơi. Hiện tượng thuỷ triều đỏ gây chết cá trên một vùng rộng lớn và làm nhiễm độc cho thủy sản ven biển nhiều nước trên thế giới.

- Ngoài việc gây độc, nguồn nước nơi tảo phát triển thường có màu và có mùi tanh rất khó chịu, hàm lượng oxi bị giảm xuống đột ngột, ảnh hưởng đến chất lượng nước. Vì vậy, việc giám sát, quản lí sự phát triển của tảo độc trong các hồ chứa và các dòng chảy cung cấp nước sinh hoạt cho cộng đồng cần được đặc biệt quan tâm.

- Tảo độc hại là những loài vi tảo thuộc các ngành tảo khác nhau, song ở nước ngọt chủ yếu là vi khuẩn lam *(Cyanobacteria)* và ở biển chủ yếu là tảo hai rãnh hay còn gọi là tảo giáp *(Dinoflagellata)*, tảo silic *(Diatoms)* và tảo có vật bám *(Haptophita)*, sống trôi nổi hoặc sống bám ở đáy hay bám lên các sinh vật sống dưới đáy như san hô, rong biển. Khi đạt đến mật độ nhất định, chúng sẽ gây hại cho các sinh vật khác. Hallegraef (1993) phân loại tảo gây hại thành bốn nhóm chính :

+ Những loài tảo không độc (*Skeletonema costatum, Trichodesmium erythraeum, Heterocapsca triquatra*), nhưng khi phát triển quá mức làm nước đổi màu, giảm độ trong, giảm hàm lượng oxi trong nước, khiến cá và động vật không xương sống ở trong thủy vực bị chết.

+ Những loài tảo không độc đối với người nhưng gây hại cho một số loài động vật thuỷ sinh qua việc làm tắc nghẽn cơ quan hô hấp của chúng, như *Chaetoceros comolutus, Heterosigma akashowo.*

+ Những loài tảo tiết ra độc tố và độc tố này lại được tích luỹ qua chuỗi thức ăn, gây nên các bệnh khác nhau cho người và động vật bậc

nd Split Unregistered Version - http://www.simpopdf.com
cao, như *Alexandrium tamarense, Dinophisis fortii, D. acuminata, Pseudonitzschia australis, Nodularia spumigena, Anabaena flosaquae...*

+ Những loài tảo độc được gió hoặc nước biển mang theo vào bờ và gây hại cho sức khoẻ con người như *Gyrodinium breve, Phiesteria piresteria...*

- Trong thực tế, có một số loài gây hại ngay cả khi số lượng tế bào nhỏ (10^3 tế bào/lít), không hề làm thay đổi màu nước như *Alexandrium tamarense*, gây nhiễm độc cho các loài thân mềm. Trong khi đó, một số loài tảo như *Gyrodinium arueulum* chỉ có thể gây hại khi phát triển với khối lượng tế bào rất lớn (10^7 tế bào/lít), làm thay đổi màu nước (water bloom), làm chết cá và các loài động vật đáy.

- Trong vài chục năm gần đây, khoa học phát hiện ngày càng nhiều sự có mặt phổ biến của các loài tảo gây hại trong các thuỷ vực nước ngọt, nước lợ và nước biển ở quy mô toàn cầu :

+ Tại Úc, hơn 1000km sông Darling bị che phủ kín bởi một loài vi khuẩn lam thuộc chi *Anabaena*. Độc tố do loài VKL này sản ra đã giết chết hơn 10.000 động vật nuôi và gây ra tình trạng nguy hiểm đối với người dân sống gần nguồn nước tại khu vực này.

+ Tại New Zealand trong những năm 1992-1993, người ta đã quan sát thấy hiện tượng cá bị nhiễm độc hàng loạt cùng với sự nở hoa của 14 loài tảo do ảnh hưởng của El-nino, kéo theo người bị ngộ độc do ăn cá. Những độc tố trong các loài tảo phát hiện được ở New Zealand chủ yếu là độc tố gây hại thần kinh, độc tố gây tê liệt, độc tố gây tiêu chảy.

+ Từ 1968, hàng năm ở Anh người ta đều phát hiện có độc tố do tảo *Alexandrium tamarense* sinh ra. Tảo này là nguyên nhân nhiễm độc sò xanh (*Mytilus edulis)* và từ đó gây độc cho người (78 trường hợp ngộ độc vào năm 1968).

+ Tại Brazil, người ta thường thấy hiện tượng cá chết hàng loạt xảy ra dọc 350km bờ biển, do sự nở hoa của một số loài tảo như *Gymnodinium* sp, *Dinophisis acumilata, Nosticula sintillan.*

+ Ở Philippin, thuỷ triều đỏ do loại tảo *Pyrodinium bahamense var compressum* đã gây ra nhiều hậu quả tai hại. Cho đến năm 1995, có tới 1422 trường hợp ngộ độc trong đó có 82 trường hợp tử vong do ăn cá bị nhiễm độc tảo này.

Split Unregistered Version - http://www.simpopdf.com

+ Ở Hàn Quốc, sự nở hoa của loài tảo Gymnodinium sp. xảy ra tại Chungmu và vùng biển phía nam Hàn Quốc vào cuối tháng 8/1992, kéo dài trong vài tuần, là nguyên nhân gây chết hàng loạt cá nuôi.

- Nhìn chung những chất độc do các loài tảo tiết ra đều gọi là độc tố tảo (phicotoxin), song chúng lại có cấu trúc hóa học khác nhau và gây hại khác nhau. Trong sinh học, độc tố được coi là sản phẩm trao đổi chất thứ cấp, không cần thiết cho cơ thể sống, tạo ra bởi cơ thể sống trong quá trình sinh trưởng và phát triển. Tuy nhiên đây cũng được coi là hình thức tự bảo vệ của tảo độc đối với những sinh vật ăn cỏ, ăn tảo.

- Bản chất hóa học của độc tố do vi tảo rất khác nhau : chúng có thể là peptit, alcaloit và cả các đồng phân của axit amin kích độc.

Những độc tố tảo (phicotoxin) thuộc về 3 nhóm chính : độc tố gan (hepatotoxin), độc tố thần kinh (neurotoxin) và nhóm độc tố gây ngứa da và tiêu chảy (dermatotoxin, gastrointestinal toxin).

+ Nhóm độc tố gan (hepatotoxin) :

Nhóm độc tố tác động tới gan có cấu trúc peptit mạch vòng bao gồm : Microcystin và Nodularin, do vi khuẩn lam sống trong nước ngọt tiết ra.

Microcystin có hoạt tính sinh học kìm hãm protein phosphatse 1 và 2A, gây ra sự co thắt của các tế bào điều khiển sự lưu thông máu trong gan và gây ra xuất huyết. Microcystin xâm nhập vào các tế bào nhờ axit mật. Microcystin kích thích tạo khối u, gây ung thư da và gan, gây quái thai ở động vật thí nghiệm. Nodularin có thể là chất gây ung thư.

+ Nhóm độc tố thần kinh (Neurotoxin) :

Nhóm độc tố thần kinh bao gồm :

• Độc tố gây liệt cơ PSP (Paralitic Shellfish Poison) thường gặp ở tảo *Alexandrium, Gymnodinium catenatum, Pyrodinium* thuộc ngành tảo hai rãnh hay tảo giáp. Độc tố dạng này thường được tích lũy trong các động vật hai mảnh vỏ (vẹm, trai, hàu, điệp...).

• Độc tố gây mất trí nhớ ASP (Amnetic Shellfish Poison) thường do các loại thuộc tảo silic gây ra như *Amphora, Pseu.nitzschia*. Các triệu chứng nhiễm độc thường là : đau vùng bụng, nôn mửa, đau đầu, tiếp theo là hiện tượng lẫn lộn, mất trí nhớ, áp suất máu không ổn định, mất định hướng và gây hôn mê, xuất hiện sau 24 giờ khi ăn phải hải sản nhiễm độc ASP. Độc tố gây ra các triệu chứng trên là axit domoic.

Split Unregistered Version - http://www.simpopdf.com

• Độc tố gây rối loạn thần kinh NSP (Neurotoxin Shellfish Poison) do tảo giáp *Gynmnodinium* sp. gây ra.

+ Nhóm độc tố gây tiêu chảy DSP (Diarrhetic Shellfish Poison) do vi tảo biển *Prorocentrum* và *Dinophisis* tiết ra. Ocadaic axit (OA) là thành phần chiếm ưu thế trong DSP, gây tiêu chảy, buồn nôn, đau bụng, lạnh.

Để đấu tranh chống hiện tượng nở hoa của nước và thủy triều đỏ, người ta thường dùng sunphat đồng ($CuSO_4$) với nồng độ 0,01%. Trong khoa học hiện nay, hướng nghiên cứu dùng VSV để phân giải các độc tố vi tảo đang được quan tâm và đã bắt đầu triển khai, mặt khác, có thể sử dụng sinh khối của các tảo độc để điều chế biệt dược.

III - VI SINH VẬT TRONG CHẾ BIẾN, BẢO QUẢN THỦY SẢN

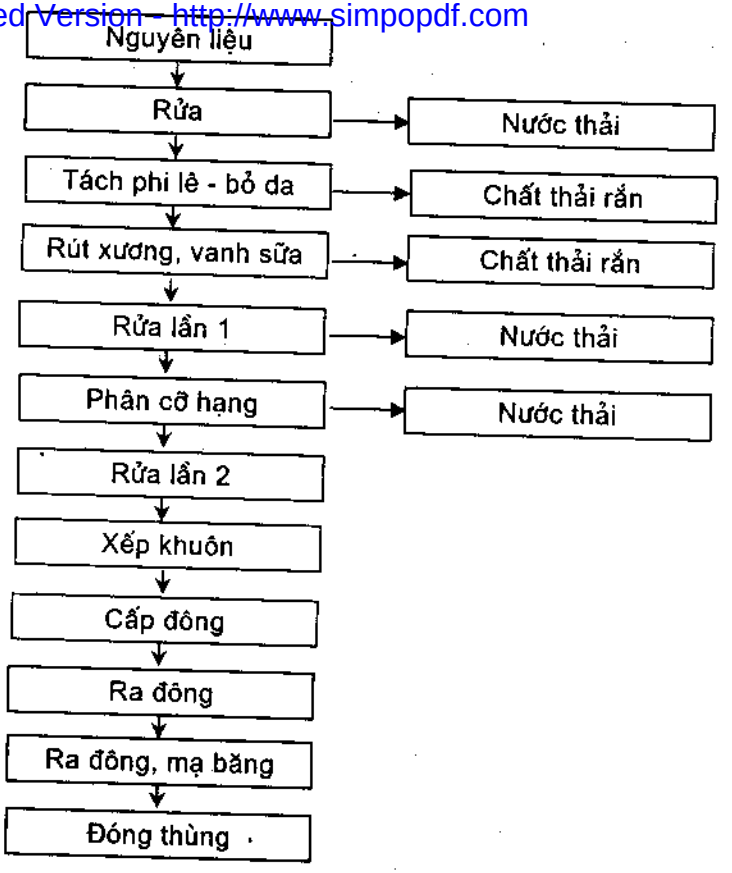
3.1. Chế biến, bảo quản thủy sản ở nước ta

Chế biến thủy sản là một trong những ngành kinh tế trọng điểm của nước ta. Mặt hàng thủy sản là một trong những mặt hàng xuất khẩu đem lại ngoại tệ đứng hàng thứ ba sau dầu mỏ và lúa gạo. Với nguồn thủy hải sản dồi dào, người dân nước ta có thói quen sử dụng sản phẩm tươi được mua tại các chợ và không qua giai đoạn sơ chế nào, do vậy các sản phẩm thủy hải sản sau chế biến chủ yếu được xuất khẩu sang các nước Singapo, Malaixia, Nhật, Pháp, Mỹ. Hiện nay do việc đầu tư các thiết bị hiện đại còn hạn chế, nên các sản phẩm chưa tìm được nhiều thị trường ở các nước châu Âu, đây cũng là khó khăn trong quá trình tìm kiếm và thâm nhập các thị trường lớn. Không những thế, quy trình công nghệ chế biến thủy sản lạc hậu đã ảnh hưởng đến chất lượng sản phẩm thủy sản, mặt khác là nguyên nhân gây ô nhiễm môi trường, nhất là ô nhiễm do mùi hôi, nước thải và chất thải rắn. Mọi công đoạn trong chế biến thủy sản đều liên quan tới các hoạt động của VSV. Hiện nay, có rất nhiều các cơ sở chế biến thủy sản bị xếp vào loại gây ô nhiễm môi trường nghiêm trọng. Nước thải chế biến thủy sản chủ yếu bị ô nhiễm hữu cơ, BOD_5 = 350-2000mg/l, COD = 400-2000mg/l, $N\text{-}NH_3$ = 25-300mg/l.

3.2. Quy trình chế biến thủy sản

Để hiểu rõ vai trò của VSV trong chế biến thủy sản, cần xem xét một số quy trình chế biến thủy sản điển hình : cá phi lê, cá nguyên con, tôm bóc vỏ, mực, bạch tuộc cắt khúc.

Split Unregistered Version - http://www.simpopdf.com



***Hình 10.1.** Sơ đồ quy trình sản xuất cá phi lê*

(Nguồn : Dương Đức Tiến)

Từ quy trình chế biến cá philê ở trên cho thấy : Mọi công đoạn đều nhằm ức chế và loại trừ các hoạt động phân huỷ chuyển hoá của VSV làm hư hỏng sản phẩm.

Tuỳ từng loại thuỷ hải sản khác nhau mà đưa ra quy trình khác nhau, có những sản phẩm người ta còn bổ sung chủng, giống VSV chống thối vào công đoạn chế biến để tạo ra sản phẩm trong quá trình lên men. Ví dụ : Sản xuất nước mắm ; sản xuất cá hộp...

HƯỚNG DẪN ÔN TẬP

1. VSV ứng dụng trong sản xuất giống thuỷ sản.
2. VSV và chất lượng nước nuôi trồng thuỷ sản.
3. VSV trong phòng chống bệnh thuỷ sản.
4. VSV trong chế biến thuỷ sản.

Split Unregistered Version - http://www.simpopdf.com

Chương 11

HỆ VI SINH VẬT THỰC PHẨM VÀ CÁC SẢN PHẨM THỰC PHẨM

I - KHÁI NIỆM

1.1. Thế nào là thực phẩm

Thực phẩm là những chất cần thiết mà chúng ta có thể nuốt và tiêu hoá được, để cung cấp các thành phần dinh dưỡng cho sự nuôi dưỡng và sự sinh trưởng phát triển của cơ thể.

Thực phẩm bao gồm rất nhiều loại và tồn tại dưới rất nhiều dạng khác nhau như : nước, sữa, thịt, rau, quả... Thực phẩm cũng có thể bao gồm tất cả các vật thể sống khác nhau, hoặc nó là kết quả của sự biến đổi các dạng thực phẩm khác. Như thịt là một thành phần chết của loại động vật nào đó mà thường phải làm lạnh và nấu chín trước khi ăn. Hay sữa phải qua thanh trùng Pasteur hay tiệt trùng... và phomat thì được chế biến từ sữa... và tất cả những sản phẩm như thịt chín, da, phomat, bánh mì, đồ hộp... đều là thực phẩm đã được chế biến từ nguyên liệu ban đầu.

1.2. Thế nào là chế biến thực phẩm

Chế biến thực phẩm là sự làm biến đổi mùi vị, biến đổi tính chất vật lí, hoá học của thực phẩm nhằm mục đích dễ tiêu hoá và dễ bảo quản hơn, vì thực phẩm chính là môi trường tuyệt vời cho các loại VSV tồn tại, sinh trưởng và phát triển.

Trong thực tế, hai mục đích này luôn gắn bó qua lại và mật thiết với nhau, đồng thời nó gắn liền với các hiện tượng xã hội (như nền văn minh hiện đại hay lạc hậu...), gắn liền với trình độ khoa học kĩ thuật, thói quen chế biến thức ăn, phong tục tập quán xã hội và hoàn cảnh kinh tế của mỗi nơi, mỗi vùng, mỗi dân tộc, mỗi quốc gia...

1.3. Mục đích của chế biến và bảo quản thực phẩm về phương diện vi sinh vật

Hoặc là để ngăn cản sự sinh trưởng và phát triển của các VSV có hại, hoặc là để thúc đẩy sự phát triển, sinh trưởng của các VSV có lợi cho tính chất dinh dưỡng các loại thực phẩm khác nhau.

Trong thực tế, có rất nhiều các biện pháp khác nhau để ngăn cản sự phát triển của VSV gây hư hỏng thực phẩm như bảo quản bằng nhiệt độ cao (nấu

Split Unregistered Version - http://www.simpopdf.com
chín, thanh trùng...), bằng nhiệt độ thấp (bảo quản lạnh, bảo quản lạnh đông), hoặc bảo quản bằng hoá chất (muối, đường, chất bảo quản...). Đồng thời cũng có rất nhiều phương pháp để thúc đẩy sự phát triển của VSV có lợi, và sử dụng chúng làm tác nhân cho các quá trình chế biến thực phẩm như các sản phẩm của công nghệ lên men, sản phẩm sữa (sữa chua, kem chua), sản phẩm thịt, cá (thịt muối, cá khô, nước mắm..).

1.4. Nguồn gốc của hệ vi sinh vật thực phẩm

Qua nghiên cứu, người ta thấy hệ VSV thực phẩm có nguồn gốc phát sinh từ nhiều nguồn khác nhau :

- Thực phẩm bị nhiễm VSV từ bên ngoài môi trường, từ tay người sản xuất, từ dụng cụ và quá trình chuyên chở v.v...

- Thực phẩm chứa VSV từ bản thân nguyên liệu như sữa chua, phomat, xúc xích.

- VSV có sẵn trong thực phẩm, được sản xuất từ các loại động vật, thực vật bị bệnh.

Các loại thực phẩm là những sản phẩm có chứa nhiều nước, nhiều chất dinh dưỡng, đặc biệt là protein, đó là môi trường rất tốt cho sự phát triển của VSV. Mỗi loại thực phẩm thường có một hệ VSV riêng và hoạt động của chúng sẽ gây ra những biến đổi sinh hoá trong thực phẩm. Việc nghiên cứu hệ VSV của thực phẩm và những biến đổi sinh hoá do chúng gây ra, nhằm lợi dụng triệt để nhất những biến đổi có lợi và đề ra phương pháp bảo quản, làm cho thực phẩm giữ được chất lượng và bị hao hụt ít nhất về số lượng, chất lượng.

II - HỆ VI SINH VẬT RAU, QUẢ VÀ CÁC SẢN PHẨM RAU, QUẢ

2.1. Các quá trình sinh hoá xảy ra trong bảo quản rau, quả

- Rau, quả, nhất là rau chiếm một phần khá lớn trong khẩu phần thực phẩm của con người. Trong rau, quả thường chứa các chất dinh dưỡng như gluxit, axit hữu cơ, vitamin, chất khoáng và một ít protein. Thịt quả và rau có nhiều dịch bào, là một dung dịch nước có nhiều thức ăn rất hợp cho VSV sinh sống và phát triển. Hàm lượng nước trong rau quả là 90-95%, quả và rau tươi vừa hái, trong một thời gian dài vẫn giữ khả năng sống, trong đó vẫn xảy ra những quá trình sinh lí đặc trưng của cơ thể thực vật. Tuy nhiên, khác với cây đang sinh trưởng, trong rau và quả đã hái xảy ra quá trình dị hoá (hô hấp) chín và bay hơi nước. Tuỳ nguồn gốc

Split Unregistered Version - http://www.simpopdf.com

và đặc tính từng loại rau, quả mà những quá trình đó xảy ra với cường độ khác nhau. Các quá trình sinh lí càng tiến hành chậm thì rau, quả càng giữ được lâu, ít bị biến đổi, ta gọi đó là "Chúng có khả năng tồn tại cao trong bảo quản". Ngược lại các quá trình càng tiến hành mạnh thì rau, quả càng bị biến đổi sâu sắc và bất thuận nghịch, ta gọi đó là "Quá trình già". Trong quá trình già, khả năng tồn tại của rau, quả giảm dần, hình thức xấu đi, các mô mất hết tính chất đàn hồi và trở nên mềm nhũn, lúc này rau, quả mất giá trị dinh dưỡng, mất mùi vị, đồng thời trên đó có rất nhiều VSV phát triển. Vì vậy, việc bảo quản rau, quả tươi là tạo nên những điều kiện tốt nhất để làm giảm quá trình già như hạ thấp nhiệt độ, độ ẩm, che tối cho kho bảo quản v.v...

- Rau, quả tươi có khả năng chống lại bệnh nhiễm trùng, tính không bị cảm thụ (miễn dịch) là do nhiều nguyên nhân, nhưng nguyên nhân thường thấy là dịch bào của nhiều rau, quả có độ axit tương đối cao, các chất tamin, glucozit, tinh dầu... có khả năng kìm hãm hoặc làm chết VSV, những chất này có thể có trong các tế bào thịt quả, nhưng chủ yếu là ở vỏ quả và ở phần bề mặt của rau, ngoài ra vỏ rau, quả còn có cấu tạo đặc biệt để bảo vệ các phần bên trong. Vì vậy, vỏ có tác dụng chủ yếu chống lại các bệnh nhiễm trùng, vì các chất kháng sinh, glucozit, tinh dầu... tập trung hầu hết ở vỏ và gần vỏ.

Bảng sau đây cho ta thấy, khi thêm dịch bào ép từ vỏ quả vào môi trường dinh dưỡng thì làm ức chế sự phát triển của nấm mốc, còn cho dịch bào ép từ rau, quả và thịt thì lại kích thích sự phát triển của nấm mốc :

BẢNG 11.1. TÁC DỤNG CỦA DỊCH ÉP TỪ VỎ QUẢ ĐẾN SỰ PHÁT TRIỂN CỦA NẤM MỐC

Loại quả	Loài nấm mốc	Khối lượng khô của nấm mốc (g/lít dịch nước chiết)		
		1	2	3
Quýt	*Penicillium itali*	0,196	0,095	0,641
Lê	*Penicillium glaucum*	0,199	0,111	0,591
Táo	*Penicillium glaucum*	0,746	0,434	1,262

Trong đó : Công thức thí nghiệm :

1. Dịch ép quả bỏ vỏ ngoài ;
2. Dịch ép quả không bỏ vỏ ;
3. Dịch ép quả bổ sung 25ml nước thịt.

Split Unregistered Version - http://www.simpopdf.com

2.2. Hệ vi sinh vật rau, quả

Trên bề mặt rau quả luôn tồn tại một lượng lớn các VSV khác nhau. Trong số này có một phần lớn các VSV không hoạt động, không tham gia các quá trình làm hư hỏng rau, quả. Ở những quả hoàn toàn lành lặn thì trên bề mặt quả rất ít chất dinh dưỡng, vì vậy chỉ có một hệ VSV có thể tồn tại và sinh sản trên vỏ quả, ta gọi đó là hệ VSV trên bề mặt, hoặc bám vào rau, quả.

2.2.1. Nguồn gốc của hệ vi sinh vật rau, quả

VSV vào rau, quả do nhiều nguyên nhân như do bụi đem VSV bám vào bề mặt rau, quả ; do chim và các loại côn trùng đem lại; do hạt giống bị nhiễm bệnh, khi hạt nảy mầm VSV sẽ tồn tại và phát triển cùng sự phát triển của cây và do con người đem lại trong quá trình thu, hái, vận chuyển, chế biến thực phẩm.

2.2.2. Số lượng và thành phần các loài vi sinh vật rau, quả

Số lượng và thành phần của hệ VSV rau, quả thay đổi liên tục tuỳ theo loại rau, quả, điều kiện địa lí, khí hậu, trạng thái sinh lí của rau, quả. Đại diện đặc trưng nhất của hệ VSV trên bề mặt rau, quả là nấm men, vi khuẩn axetic, vi khuẩn lactic và các bào tử của nấm mốc... Ở những vỏ quả bị giập nát, dịch bào chảy ra là môi trường rất tốt cho VSV, vì vậy thành phần loài và số lượng của hệ VSV mọc bám tăng lên rất nhiều. Quả giập nát cũng là nguyên nhân làm quả nhiễm VSV gây bệnh và VSV làm hư hỏng quả. Một số quả có thể nhiễm VSV gây bệnh cho người, như vi khuẩn thương hàn, vi khuẩn tả, vi khuẩn lị... Trên bề mặt rau, quả, ta thấy có đủ các loài VSV với số lượng từ vài trăm đến hàng triệu tế bào.

2.2.3. Các dạng hư hỏng của rau, quả do vi sinh vật gây nên

VSV là một trong những nguyên nhân quan trọng làm tổn thất thành phần dinh dưỡng và gây nên sự hư hỏng rau, quả trong thời gian bảo quản. Thường tồn tại 3 dạng hư hỏng rau, quả dưới tác dụng của các loài VSV khác nhau. Nhưng thông thường, sự phân huỷ rau, quả là do hỗn hợp nhiều VSV khác nhau và theo cả chuỗi phản ứng tiếp nối liên tục.

a) *Do nấm mốc*

Phần lớn các trường hợp hư hỏng rau, quả là do nấm mốc, sự hư hỏng bắt đầu ở những quả giập nát và tiếp đến là các quả chín. Thường những nấm mốc gây nên sự hư hỏng này là nấm hoại sinh, còn có một số nấm kí sinh cơ hội thì gây nên hư hỏng và bệnh rau, quả lúc chưa thu hoạch.

Split Unregistered Version - http://www.simpopdf.com
Nấm mốc gây nên hư hỏng chủ yếu rau, quả là do dịch bào của rau, quả có axit và hàm lượng đường tương đối cao, những điều kiện này không thích hợp cho vi khuẩn, nhưng do hoạt động của nấm mốc, lượng đường và sau đó là độ axit của rau, quả bị giảm xuống và tạo điều kiện cho vi khuẩn phát triển mạnh, và như thế quá trình hư hỏng của rau, quả sẽ kết thúc với sự tham gia của vi khuẩn.

- Nấm mốc phát triển làm biến đổi các quá trình sinh hoá xảy ra trong rau, quả. Hệ sợi nấm phát triển làm phân huỷ vỏ quả do hệ enzym xenlulaza, pectinaza có trong tế bào và ăn sâu vào các mô, các tế bào và dịch bào quả sẽ chảy ra. Ngoài ra sản phẩm của quá trình trao đổi chất, trong bản thân nấm mốc như các chất độc được tiết ra cũng làm tiêu diệt tế bào sống của rau, quả và làm rau, quả thối rữa. Nấm mốc và sau đó là vi khuẩn sẽ làm hư hỏng hoàn toàn rau quả, ta gọi đó là : Sự thối rữa của rau, quả. Khi đó các chất dinh dưỡng có trong rau, quả sẽ bị thay đổi sâu sắc. Dưới tác dụng của các enzym do nấm tiết ra, các chất protein, pectin, xenlulo, tinh bột không tan sẽ được chuyển hoá thành những hợp chất đơn giản hơn và tan trong dịch bào. Sau đó được nấm hấp thụ và được dùng để xây dựng cơ thể, hoặc tiêu thụ trong quá trình hô hấp và dần dần chuyển thành CO_2 + H_2O. Đồng thời với biến đổi về thành phần, hình dạng rau, quả cũng bị biến dạng, màu sắc trở nên nâu xám, các mô và màng tế bào bị phân giải trở nên mềm nhũn, ngược lại cũng có trường hợp rau, quả bị biến dạng méo mó và trở nên quắt lại, thường gặp nhất là các nấm mốc *Aspergillus, Penicillium* và *Mucor*.

b) *Do nấm men*

Đôi khi sự hư hỏng của rau, quả là do nấm men gây ra, lúc đó đường ở trong rau sẽ bị lên men thành rượu và CO_2. Thường thường mùi rượu có lẫn mùi chua ở rau, quả hư hỏng là do vi khuẩn axetic phát triển tiếp theo đó và chuyển hóa rượu thành axit axetic.

c) *Do vi khuẩn*

Rất ít trường hợp vi khuẩn là tác nhân đầu tiên gây nên sự hư hỏng rau, quả, trong phần lớn sự thối rữa của rau, quả là do kết hợp của nấm mốc và vi khuẩn. Ở rau, hàm lượng protein tương đối cao, thường không có phản ứng axit, do đó sự hư hỏng do vi khuẩn gây nên thường gặp hơn ở quả.

Split Unregistered Version - http://www.simpopdf.com

BẢNG 11.2. VI SINH VẬT GÂY HƯ HỎNG RAU

Thực phẩm	Hư hỏng	VSV
Rau tươi	- Thối nhũn, mốc	- *Erwinia carotovora, Pseudomonas fluorescens*
	- Thối nhũn đen	- *Alternaria, Rhizopus nigricans*
	- Thối đen	- *Aspergilus niger*
	- Thối xanh	- *Peñicillium*
- Các loại đậu, đỗ	- Anthracnose	- *Colletotrichum*
- Bắp cải	- Đốm	- *Alternaria*
	- Thối xám	- *B. cineria*
- Cà rốt	- Thối nhũn	- *E. carotovora, Rhizopus sotlonifier*
	- Thối mốc	- *Fusarium*
	- Phân huỷ thối ướt	- *Sclerotinia sclerotiorum, Rhizotoria carotae*
- Cần tây	- Thối mốc	- *Mucor*
	- Thối hồng	- *S. sclerotiorum*
	- Thối cuống	- *Bostrytis allii*
- Hành	- Thối	- *Pseudomonas cepacia*
	- Thối nâu	- *P. aeruginosa*
	- Mốc đen	- *Aspergillus niger*
- Khoai tây	- Thối theo vòng	- *Carynebacterium*
	- Thối khô	- *Fusarium*
- Cà chua	- Bị lên men	- *Candida, Pichia, Hanseniaspora Kloeckera*
	- Thối mốc	- *Alternaria, Aspergillus, Botrytis, Colletotrichum Monilia, Penicillium, Rhizopus*
	- Đốm vi khuẩn	- *Xanthomonas*
	- Thối nhũn	- *Byssochlamys fulva*
Rau đóng hộp		
- Ngô, đậu ve, đậu Hà Lan	- Rất chua	- *Bacillus stearothermophilus*
	- Mùi sulfit	- *Dessulfotomaculum nigrificans*
	- Phồng, thối	- *Clostridium sporogenes*
	- Phồng	- *Bacillus coagulans*
	- Rất chua	- *Clostridium pasteurianum*
- Cà chua	- Lên men butiric	- *Clostridium butyrium*
Rau lên men		
- Ngâm muối	- Tạo lớp màng mỏng	- Nấm men : *Candida, Debaryomyces, Hanse, Kloeckera, Pichia, Rhodotorula, Saccharomyces*
- Ngâm dấm	- Nhũn	- *Bacillus*
	- Đen	- *Bacillus*
	- Nhũn, mốc, nhớt	- *B.subtilis*
- Choucroute	- Màu hồng	- *Rhodotorula*
Nước ép rau	Chua	*Lactobacillus, Acetobacter*

Split Unregistered Version - http://www.simpopdf.com

BẢNG 11.3. VI SINH VẬT GÂY HƯ HỎNG QUẢ

Thực phẩm	Hư hỏng	VSV
Quả tươi	- Thối xanh	- *Penicillium expasum*
	- Thối đen	- *Aspergillus niger*
	- Chua vị đắng	- *Streptococcus faecalis*
	- Thối nhũn	- *Byssochlamus fulva, Penicillium*
- Táo	- Lên men	- *Torulopsis, Candia, Pichia*
- Mơ	- Thối xám	- *Botrytis cinerea*
- Chuối	- Thối khi tàng trữ	- *Collectotrichum, Gloeosporium, Botryodiploidia, Erwinia sp*
	- Thối đen	- *Alternaria*
	- Thối hai đầu	- *Colletorichum, Fasarium, Verticillum*
- Quả rừng	- Thối nấm	- *Botrytis cinerea, Mucor mucedo*
Dâu tây	- Thối xám	- *B. cinerea*
	- Lên men	- *Kloeckera*
- Quả có múi	- Thối nhũn	- *Penicillium*
(cam, quýt)	- Thối đen	- *Alternaria*
- Chà là	- Lên men	- *Sacharomyces, Candida, Hanseniaspora, Torulopsis*
- Sung	- Chua	- *Gluconobacter*
- Ổi	- Thối anthracnose	- *Colletotrichum*
- Ôliu	- Mềm hai đầu	- *Rhodotorula glutinis, R.mituta, R. rubra, Saccharomyces, Hansenula*
	- Lột vỏ	- *Klebsiella, Enterobacter, Escherichia, Aeromonas liqueafaciens*
	- Thối nâu	- *Molinilia fructicola, Sclerotinia*
	- Phân huỷ	- *Rhizopus stolonifer*
Quả ngâm đường	- Axit butilic	- *Clostridium*
- Mơ	- Thối nhũn	- *Byssochlamys fluva, B. nivea*
- Mứt chuối nghiền	- Mềm	- *Rhizopus stolonifer, R. arrhizus*
- Bưởi	- Có ga	- *Bacillus licheniformis*
	- Có ga (CO_2)	- *Lactobacillus brevis*

(Nguồn : Lê Xuân Phương)

2.3. Các biện pháp chế biến và bảo quản rau, quả

Trong thực tế người ta thường sử dụng rau, quả ở dạng tươi, nhưng để tránh sự phá hoại của VSV và bảo tồn các chất dinh dưỡng của rau, quả, người ta thường sử dụng các phương pháp chế biến và bảo quản rau, quả. Thông thường là chế biến bằng phương pháp như :

Split Unregistered Version - http://www.simpopdf.com

- Muối chua rau, quả như củ cải, bắp cải, hành củ, su hào...

- Ngâm đường, ngâm dấm rau, quả ngâm dấm : Đu đủ, su hào, cà rốt ; ngâm đường các quả táo, quất...

- Làm mứt dẻo, mứt khô các loại quả như : dứa, mận, táo, dâu...

Các loại rau, quả, củ được chế biến theo các phương pháp trên đều dựa trên cơ sở là sự thay đổi pH của môi trường, hoặc gây nên sự khô hạn sinh lí dựa vào nồng độ các chất hòa tan có trong môi trường để ức chế sự hoạt động của VSV có trong rau, quả.

- Bảo quản rau, quả tươi bằng các phương pháp : Bảo quản lạnh nhưng chỉ được trong một thời gian ngắn ; hoặc có thể bảo quản khô rau, quả bằng cách sấy khô ở nhiệt độ 45 - 50^{0}C ; hoặc phơi khô dưới ánh nắng tự nhiên của mặt trời kết hợp với sự thoáng gió để làm giảm hàm ẩm của rau, quả xuống đến 8-24%, tạo điều kiện bất lợi cho VSV.

Sản xuất đồ hộp rau, quả tức là vừa gia nhiệt, bổ sung gia vị để vừa tăng giá trị dinh dưỡng, giá trị cảm quan, vừa để bảo quản vận chuyển. Thường chế biến đồ hộp rau, quả ở dạng nguyên miếng, nguyên quả hoặc ở dạng lỏng.

2.4. Hệ vi sinh vật rau, quả và các sản phẩm rau, quả

2.4.1. Đồ hộp rau, quả

- Sản phẩm đồ hộp rau quả thường có các nhóm VSV phát triển như : *Bacillus messentericus, Bacillus subtilis* ; các VSV ưa nóng *Clostridium pasteurianum*, ở pH = 4,5 có khả năng chịu 100^{0}C trong 20 phút. Thông thường, đồ hộp rau, quả thường có 2-3% dung dịch muối ăn, đây là nồng độ thích hợp cho VSV phát triển. Vì thế, để tránh nhiễm trùng, phải dùng nhiệt độ khi vào hộp là 80^{0}C, thanh trùng ở nhiệt độ 120^{0}C, trong thời gian 60-70 phút để tiêu diệt được *Clostridium*, nhất là đối với các loại đồ hộp từ hạt đậu, ngô giàu chất dinh dưỡng và độ axit thấp, là môi trường thuận lợi cho VSV phát triển.

- Đồ hộp được chia làm 3 nhóm theo pH của sản phẩm :

+ Với pH > 5,2, trong đồ hộp này có *Clostridium* (≥ 100 bào tử/g), chúng tạo chất độc.

+ Với pH = 4,6 – 5,2, trong đồ hộp này có bào tử tồn tại và chỉ nảy mầm tạo chất độc khi bị nhiễm nhiều VSV (> 1000 bào tử/g).

+ Với pH = 3,2 – 4,6, bào tử không phát triển và không tạo chất độc.

- Nguyên nhân gây hư hỏng đồ hộp rau, quả :

Split Unregistered Version - http://www.simpopdf.com

+ Do các quá trình sinh hóa xảy ra do chính bản thân nguyên liệu (thủy phân, oxi hóa).

+ Do các quá trình gia nhiệt không triệt để.

+ Do sự tác động của VSV.

+ Do sự tiếp xúc trực tiếp của nguyên liệu làm đồ hộp với bao bì đồ hộp (do sắt tráng sơn không đảm bảo).

- Các dạng hư hỏng của đồ hộp rau, quả :

+ Hư hỏng nhẹ : Quá trình phân giải gluxit, tạo ra các axit hữu cơ làm đồ hộp bị chua, do *Bacillus stearothermophilus, Bacillus coagulans* và *Baccarothermophilus* gây nên.

+ Hư hỏng nặng : Quá trình phân hủy gluxit tạo ra CO_2 và H_2 gây nên nổ đồ hộp, đồ hộp thường có vị tanh là do *Clostridium polimixa* và *Clostridium thermosaccharolitic* gây nên.

+ Hư hỏng do tạo khí sunfurơ : Do phản ứng thủy phân protein tạo ra H_2S, H_2S sẽ kết hợp với Fe của đồ hộp tạo ra sunfua sắt dưới tác dụng của *Clostridium nigrificans*. Hộp hay bị nổ tung do phân hủy tạo khí.

2.4.2. Rau cải muối chua

Trong rau cải thường có một lượng đường nhất định và dịch được tách ra từ rau cải là môi trường dinh dưỡng rất tốt cho VSV phát triển như vi khuẩn lactic, vi khuẩn gây thối, nấm men và nấm mốc, ngoài ra còn có *Leuconostoc mesentericus*. Các VSV chính là tác nhân của quá trình lên men muối chua rau cải.

Tuy nhiên cần lưu ý, trong quá trình muối chua rau cải, dễ dàng có các dạng hư hỏng như rau cải bị biến màu do *Torulopsis* tạo sắc tố màu hồng hoặc màu đỏ sáng, nấm men gây váng trắng trên bề mặt. Hoặc dưa cải bị nhớt do *Lactobacterium cucumeris fermentati* và *Lactobacterium plantarum* phát triển ở nhiệt độ cao gây nên.

2.4.3. Dưa chuột, dưa gang muối chua

- Tác nhân của quá trình lên men này là do các vi khuẩn *Bacterium aerogenes, Bacterium cloacae, Bacterium freurdii, Citrobacter intermedium, Bacillus messentericus, Bacillus megatherium, Bacillus polimyxa, Clostridium maceraus, Bacillus cloacae, Leuconostoc mesentericus, Lactobacterium brevit, Lactobacterium fermenti*. Sản phẩm cuối cùng của sự lên men chứa 0,8 – 1,4% axit lactic. Khi bảo quản các quả dưa gang, dưa chuột muối này, cần tránh để độ axit giảm vì ở nồng độ axit thấp, vi khuẩn gây thối rữa phát triển sẽ gây phân hủy mô bào, phải bảo quản sản phẩm ở nhiệt lạnh để phòng nấm men lên men mạnh ở

Split Unregistered Version - http://www.simpopdf.com
nhiệt độ cao làm cho quả dứa bị phồng lên. Ngoài ra cần lưu ý đến sự hư hỏng sản phẩm do nấm mốc tạo poligalacturonaza, phân hủy pectin làm mềm nhũn quả hoặc quả bị chấm đen do *Bacterium nifer*, và bị nhớt do *Bacterium abderhaldi* gây nên.

- Biện pháp xử lí khi sản phẩm bị hư hỏng như sau :

+ Xử lí bằng tia tử ngoại trên màng trắng.

+ Dùng dung dịch chứa 1,5% axit lactic, 1% NaCl, 0,1% benzoat natri cho vào dịch lên men.

2.4.4. Các loại nước quả

- Quả sau khi thu hái được đưa về rửa sạch, ép lấy dịch quả, lọc và pha chế thành sản phẩm nước quả tươi có đường hoặc không. Trong quá trình thu hái, vận chuyển, quả bị giập nát, tạo điều kiện cho VSV phát triển tăng lên về số lượng và đa dạng hơn về thành phần. Tuy nhiên qua các công đoạn chế biến, lượng VSV lại giảm đi rất nhiều. Nhưng nếu không đưa dịch quả vào sản xuất ngay thì lượng VSV lại tăng lên nhanh chóng và gây nên hư hỏng sản phẩm như : nước quả bị mốc do *Penicillium*, bị chua do vi khuẩn axetic, vi khuẩn lactic và có mùi men rượu do nấm men gây nên. Vì thế để phòng tránh, khi rót dịch nên tiến hành ở nhiệt độ trên 93^0C.

- Nước quả thường được bảo quản bằng cách đóng chai và thanh trùng ở nhiệt độ 90 – 95^0C, sau đó hạ nhiệt và bảo quản ở 0 – 15^0C. Nước quả bảo quản trong thùng được nạp thêm CO_2 sau khi đun nóng và bảo quản lạnh ở ± 1^0C. Ngoài ra, có thể xử lí nước quả bằng tia tử ngoại trong 24 giờ và sau đó giữ 6 – 7 ngày, ở nhiệt độ 1,5 – 2^0C, sẽ làm giảm lượng VSV xuống 12 lần.

III - HỆ VI SINH VẬT THỊT VÀ CÁC SẢN PHẨM THỊT

3.1. Hệ vi sinh vật thịt và sự phân bố vi sinh vật ở thịt

Thịt là một loại thực phẩm giàu dinh dưỡng. Trong thịt có nước, lipit, protein, các chất khoáng và vitamin. Theo thành phần hóa học của các loại thịt, chúng ta thấy rằng thịt không những là thức ăn tốt cho người mà còn là môi trường thích hợp cho VSV phát triển. Trong nghiên cứu VSV, người ta thường lấy nước chiết thịt bò để chế ra cao thịt, để pha các môi trường nuôi cấy vi khuẩn và một số loài thuộc nhóm VSV khác. Trong số này thường gặp vi khuẩn gây thối rữa, các bào tử của các nấm mốc và tế bào nấm men. Các VSV này nhiễm vào thịt theo 2 con đường : nội sinh và ngoại sinh. Thịt gia súc và gia cầm khoẻ thường có rất ít VSV.

Split Unregistered Version - http://www.simpopdf.com

BẢNG 11.4. THÀNH PHẦN CÁC CHẤT DINH DƯỠNG CỦA THỊT

Chất dinh dưỡng	Thịt bò loại 1	Thịt lợn nạc
Nước (%)	70,5	60,9
Protein (%)	18	16,5
Lipit (%)	10,5	21,5
Canxi (mg%)	10	9
Photpho (mg%)	191	178
Sắt (mg%)	2,7	2,5
Vitamin A (mg%)	0,01	0,01
Vitamin B_1 (mg%)	0,17	0,93
Vitamin B_2 (mg%)	0,17	0,16
Vitamin PP (mg%)	4,22	2,7
Vitamin C (mg%)	1	2

a) *Nhiễm nội sinh :* là do con vật bị bệnh. Đầu tiên thấy mầm bệnh ở một tổ chức hoặc cơ quan nội tạng nào đó của con vật, sau đó lan tràn vào máu, vào thịt hoặc các cơ quan khác. Đôi khi cũng do hậu quả của việc suy nhược cơ thể và làm việc quá sức, đói và lạnh cũng làm cho các VSV từ đường tiêu hoá tràn vào bắp thịt và các tổ chức khác của gia súc theo mạch máu. Thức ăn mà các gia súc ăn trước khi giết mổ cũng là một nguồn nhiễm VSV từ bên trong cho thịt. Nếu khi mổ gia súc, người ta bỏ ngay những chất chứa trong đường tiêu hoá của gia súc thì có thể tránh được hiện tượng này. Trong thực tế, thịt từ các gia súc bị ốm, bệnh, thường hay bị hỏng nhanh hơn thịt của các gia súc khoẻ mạnh.

b) *Nhiễm ngoại sinh :* là do nhiễm bẩn từ bên ngoài vào thịt trong quá trình giết mổ và vận chuyển. Trong khi làm thịt, VSV ở da, lông, móng, ở dao mổ, các dụng cụ chứa, từ tay hoặc áo quần của người làm thịt và từ đất, nước, không khí... cũng có thể lây nhiễm cho thịt. Các chất chứa trong đường tiêu hoá thường có một số lớn VSV : khi chọc tiết, áp suất máu giảm dần và tạo điều kiện thuận lợi cho các VSV tràn vào các mạch máu và lan đi khắp cơ thể. Vì vậy sau khi giết, phải lấy ngay dạ dày và nội tạng ra khỏi con vật. Trên bề mặt da và lông của con vật cũng có rất nhiều VSV và khi giết mổ gia súc, gia cầm, thường được làm bằng nước nóng, đó cũng là biện pháp khử trùng có hiệu quả.

- Thịt gia súc, gia cầm khi giết mổ thường thấy số lượng VSV ở bề mặt nhiều hơn bên trong, dần dần các VSV bên ngoài, tuỳ thuộc vào điều kiện độ ẩm, nhiệt độ, sẽ xâm nhập sâu vào trong thịt.

Split Unregistered Version - http://www.simpdf.com

Các VSV thường gặp là VSV hoại sinh, bào tử của nấm mốc, các tế bào nấm men, cũng có thể gặp các VSV gây bệnh cho người và gia súc, như *Bacillus subtilis, Bacillus mesentericus, Bacillus mycoides, Bacillus megatherium, Clostridium sporogenes*..., các loại cầu khuẩn khác nhau và các loại trực khuẩn đường ruột, như *Escherichia coli, Bacterium faecalis alcaligenes, Proteus vulgaris* ; ngoài ra còn các giống nấm men, các loại nấm mốc khác nhau như : *Cladosporium, Sporotricum, Oospora (Geotricum), Thamnidium, Mucor, Alternaria, Penicillium, Monilia*... Nhất là những giống nấm sinh bào tử rất thường thấy ở thịt. Các VSV gây bệnh cho người ở thịt là : *Salmonella, Streptococcus, Mycobacterium*...

- Số lượng VSV ở thịt phản ánh chất lượng của thịt, nếu đạt tới 10^7-10^8 tế bào vi khuẩn/1gam hoặc trên $1cm^2$ bề mặt thì thịt đã bị kém phẩm chất. Đối với thịt gia cầm, ngoài các VSV vừa nêu trên, đặc biệt thường hay gặp vi khuẩn *Salmonella* là vi khuẩn gây ngộ độc thực phẩm, nhất là ở thịt vịt nguyên con bảo quản lạnh.

3.2. Các dạng hư hỏng của thịt

Như trên chúng ta đã biết, thịt là môi trường giàu thức ăn cho nhiều loài VSV vì trong thịt có nhiều nước, giàu chất dinh dưỡng nhất là protein, muối khoáng, chất kích thích sinh trưởng... Vì vậy, thịt bảo quản dễ bị hư hỏng do hoạt động của VSV. Các dạng hư hỏng của thịt bao gồm :

3.2.1. Thịt bị thối rữa

Vi khuẩn gây thối rữa phát triển và hoạt động mạnh trên bề mặt thịt. Những vi khuẩn này có hoạt tính proteinaza cao, chính chúng tiết ra enzym proteinaza làm phân giải protein tới các sản phẩm có mùi hôi thối như NH_3, indon, scatola, mercaptan. Thịt của những con vật bị bệnh hoặc mệt yếu dễ bị thối rữa. Còn trong thịt có nhiều glicogen thì axit lactic dễ được tạo thành trong quá trình bảo quản và môi trường axit lại ức chế vi khuẩn gây thối rữa phát triển. Sự thối rữa của thịt xảy ra cả trong điều kiện hảo khí cũng như yếm khí. Các vi khuẩn hảo khí là : *Proteus vulgaris, Bacillus subtilis, Bacillus mesentericus, Bacilus megatherium.* Các vi khuẩn yếm khí là : *Clostridium perfringeus, Clostridium puttrificum*...

Thông thường thịt bò thối rữa là do hai quá trình hảo khí và yếm khí xảy ra đồng thời, rất hiếm thấy một trong hai quá trình này xảy ra riêng biệt. Trong thịt bò bị thối rữa, đầu tiên là các phân tử protein bị phân huỷ thành các polypeptit và các axit amin, sau đó chúng lại bị khử amin và các axit béo và NH_3 được tạo thành. Các axit thơm như : tirozin, triptofan

Split Unregistered Version - http://www.simpopdf.com
sẽ cho các sản phẩm phân huỷ là H_2S, indola, axit butiric và các chất khác có mùi khó chịu. Trong sản phẩm thối rữa của thịt có các chất độc như ptomain.

a) *Quá trình thối rữa hảo khí*

Bắt đầu từ bề ngoài của thịt, dần sẽ ăn sâu vào trong theo các lớp tiếp giáp giữa cơ thể thịt với xương, hoặc các mạch máu lớn. Quá trình này xảy ra theo 3 giai đoạn :

- Giai đoạn 1 : Trên bề mặt thịt mọc các khuẩn lạc của VSV hảo khí và thay đổi cảm quan của thịt chưa rõ ràng.

- Giai đoạn 2 : Bắt đầu khi thấy rõ các khuẩn lạc và bề mặt thịt bị mềm, thịt bị thay đổi màu sắc và mùi, phản ứng của thịt ngả sang kiềm, nhưng bên trong thịt vẫn tốt.

- Giai đoạn 3 : Vi khuẩn phát triển mạnh trong thịt làm cho các mô liên kết bị đứt và protein bị phân huỷ.

b) *Quá trình thối rữa yếm khí*

- Là do các VSV hô hấp yếm khí gây ra, chúng nhiễm vào thịt từ đường ruột. Quá trình này xảy ra tương tự như quá trình hảo khí theo trình tự các sản phẩm phân huỷ. Sự thối rữa thịt hay các sản phẩm thịt, cá, cũng như các sản phẩm giàu protein còn gọi là sự lên men thối, sản phẩm của sự lên men này là NH_3 và các axit béo, các chất có mùi thối khó chịu, làm ô nhiễm môi trường sống.

- Dựa vào sự có mặt của hệ VSV trong thịt mà người ta nêu ra bảng đánh giá chất lượng thịt sau đây :

BẢNG 11.5. BẢNG QUY ĐỊNH ĐÁNH GIÁ CHẤT LƯỢNG THỊT

Chất lượng thịt	pH của thịt	Số lượng VSV trong thịt
Thịt tươi	5,9-6,5	Một vài cầu khuẩn, không có cầu khuẩn
Thịt kém chất lượng	6,6	20-30 cầu khuẩn, một vài trực khuẩn
Thịt ươn	6,7	Dày đặc cả trực khuẩn và cầu khuẩn

3.2.2. Thịt hoá nhày

Thực chất đây là giai đoạn đầu của giai đoạn hỏng thịt. Trên bề mặt thịt hình thành một lớp dày đặc gồm những vi khuẩn : *Micrococcus aureus, Micrococcus candidus*... Cũng như nhiều loài thuộc nhóm : *Achromobacter, Pseudomonas, Leuconostoc, Lactobacillus* và nấm men. Tốc độ tạo thành sự hoá nhày ngoài sự phụ thuộc vào độ ẩm không khí,

Split Unregistered Version - http://www.simppdf.com
còn thấy phụ thuộc vào nhiệt độ trong bảo quản. Thịt bảo quản lạnh tốt nhất ở nhiệt độ 0-2°C, ở độ ẩm tương đối của không khí là 85-90%. Với điều kiện này thịt có thể bảo quản 2 tuần lễ không bị hoá nhày.

3.2.3. Thịt bị lên men chua

Thịt có thể bị chua do vi khuẩn lactic. Thịt bị lên men chua thường là những loại thịt có nhiều glicogen. Trong quá trình này, các sản phẩm lên men thường là các axit hữu cơ, ban đầu các axit này ức chế các vi khuẩn gây thối rữa phát triển. Nhưng ở môi trường axit, nấm mốc lại dễ phát triển và hoạt động tạo thành NH_3 và kiềm nitrua, những chất này trung hoà môi trường axit, tạo điều kiện cho các vi khuẩn gây thối rữa phát triển, trước hết là : *Bacterium protesus, Bacillus subtilis, Bacterium mesenterium*. Thịt bị chua, có màu xám và mùi khó chịu, hiện tượng này báo hiệu thịt sắp bị thối.

3.2.4. Thịt bị biến đổi sắc tố

Dưới tác dụng của hệ VSV có trong thịt, màu đỏ của thịt biến thành màu xám, nâu hoặc xanh lục với sự có mặt của những hợp chất oxi hoá, hoặc hidrosunphua H_2S do sự hoạt động của một số loài vi khuẩn lactic như *Lactobacillus* và *Leuconostoc*, làm cho xúc xích, lạp xường có màu xám. Nếu mùi của thịt vẫn bình thường và không thấy các chất có độc tố, thì chỉ cần loại bỏ các chất màu và thịt vẫn có thể sử dụng bình thường.

3.2.5. Thịt phát sáng

Hiện tượng này thường thấy khi thịt được bảo quản lẫn với cá. Trên bề mặt thịt có vi khuẩn *Photobacterium*. Thịt phát sáng không kèm theo quá trình thối rữa.

3.2.6. Thịt có những vết màu trên bề mặt

Dưới tác dụng của các vi khuẩn hô hấp hảo khí, trên bề mặt thịt sẽ xuất hiện các vết màu khác nhau dưới tác dụng của các vi khuẩn :

- *Bacterium prodigiosum* hoặc *Serratia marcerans* : Thịt có các vết đỏ.
- *Pseudomonas pyocyanes* : Tạo vết xanh.
- *Pseudomonas fluorescens* : Tạo vết xanh lục.
- *Chromobacterium* : Tạo vết xám nhạt, nâu đen.
- *Micrococcus* : Tạo vết màu vàng.

Khi mỡ bị ôi và xuất hiện peroxit, thì màu vàng sẽ biến thành màu xám tối và sau đó trở nên tía nhạt, xanh. Nếu thịt vẫn có mùi bình thường và không tìm thấy các độc tố, thì sau khi tẩy sạch các vết màu, vẫn có thể sử dụng được bình thường.

3.2.7. Thịt bị ôi do sự biến đổi mỡ có trong thịt

Vi khuẩn phân giải mỡ thúc đẩy quá trình oxi hoá của mỡ. Mỡ bị oxi hoá do tác dụng đồng thời của ánh sáng và không khí. Một số chất béo bị

nd Split Unregistered Version - http://www.simpopdf.com

ôi sau khi bị thuỷ phân. Các vi khuẩn *Pseudomonas, Achromobacter* và một số nấm men tác dụng làm cho mỡ bị ôi.

3.2.8. Thịt có mùi mốc

Dưới tác dụng của các loại nấm mốc như *Mucor, Penicillium, Aspergillus* phát triển trên bề mặt thịt, sẽ làm giảm các chất chiết xuất, làm tăng độ kiềm, làm xảy ra quá trình phân huỷ protein và các chất béo tạo axit bay hơi. Nấm mốc trước tiên tạo thành các sợi trên bề mặt thịt và ăn sâu vào 2-5mm, sau đó phát triển các nhánh sinh bào tử. Thịt bị mốc có mùi ngái khó chịu và dần dần sẽ bị thay đổi sắc tố, có mùi chua và hư hỏng.

3.3. Các phương pháp bảo quản thịt

3.3.1. Bảo quản bằng nhiệt độ thấp

- Bảo quản lạnh : Thịt được giữ ở nhiệt độ 1,4-2,2^{0}C trong thời gian tối đa là 30 ngày đối với thịt bò, 7-14 ngày đối với thịt lợn và 5-10 ngày đối với thịt dê.

- Bảo quản đông lạnh : Làm đông lạnh ở nhiệt độ 10-20^{0}F, thời gian bảo quản được lâu hơn là bảo quản lạnh.

3.3.2. Bảo quản bằng nhiệt độ cao

- Thịt đóng hộp và tiệt trùng bằng hơi nước bão hoà ở 115-121^{0}C trong 45-60 phút.

- Thịt sấy khô hoặc phơi khô đến hàm ẩm 19%.

3.3.3. Bảo quản bằng tia phóng xạ chiếu vào thịt để tiêu diệt VSV

3.3.4. Bảo quản bằng cách xông khói

Trong khói có các chất khử khuẩn như foocmon, axit phenic, crezol, axeton, rượu, gỗ nhựa thông, axit axetic. Thịt xông khói thường bị mất một phần nước, khô bề mặt, các chất sát trùng thấm vào trong nên dễ bảo quản.

3.3.5. Bảo quản bằng muối

Bóp muối vào thịt ; ngâm thịt trong dung dịch nước muối ; tiêm vào thịt dung dịch muối đặc ở nhiều nơi và trộn muối ăn vào thịt đã xay.

3.3.6. Bảo quản bằng cách cho kháng sinh vào thịt

Cho gia súc ăn kháng sinh trong một thời gian dài ; cho ăn thật nhiều kháng sinh trong một thời gian ngắn ; tiêm kháng sinh vào các bắp thịt và bôi kháng sinh trên bề mặt hoặc trộn kháng sinh vào thịt cắt miếng nhỏ hoặc đã băm nhỏ.

3.4. Một số sản phẩm chế biến từ thịt

3.4.1. Thịt muối

- NaCl là chất cố định màu gián tiếp và ức chế khuẩn trong môi trường axit, đặc biệt là đối với vi khuẩn yếm khí. $NaNO_2$ là chất cố định

Split Unregistered Version - http://www.simpopdf.com
màu và cũng có tác dụng ức chế vi khuẩn trong môi trường axit. Chất màu của thịt là miogobin và của máu là hemoglobin kết hợp với nitrit hoặc nitrat cho thịt có màu đỏ, sáng. Điều kiện axit do thịt tạo ra và điều kiện khử oxi do vi khuẩn làm cho các hoá chất này có khả năng kháng khuẩn. Cần chú ý, nếu những chất này dùng quá nhiều sẽ gây ngộ độc cho người và hàm lượng nitrit trong máu lớn sẽ tạo ra chất metgemoglobin.

- Trong thịt muối, các VSV ưa muối vẫn sống và phát triển làm hư hỏng thịt, các vi khuẩn này sinh màu vàng, đỏ và có cả *Salmonella* và *Clostridium botulinum*. Những vi khuẩn này chỉ bị ức chế ở nồng độ muối NaCl là 10%, *Salmonella* bị chết trong nồng độ muối là 19% sau 70-80 ngày. Các cầu khuẩn bị chết trong nồng độ muối là 15%, còn tụ cầu vàng gây ngộ độc thực phẩm thì ngừng sinh trưởng ở nồng độ muối ăn là 15-20%, và chết ở nồng độ 20-25%. Các loài vi khuẩn yếm khí rất ít thấy ở vi khuẩn thịt muối, như *Clostridium sporogenes* ngừng phát triển trong nồng độ muối ăn là 12%. Các loài nấm men, nấm mốc có thể chịu được nồng độ muối cao, chúng vẫn có thể phát triển được ở nồng độ muối ăn là 20%.

- Dịch thịt muối có thể chứa từ hàng ngàn tới hàng triệu tế bào VSV trên 1ml dịch. Hệ VSV trong dịch thịt muối rất phong phú và đa dạng, chúng thường bao gồm : *Micrococcus alvatus, Micrococcus aquatilis, Micrococcus candidus, Micrococcus flavus* hoặc ít gặp hơn như *Micrococcus flaviscens, Micrococcus citreus, Micrococcus acidilactic*... Người ta thường muối đường với thịt để làm mềm thịt, một ít nitrit natri hoặc nitrat natri làm đỏ thịt, ngoài ra còn thêm ít húng lìu. Thịt muối có húng lìu được dùng trong chế biến lạp xường..Để làm tăng khả năng ức chế VSV và kéo dài thời gian bảo quản, người ta thường giữ thịt muối ở điều kiện lạnh (2-5^{0}C) hoặc đem thịt muối xông khói. Thịt muối để ướp lạnh, vì có một lí do nào đó, nhiệt độ lên cao, dịch thịt bị vẩn đục, sủi bọt và mau hỏng do VSV phát triển.

3.4.2. Thịt bảo quản lạnh

Thường có hai dạng : Thịt ướp lạnh và thịt ướp đông khô : ở nhiệt độ thấp, các biến đổi có hại ở thịt bị ngừng hoặc diễn ra chậm, do đó có thể kéo dài thời gian bảo quản thịt.

a) *Thịt ướp lạnh*

- Thịt được đưa vào bảo quản lạnh ở nhiệt độ từ -3^{0}C đến +1^{0}C. Trước khi nhập thịt, độ nhiệt trong buồng bảo quản lạnh nên hạ tới -1 đến -3^{0}C

Split Unregistered Version - http://www.simpopdf.com
và trong thời gian bảo quản thì giữ nhiệt độ từ 0-1^{0}C. Độ ẩm tương đối của không khí ban đầu là 95-98% và sau là 90-92%. Thịt trong thời gian bảo quản có nhiệt độ lớp trong hạ dần ngang bằng nhiệt độ trong buồng, bề mặt thịt hơi khô, se dần tạo thành một lớp mỏng ngăn VSV phát triển và xâm nhập vào bên trong thịt.

- Tuỳ vào số lượng VSV ban đầu của thịt, nhiệt độ và độ ẩm buồng lạnh mà có thể bảo quản thịt bò tới 30 ngày ; thịt lợn, dê, cừu khoảng 15 ngày. Hệ VSV của thịt ít thay đổi trong thời gian đầu về số lượng và thành phần, nhưng dần dần sau đó, các loài ưa ẩm ngừng sinh sản hoặc bị chết một phần, còn các loài VSV ưa lạnh tiếp tục phát triển nhưng chậm.

- Các vi khuẩn thường gặp trong thịt bảo quản lạnh bao gồm : *Pseudomonas, Achromobacter, Flavobacterium*. Các VSV ưa lạnh có một số lượng nhỏ trong đất, nước và không khí. Hai giống *Pseudomonas* và *Achromobacter* có khả năng sinh sản ở nhiệt độ -5^{0}C đến 0^{0}C và một vài loài có thể phát triển ở nhiệt độ -9^{0}C đến -8^{0}C. Nhiều loài trong hai giống này ở khoảng nhiệt độ thấp vẫn có khả năng gây hư hỏng thịt, đó là *Pseudomonas putrifacius, Pseudomonas fluorescens, Pseudomonas geniculata.*

Khi bảo quản dài ngày, một số loài *Pseudomonas* phát triển trên thịt tạo thành vết nhày có màu xanh xám hoặc nâu xám. Như vậy thịt có thể lấy màu khuẩn lạc mà thẫm màu, không ảnh hưởng đến mùi vị của thịt và không gây nguy hiểm cho người dùng. Thời gian bảo quản thịt càng dài, ta thấy xuất hiện thêm nấm men, nấm mốc trên bề mặt của thịt, có khi cả xạ khuẩn làm thịt có mùi khó chịu. Các loài *Mucor, Penicillium, Cladosporium, Thamnidirum* và các nấm men không sinh bào tử *Rhodototula*, ở nhiệt độ từ -9^{0}C đến -4^{0}C chúng vẫn phát triển và làm hư hỏng thịt, còn các nấm mốc khác bị ức chế ở nhiệt độ này.

b) *Thịt đông lạnh*

- Phương pháp này giữ thịt ở nhiệt độ lạnh sâu, ở những lớp sâu từ 8-10cm của thịt, nhiệt độ không cao hơn -6^{0}C để bảo quản thịt trong thời gian dài. Trong thịt đông lạnh, phần nước bị đóng băng ở dạng tinh thể, nếu nhiệt độ hạ thấp dần dần thì tinh thể băng nhỏ và hạ thấp nhanh thì tinh thể băng sẽ lớn. Điều này liên quan đến việc làm tan băng, nếu tinh thể băng nhỏ khi tan sẽ phá vỡ tế bào thịt ít hơn, nếu tinh thể băng lớn sẽ phá vỡ nhiều hơn, như vậy phần nước trong tế bào sẽ tiết ra nhiều hơn.

- Ở thịt đông lạnh, một số VSV bị tiêu diệt, tốc độ chết phụ thuộc tốc độ đông lạnh nhanh và sâu, đặc biệt là -18^{0}C thì VSV chết nhiều hơn là

Split Unregistered Version - http://www.simpopdf.com
làm đông lạnh từ từ nhưng trong thịt vẫn còn VSV sống. Nấm mốc vẫn có thể phát triển ngay trên thịt đông lạnh và sự phát triển này liên quan chặt chẽ với độ ẩm tương đối của không khí, nhiệt độ và độ thoáng gió của buồng lạnh. Nhiệt độ, độ ẩm càng cao và độ lưu thông không khí càng thấp thì nấm mốc phát triển càng nhanh.

- Khi nhiệt độ trong lớp sâu của thịt nâng dần lên 0^0C thì kết thúc quá trình tan băng. Dịch nước thịt được tiết ra và VSV còn sống trong thịt đông lạnh phát triển rất nhanh. Thịt tan băng mất tính bền vững vì bề mặt ẩm ướt, cấu trúc tế bào bị phá huỷ, cho nên thịt khi làm tan băng phải nhanh chóng sử dụng và không nên làm đông lạnh trở lại.

3.4.3. Thịt hộp

- Thịt được chứa trong hộp kín và thanh trùng ở nhiệt độ cao. Thịt dùng đóng hộp phải là thịt tươi của gia súc, gia cầm khoẻ. Trước khi thanh trùng, cần phải kiểm tra trong thịt theo 2 chỉ tiêu :

+ Tổng số vi khuẩn.

+ Bào tử các vi khuẩn hảo khí ưa nhiệt.

- Trong quá trình thanh trùng, các VSV bị tiêu diệt phần lớn, trừ những bào tử của *Bacillus subtilis, Bacillus mesentericus, Clostridium botulinum* có thể vẫn còn sống. Vì vậy, số bào tử càng nhiều thì thời gian thanh trùng càng dài để có thể tiêu diệt được chúng.

- Sự hư hỏng của thịt hộp thể hiện rất rõ, nhất là hộp bị phồng. Nguyên nhân của hiện tượng này là những yếu tố vật lí, hoá học, sinh học. Hiện tượng phồng hộp thường là do các VSV còn sống sót trong quá trình thanh trùng, sau đó sẽ phát triển, sinh hơi và làm phồng hộp. Vì vậy sau khi thanh trùng, cần phải kiểm tra VSV bằng cách giữ các hộp ở 37^0C trong 10 ngày, nếu hộp nào phồng thì loại bỏ. Các vi khuẩn thường gặp là vi khuẩn yếm khí, cũng như *Clostridium botulinum* và một vài loài ưa nhiệt, đôi khi còn gặp các vi khuẩn hảo khí tuỳ tiện. Những bào tử của *Bacillus subtilis, Bacillus mesentericus, Clostridium botulinum* chưa qua gia nhiệt sẽ nảy mầm sau 1-2 ngày. Nếu đã qua gia nhiệt cao sẽ nảy mầm ở 37^0C, sau khoảng 20-27 ngày đối với *Bacillus subtilis* và *Bacillus mesenteriens*. Sau 56-58 ngày hoặc muộn hơn đối với *Clostridium sporogenes, Clostridium botulinum*.

Vì vậy, kiểm tra VSV bằng cách trên chưa loại bỏ những đồ hộp còn các loại bào tử này. Điều đó cũng là một khó khăn lớn đối với công tác

nd Split Unregistered Version - http://www.simpopdf.com
kiểm nghiệm thịt hộp và việc ngăn chặn các mầm gây hỏng hoặc ngộ độc thịt hộp cho người tiêu dùng.

3.4.4. Xúc xích, giò, lạp xường

Các sản phẩm này của thịt là những thực phẩm sẽ ăn trực tiếp không cần đun nấu lại, vì vậy yêu cầu vệ sinh cao, yêu cầu về nguyên liệu thịt cũng cao. Thịt dùng để làm xúc xích, lạp xường, giò là những loại thịt loại tốt, tươi, ngoài ra còn phải chú ý đến chất lượng của những nguyên liệu phụ như muối, bột, các gia vị...

- Thịt sau khi lọc xương hoặc xay có thể bị nhiễm *Escherichia coli, Escherichia paracoli, Bacterium facalis, Bacterium proteus,* các loại cầu khuẩn, bào tử của nấm mốc, xạ khuẩn...Thịt xay được ướp muối, muối ngấm vào thịt làm tăng áp suất thẩm thấu do đó làm ức chế hoạt động của VSV, một phần VSV bị chết, còn lại thường là *Bacterium subtilis, Bacterium mesentericus, Pseudomonas fluorescens,* các cầu khuẩn sinh màu, một số *Micrococcus* chịu được muối cao. Bào tử nấm mốc, xạ khuẩn và một số vi khuẩn gây bệnh có thể chịu được muối cao trong thời gian dài như vi khuẩn thương hàn, một số VSV trong thịt có hoạt tính enzym proteinaza và có khả năng làm thối thịt, nếu cho đường vào thịt muối, thịt sẽ mềm và tươi, dễ bị vi khuẩn lên men sinh axit, do đó kiềm chế được hoạt động của vi khuẩn gây thối.

Xúc xích hoặc thịt được xông khói sẽ tăng thêm mùi vị, khô mặt ngoài hoặc nhờ các hợp chất có trong khói làm ức chế hoặc giết được vi khuẩn. Trong xúc xích có thể gặp các VSV sinh bào tử : *Bacillus subtilis, Bacillus mesentericus, Bacillus megatherium, Bacillus mycoides.* Các vi khuẩn G^- *Bacterium faecalis...*

Xúc xích, lạp xường, giăm bông, giò chả... có một lượng nước không lớn (30-40%), có vỏ bọc, có các chất ức chế khuẩn nên có thể bảo quản được một thời gian.

- Trong quá trình bảo quản, các sản phẩm có thể bị hư hỏng, các dạng hỏng của chúng như sau :

+ Lên men chua : Thường thấy ở những sản phẩm có độ ẩm cao, chứa bột và có tạp chất thực vật. Các vi khuẩn lactic, trực khuẩn đường ruột *Clostridium perfringen* phân huỷ thành gluxit và axit lactic. Màu sắc, độ ẩm sản phẩm không thay đổi nhưng có vị chua, những chỗ thịt hở tiếp xúc với không khí có thể có màu xanh xám.

+ Thối rữa : Các vi khuẩn xâm nhập trong quá trình chế biến và phân huỷ gluxit, lipit, protein. Xúc xích xông khói ít bị thối rữa, vì khi đốt

Split Unregistered Version - http://www.simpopdf.com

đã ức chế vi khuẩn và che lấp mùi thối. Trường hợp bị thối thì phải qua kiểm nghiệm.

+ Đắng : Vị đắng là do *Bacterium prodigiosum, Endomyces lactis, Cladosprium butiric* gây ra. Trong quá trình này, chất béo phân li thành glixerin và axit béo. Những chất này lại bị oxi hoá thành andehit và xeton. Sản phẩm bị đắng, đồng thời có mùi hăng cay và chất béo trở nên vàng.

+ Mốc : Sản phẩm bị mốc, hoặc ngoài vỏ, hoặc bên trong sản phẩm. Sản phẩm bị mốc nên ăn ngay mà không nên bảo quản tiếp, nếu do mốc đen dạng chùm *Cladosporium gerbaum* (một loại mốc bất toàn có khả năng mọc sâu vào những lớp bên trong) thì ăn xúc xích có thể bị ngộ độc. Ngoài mốc còn có cầu khuẩn và nấm men làm cho xúc xích sinh ra lớp mốc. Các VSV này phát triển ngoài lớp vỏ và cho xúc xích một lớp màu xám, vàng kim hoặc đỏ. Chúng không xâm nhập vào bên trong, vì vậy không có tác hại như các mốc trên.

BẢNG 11.6. VI SINH VẬT GÂY HƯ HỎNG THỊT GIA CẦM VÀ TRỨNG

Thực phẩm	Hư hỏng	Vi sinh vật
Gia cầm	- Mùi hôi	- *Pseudomonas, Acinetobacter, Moraxella, Alcaligenes, Aeromonas, Alteromonas*
Trứng cả vỏ	- Thối đen	- *Proteus, Aeromonas*
	- Thối trắng (không màu)	- *Pseudomonas*
	- Chua	- *Pseudomonas*
	- Xanh trắng	- *Pseudomonas fluorescens*
	- Mốc	- *Một số dạng nấm*
	- Thối đỏ	- *Serratina marcescens*
	- Thối dạng kem	- *Citrobacter, Proteus, Enterobacter*
	- Thối vàng, xanh	- *Alcaligens, Flavobacterium, Cytophaga*
Trứng không có vỏ	- Mùi cá	- *Pseudomonas, Flavobacterium, Chromobacterium*
	- Mùi hôi, chua	- *Proteus, Alcaligens, Escherichia, Flavobacterium, Pseudomonas, Bacillus*
Lòng trắng trứng	- Mùi khó chịu	- *Pseudomonas, Acinetobacter, Enterobacter*

BẢNG 11.7. VI SINH VẬT GÂY HƯ HỎNG THỊT

Split Unregistered Version - http://www.simpopdf.com

Thực phẩm	Hư hỏng	Vi sinh vật
Thịt tươi làm lạnh (0 - 5°C)	- Mùi hôi nhớt biến đổi màu	- *Pseudomonas, Acromonas, Alcaligenes, Acinetobacter. Microbacterium, Alteromonas*
	- Thuỷ phân chất béo, mùi gây	- *Pseudomonas*, nấm men
	- Mốc	- *Penicillium*
	- Ria mèo	- *Thamnidium*
	- Đốm đen	- *Cladosporium*
	- Đốm trắng	- *Sporotrichum*
Thịt tươi (15 - 40°C)	- Hư hỏng xương	- *Clostridium*
	- Sinh khí	- *C. perfingens*
	- Mùi ươn	- *C. bifermentans, C. histolitinum, C.sporegenes*
Đóng gói chân không	- Chua, ngọt, đắng	- *Lactobacillus, Microbacterium, Enterobacter, Hafnia*
Thịt đã chế biến		
- Mỡ	- Vị fomat, chua, ôi khét	- *Micrococcus*
	- Biến đổi màu	- *Nấm mốc*
	- Hơi chua	- *Lactobacillus, Micrococcus, Vibrio, Alcaligenes, Corynobacterium*
- Đóng gói chân không	- Mùi bắp cải	- *Proteus inconstant*
	- Màu đục	- *Debaryomyces, Kloeckera*
- Thịt muối	- Bề mặt nhớt	- *Micrococcus, Microbacterium*, nấm men
- Jambon	- Sinh khí hay phồng	- *Clostridium*
	- Đổi màu xanh	- *Lactobacillus, Streptococcus, Leuconostoc*
	- Xương và thịt chua	- *Clostridium*
	- VSV phát triển trên bề mặt (jambon khô)	- *Moisissures*
	- Nhớt trên bề mặt	- *Micrococcus*, nấm men
	- Sinh khí	- *Lactobacillus*
- Xúc xích	- Đổi màu xanh	- *Lactobacillú viridescens, Leuconostoc*
	- Nhớt	- Nấm men
- Xúc xích lên men	- Đốm	- Nấm mốc
Đồ hộp		
- Đã tiệt trùng	- Sinh khí, thối	- *Sporeforme (Bacillus, Clostridium)*
- Bán tiệt trùng	- Chua, mất màu	- *Streptococcus*
	- Thối, sinh khí	- *Bacillus, Clostridium*

(Nguồn : Lê Xuân Phương)

and Split Unregistered Version - http://www.simpopdf.com

IV - VI SINH VẬT CỦA CÁ VÀ CÁC SẢN PHẨM CỦA CÁ

4.1. Hệ vi sinh vật cá

- Thịt của cá có thành phần như sau : Protein 12- 23%, chất béo 0,1 - 33%, nước 65 - 85%, chất khoáng, vitamin. Ở cá có đủ các thành phần cho VSV phát triển, đặc biệt là các VSV gây thối. Tất cả VSV ưa lạnh, gây thối của cá dễ thích ứng với nhiệt độ thấp trong bảo quản cá, cho nên cá bị phân huỷ ở nhiệt độ thấp hơn so với thịt của động vật máu nóng.

- Ngoài da cá bao giờ cũng có một lớp nhớt. Lớp nhớt này giàu protein và là môi trường dinh dưỡng tốt cho VSV phát triển. Số lượng VSV của cá mới bắt thường dao động rất lớn : từ 10 tế bào - 10 triệu tế bào/cm^2 bề mặt da cá, trực khuẩn *Micrococuss, Sarcina,* một số nấm mốc nấm men trong nước. Trong số những vi khuẩn thường gặp nhiều hơn cả là *Pseudomonas fluorescens, Liquefaciens, Proteus,* và nhóm *Escherichia coli.*

- Trong mang cá đặc biệt có nhiều VSV. Mang là cơ quan hô hấp của cá, ở đây liên quan đến sự hảo khí tích cực, với hàm lượng các chất hữu cơ và phản ứng kiềm nhẹ. Vì vậy ở trong mang cá có nhiều VSV ở nước và ở bùn, khi cá chết ta thấy VSV hảo khí phát triển khá nhiều ở mang, nhất là *Pseudomonas fluorescens, Liquefaciens.*

- Trong ruột cá thường thấy *Clostridium sporogens, Clostridium putrificus, Escherichia coli.* Ngoài ra còn các vi khuẩn gây ngộ độc thực phẩm *Salmonella* và *Clostridium* (đặc biệt là trong ruột cá tầm).

- Số lượng và thành phần các VSV phụ thuộc vào số lượng và thành phần hệ VSV nước. Trong mô và các tổ chức của cá thường có các loại vi khuẩn : *Sarcina flavs, Sarcina Alba, Micrococcus cereus...* các nấm mốc. Cá sống thường ít vi khuẩn, trong tế bào của cá sống thường có khả năng bảo vệ và miễn dịch, vì vậy các vi khuẩn gây thối rữa thường khó phát triển. Sự thay đổi chất lượng cá đặc biệt nhanh nếu như cá chết không lấy ruột ra, vì trong ruột cá có rất nhiều VSV. Sau khi cá chết, vi khuẩn phát triển mạnh và lây nhiễm từ ngoài da, từ mang theo các mạch máu, từ ruột tràn vào các tổ chức bên trong, vào các mô thịt cá rồi làm cá bị ươn và thối. Cá thối khi số lượng VSV 10^7 - 10^8 tế bào/g.

- Khi cá chết sẽ dần dần thay đổi trạng thái liên quan đến các quá trình tự phân và VSV học, đó là sự phân huỷ sâu sắc các chất gluxit và protein trong thịt cá làm cho cá bị thối rữa từ ngoài vào trong, pH của thịt cá chuyển sang kiềm, màu sắc thay đổi và có mùi khó chịu do sinh NH_3, H_2S, indola, scatola, mecaptan...

nd Split Unregistered Version - http://www.simpopdf.com

4.2. Các nguồn nhiễm vi sinh vật trong chế biến và bảo quản cá

- Sau khi bị bắt, cá sống thêm một thời gian rồi chết nhưng còn tươi, cá được chứa trong các dụng cụ chứa và chuyển đến nơi tiêu thụ hoặc chế biến, thời gian này hệ VSV cá không phát triển nhưng cá có thể bị nhiễm tạp khuẩn hoặc cả VSV gây bệnh từ dụng cụ chứa, nước rửa, không khí, nơi để cá. Vì vậy, việc làm thoáng khí nơi để cá rất cần thiết và sự thoáng khí thường xuyên cho phép làm sạch bụi và vi khuẩn ở trong không khí. Nước dùng để rửa cá phải sạch. Không được dùng lại nước rửa cá nhiều lần, đồ dùng chứa đựng chế biến cá phải sạch sẽ. Các nguyên liệu trong quá trình chế biến cũng là những nguồn nhiễm quan trọng như : dầu, muối, đường, gia vị. Trong cặn dầu, cần chú ý đến tụ cầu vàng *Staphilococcus aureus,* trong muối thường có 100-200 ngàn tế bào VSV khác nhau, thường có các VSV gây thối rữa ưa muối sống được ở nồng độ dung dịch muối cao và chỉ ngừng ở dung dịch bão hoà muối như : *Serrcia salinaria.*

- Cá trước khi đem bảo quản và chế biến cần phải rửa và moi ruột, đó là biện pháp sơ chế cần thiết nhằm làm giảm lượng VSV bị nhiễm ở cá, nhằm tăng thời gian bảo quản và chỉ tiêu vệ sinh cho cá. Đối với cá đem ướp chượp làm nước mắm, chỉ cần rửa sạch bùn bẩn và không cần moi ruột, vì cá ướp chượp cần tăng cường quá trình phân huỷ protein của cá, làm cá chóng ngấu, để rút ngắn thời gian ướp cũng như tổng thời gian làm nước mắm.

4.3. Các sản phẩm của cá

Cá dùng làm thực phẩm sau khi bắt vớt một thời gian ngắn hoặc được bảo quản và chế biến trong thời gian dài. Các sản phẩm cá bảo quản và đã được chế biến là cá ướp lạnh, cá lạnh đông, cá muối, cá khô, cá xông khói, cá hộp, nước mắm...

4.3.1. Cá ướp lạnh

- Cá ướp lạnh là cá được bảo quản ở nhiệt độ thấp và có thể giữ được phẩm chất của cá trong một thời gian. Đây là phương pháp phổ biến tương đối rộng rãi để bảo quản cá và thịt cũng như nhiều sản phẩm thực phẩm khác. Hệ VSV ở cá ướp lạnh không khác biệt về thành phần hệ VSV trong mô và các cơ quan của cá tươi, các VSV có những giới hạn cho sinh trưởng riêng của mình, theo các giới hạn đó chia VSV thành 3 nhóm :

+ VSV ưa lạnh.

nd Split Unregistered Version - http://www.simpopdf.com

+ VSV ưa ẩm.

+ VSV ưa nhiệt.

- Số lượng VSV ở cá có thể giữ nguyên hoặc giảm chút ít so với ở cá lúc ban đầu, sau đó một thời gian các VSV mới phát triển, thời gian này gọi là pha tiềm phát, pha này dài ngắn phụ thuộc vào thành phần VSV nhiễm ban đầu, vào điều kiện bên ngoài (nhất là độ nhiệt trong buồng lạnh). Trong số các VSV ở cá ướp lạnh, có ý nghĩa đặc biệt là nhóm ưa lạnh. Trong nhóm này ta thấy có vi khuẩn, xạ khuẩn, nấm men, nấm mốc. Chúng có thể sinh sản được ở -5^0C đến -8^0C, thậm chí cả -13^0C. Hạ nhiệt độ chỉ làm chậm sự phát triển của VSV ưa lạnh trên bề mặt cá và cũng chính vì thế mà cá được kéo dài thời gian giữ được phẩm chất, hay nói đúng ra, cá bị biến đổi phẩm chất tương đối chậm, các chất dinh dưỡng được giữ, ít thay đổi.

- Nhiệt độ thấp làm kìm hãm các quá trình biến đổi hoá sinh do enzym và do các VSV gây thối trong cá ướp lạnh. Bảo quản thực phẩm theo phương pháp này với nhiệt độ chưa tới băng điểm dịch bào của cá. Thường băng điểm dịch bào của cá thấp hơn 0^0C, vì trong dịch bào có chứa muối và như vậy làm hạ nhiệt độ đóng băng (băng điểm) kết tinh. Độ nhiệt thấp làm chậm các quá trình enzym và hạn chế hoạt động của các VSV bên trong cá, các quá trình phân huỷ cá ở điều kiện lạnh không phải dừng lại hoàn toàn, mà xảy ra chậm. Cá chỉ giữ được những chỉ tiêu phẩm chất ban đầu đến khi thấy mất đi những dấu hiệu cảm quan của cá tươi.

- Cá ướp lạnh có thể bị thối do các vi khuẩn ưa lạnh hảo khí gây ra, đó là : *Pseudomonas fluorescens, Bacterium putrificiens.* Ngoài vi khuẩn trong cá ướp lạnh còn thấy phát triển khá mạnh các loại nấm mốc : *Mucor stolonifer, Mucor mucedo, Aspergillus niger, Penicillium glaucum, Rhizopus.* Ngoài ra còn có những vi khuẩn ưa lạnh có khả năng phân huỷ chất béo làm hư hỏng cá có nhiều mỡ. Điều kiện vệ sinh cũng ảnh hưởng đến thời gian bảo quản.

4.3.2. Cá đông lạnh

- Cá bảo quản đông lạnh ở -12^0C đối với cá to và -16^0C cá nhỏ. Khi nhiệt độ xuống -8^0C thì 76-80% nước trong mô thịt cá đóng thành băng và cá trở nên cứng, không còn nước để xảy ra các quá trình dinh dưỡng và hoạt động sống của VSV. Trong thực tế, cá được bảo quản ở -18^0C đến -20^0C, ở khoảng nhiệt độ này vi khuẩn không phát triển, chính vì vậy mà

nd Split Unregistered Version - http://www.simpopdf.com
cá đông lạnh giữ được thời gian dài và phẩm chất ít bị biến đổi, song cần lưu ý : VSV trong cá vẫn sống ở điều kiện tiềm sinh (sống nhưng không hoạt động).

- Trong giai đoạn đầu của đông lạnh, phần lớn các VSV tự chết, số còn lại hầu như giữ nguyên không thay đổi sau khi làm đông lạnh tới hạn. Trên bề mặt cá biển và các dụng cụ chứa, không khí trong buồng lạnh...có thể tìm thấy *Sarcina*, trực khuẩn và nấm mốc *Micrococcus aurantiacus, Micrococcus flavus, Micrococcus roscus, Bacillus subtilis, Bacillus mesentericus, Pseudomonas, Escherichia coli*... Trong buồng lạnh, độ nhiệt tăng kéo theo sự tăng độ ẩm trên bề mặt của cá và sẽ tạo điều kiện thuận lợi cho sự phát triển của nhiều vi khuẩn và nấm mốc.

- Độ nhiệt trong buồng lạnh ổn định thì sự phát triển của VSV và các quá trình thối rữa của cá bị ngừng. Nhưng sau 2, 3 tháng bảo quản, trên cá có dấu hiệu thay đổi chất lượng. Những biến đổi này thường liên quan đến sự oxi hoá chất béo dưới da cá và các hoạt động enzym tác động lên protein trong mô thịt cá. Nguyên nhân của các hiện tượng hư hỏng cá là do các VSV có sức chịu đựng lớn với nhiệt độ thấp. Các VSV này là các cầu khuẩn, trực khuẩn sinh bào tử và không sinh bào tử, nấm mốc.

- Khi nhiệt độ tăng lên đến 0^0C, cá bắt đầu tan băng và kéo theo tổn thất dịch mô thịt cá, do các tế bào bị phá vỡ và dịch bào chảy ra ngoài, kéo theo phần lớn các chất dinh dưỡng. Vì vậy khi tan băng, nước đá chảy ra là môi trường rất tốt cho vi khuẩn phát triển, cá sau khi làm tan băng không được sử dụng ngay sẽ bị hư hỏng rất nhanh, không nên đưa lạnh đông trở lại. Cá khác với thịt ở chỗ : có khả năng hấp thụ được nước cốt bị tách ra khi làm tan băng, vì vậy để hạn chế sự mất mát các chất dinh dưỡng của cá lạnh đông, nên cho cá vào nước lã đã hoà tan muối. Cứ một lít nước cho một thìa con muối và ngâm cho đến khi cá trở lại trạng thái bình thường và đem sử dụng.

4.3.3. Cá muối

- Cá muối là một sản phẩm phổ biến và phương pháp muối cá được dùng từ thời cổ xa. Muối cá bằng cách rửa sạch, mổ, bóc mang rồi ngâm vào dung dịch muối ăn từ 5-20%. Dung dịch muối có khả năng tạo thành áp suất thẩm thấu cao (dung dịch 15-20% NaCl có P_{tt} trên 200atm). Vì vậy các tế bào VSV có xu hướng chảy dịch bào ra ngoài và dịch muối thâm nhập vào nội bào, tế bào bị teo nguyên sinh chất. Hiện tượng này làm cho VSV bị chết hoặc ngừng hoạt động.

Split Unregistered Version - http://www.simpopdf.com

BẢNG 11.8. ẢNH HƯỞNG CỦA NỒNG ĐỘ MUỐI TỚI SỰ PHÁT TRIỂN CỦA CÁC VI SINH VẬT GÂY THỐI RỮA

Vi sinh vật	Nồng độ NaCl làm VSV ngừng phát triển (%)
Cầu khuẩn gây thối	25
Bacillus mesentericus	10-15
Bacillus subtilis	10-15
Escherichia coli	6-8
Clostridium botulinum	6-7,5
Bacterium tiphi	8-10
Proteus vulgaris	7,5-10
Sarcina flava	10
Vi khuẩn cá muối	25
Aspergillus niger	17
Penicillium glacum	19-20

- Các vi khuẩn gây ngộ độc thực phẩm như : *Clostridium botulinum* và *Salmonella* bị ngừng phát triển ở dung dịch muối có nồng độ tương đối thấp, nhưng không bị chết ngay mà chúng còn tồn tại được trong thời gian dài. Ở nồng độ muối cao cũng không phá huỷ được độc tố của *Clostridium botulinum*. Nhiều vi khuẩn dần dần làm quen với muối và phát triển bình thường trong dịch muối như trong dịch không muối. Vì vậy trong cá muối thường thấy một số khá lớn vi khuẩn, ngoài ra còn có một số VSV ưa muối có sẵn hoặc từ muối, hoặc từ không khí, dụng cụ...rơi vào cá, làm hỏng cá muối.

Các VSV ưa muối này là *Serracia salinaria, Torula wemeri, Micrococcus rocus*...Chúng phát triển làm cho cá có một lớp màu hoặc vết đỏ làm cho cá bị mềm, bị nhớt. Các chất protein của cá bị phân huỷ thành NH_3, indola, scatola. Để tránh hiện tượng này, cần đem rửa qua nước sạch để loại bỏ các vết màu, sau đó ngâm vào dung dịch muối cao có từ 3-5% axit axetic. Axit axetic cùng muối làm cứng thịt cá, làm chết hoặc ngừng sự phát triển của VSV. Sau đó cá được đem dùng hoặc bảo quản. Trong cá muối còn thấy các nấm sinh màu nâu, làm hỏng cá.

- Trong quá trình muối cá có xảy ra sự biến đổi hoá sinh dưới tác dụng của enzym proteinaza và oxi hoá khử cũng như sự hoạt động của VSV có trong cá. Thịt của một số cá muối trở nên mềm, tươi ngon và có mùi thơm dịu, vì vậy cá muối loại này ta gọi là cá đã chín và có thể ăn trực tiếp, không cần nấu nướng.

Gần đây ở một số nước đã bảo quản cá bằng cách đóng bánh. Phương pháp đóng bánh đơn giản. Thịt cá đem xay nhỏ và ướp muối, sau đó đem

Split Unregistered Version - http://www.simpopdf.com
ép rồi phơi khô hoặc sấy khô. Bánh cá khi có muối có thể giữ được trong thời gian dài ngay cả trong khí hậu nhiệt đới. Trước khi nấu nướng, đem ngâm vào nước nóng để giảm mặn.

4.3.4. Cá khô

Cá được phơi khô hoặc sấy khô là một sản phẩm có thể bảo quản được lâu. Cá trước khi làm khô có thể ngâm muối 5-7%. Cá được làm khô đã làm giảm độ ẩm xuống rất thấp, do đó ức chế sự hoạt động và phát triển của VSV, trừ một số bào tử của vi khuẩn và của một vài nấm mốc. Độ ẩm của cá càng thấp, VSV càng khó phát triển vì giới hạn dưới về độ ẩm cho vi khuẩn có thể phát triển là 30%, nấm mốc là 15%, do đó cá khô có thể bảo quản được khá lâu trong điều kiện độ ẩm không khí phù hợp.

4.3.5. Cá ngâm dấm

- Cá ngâm dấm nhằm ức chế các VSV gây thối phát triển làm hỏng cá, các VSV này phát triển được ở môi trường trung tính hoặc hơi kiềm yếu. Dấm ăn là dung dịch axit axetic có nồng độ yếu (8-10%), dùng axit này tương đối rẻ và không độc. Trong ngâm dấm, cá được muối sơ bộ, cho thêm đường và gia vị, nồng độ axit trong dịch ngâm là 4-6% và trong thịt cá cần đạt tới 0,8-1,2%. Ngoài ra để bảo quản cá, người ta có thể áp dụng quá trình muối chua cá giống như muối dưa. Muối chua cá cần cho muối, đường và gia vị, đôi khi còn thêm natri benzoat (1g/1kg cá) để ức chế VSV gây thối. Quá trình này tạo điều kiện cho VSV lactic phát triển để sinh ra axit lactic, làm ức chế VSV gây thối, tạo vị chua, hương thơm cho cá muối.

- Hiện nay một số các nước còn dùng các chất sát khuẩn để bảo quản cá như axit salixilic (0,03-0,05%), axit benzoic (0,25%), axit boric (0,15%), H_2O_2 (0,1 - 0,2%), axit foocmic (0,1- 0,2%), các chất kháng sinh...Chất kháng sinh thường dùng là Oreomixin biomixin, cá ngâm vào dung dịch Oreomixin có nồng độ 30-100 phần triệu trong 1-5 phút, rồi lấy ra ướp với nước đá, có thể giữ được độ tươi của cá từ 5-10 ngày.

4.3.6. Cá hộp

- Cá hộp là sản phẩm của cá được đóng trong thùng sắt trong tráng vecni trắng, hoặc trong các bình thuỷ tinh kín và được xử lí ở nhiệt độ cao để diệt tất cả những VSV có trong cá. Cá trong hộp kín và ở trạng thái vô trùng nên bảo quản được lâu. Thường người ta thanh trùng ở 105 - 110^0C trong 30 phút hoặc 120^0C trong 20 - 30 phút. Tuy nhiên, thường có thể tồn tại một số bào tử của vi khuẩn chịu nhiệt cao. Mức độ nhiệt và thời gian thanh trùng cá hộp được xác định bằng nhiều điều kiện : thành phần hoá học của môi trường, pH môi trường, hàm lượng chất béo, nồng độ muối, số lượng và độ bền của bào tử cùng một loạt các nhân tố khác.

Split Unregistered Version - http://www.simpopdf.com

Trong thực tế thường dùng 112 - 120°C để thanh trùng với thời gian cần thiết phụ thuộc vào từng loại sản phẩm (nhiệt độ thấp, thời gian dài hơn).

Các loại sản phẩm cá đồ hộp thường là cá ngâm dầu, cá có muối, cá ngâm nước xốt cà chua... Người ta xác định rằng bào tử của vi khuẩn chịu nhiệt kém ở môi trường axit so với môi trường trung tính ; còn ở môi trường có dầu, mỡ thì độ bền với nhiệt lại tăng lên.Trong nước xốt cà chua có pH = 4,1 - 4,2 và trong cá hộp có pH = 4,5 hoặc thấp hơn, vi khuẩn *Clostridium botilium* không phát triển được

- Trong cá hộp có chất béo và protein, các phần tử của nó có thể bao quanh vi khuẩn và bảo vệ vi khuẩn khỏi bị chết khi gia nhiệt. Chính vì vậy mà nhiều hộp sau khi gia nhiệt vẫn còn tồn tại một số VSV như : *Bacillus subtilis, Bacillus mensentericus,* các vi khuẩn sinh bào tử chịu nhiệt, các bào tử của *Clostridium sporogenes, Bacillus themophilus anaerobicus,* có khi còn gặp bào tử của *Clostridium botulium,* thỉnh thoảng gặp các loài không sinh bào tử *Proteus vulgaris, Escherichia coli, Escherichia albus,* nấm mốc, nấm men...

Chính vì còn VSV yếm khí trong sản phẩm nên đồ hộp cá giữ một thời gian sẽ bị phồng, do hoạt động của chúng sinh ra H_2S và CO_2. Có trường hợp có thể không phồng, nhưng cá ở bên trong hư hỏng. Các VSV hảo khí không phát triển được trong hộp, vì ở trong hộp không có oxi.

4.3.7. Nước mắm

- Nước mắm được sản xuất bằng cách cho phân giải protein của cá dưới tác dụng của các enzym có sẵn trong thịt và ruột cá. Cho cá vào hũ sành với muối đầy đủ, phối trộn và để 6 - 12 tháng. Mắm cá đang muối được gọi là cá chượp. Khi chượp chín : đem lọc (hoặc đem nấu rồi lọc) ta được nước mắm.

- VSV có trong chượp và nước mắm có thành phần bao gồm : các loại có tác dụng trong quá trình phân giải protein, tạo hương vị cho nước mắm ; nhưng cũng có nhiều VSV gây thối rữa. Nước mắm có nồng độ muối khá cao (25 - 28%) nhưng vẫn có nhiều VSV. Điều đó có thể do nhiều nguyên nhân, trước hết là do VSV có khả năng hoạt động trong môi trường có nồng độ muối cao, mặt khác nước mắm là môi trường rất tốt cho VSV phát triển, trong đó có đủ các axit amin cần thiết và các sinh tố như B_1, B_2, PP và B_{12}. Tuy vậy nồng độ muối cao cũng có tác dụng ức chế rất mạnh nhiều hoạt động của VSV làm cho nước mắm lâu bị thối.

Trong nước mắm có chứa rất nhiều loại VSV như vi khuẩn hảo khí : gồm *Escherichia coli, Paracoli, Aerobacter, Bacillus subtilis...* ; vi khuẩn gây bệnh : với tỉ lệ 1% như *Staphilococcus aureus* ; vi khuẩn yếm khí :

Split Unregistered Version - http://www.simpopdf.com

Clostridium tonkimeirs, Clostridium welchii, Eubacterium ; nấm mốc : *Aspergillus, Penicillium, Mucor* ; nấm men : *Trichoderma, Tropicalis...*

- Sản xuất nước mắm : Nguyên liệu chủ yếu là cá và muối. Cá đem rửa sạch, để ráo nước và ướp muối, hàm lượng muối là 18-28%. Trong phương pháp làm mắm thủ công, quá trình này thường kéo dài 12-24 tháng để làm chuyển hoá protein của cá thành axit amin, rồi đem lọc và nấu nước mắm. Còn trong công nghiệp thường sử dụng các loại chế phẩm có enzym proteinaza để chuyển hoá protein thành axit amin, thời gian chỉ cần 10-12 ngày, nhưng hương vị nước mắm kém hơn so với phương pháp thủ công.

4.3.8. Cá hun khói

- Cá dùng để hun khói có thể là các loại : cá hồng, cá ngừ, cá thu, cá trắm, cá chép. Sau khi xử lí bỏ đầu, vây, vảy, nội tạng..., cá được rửa sạch. Nếu cá to thì lọc lấy hai lườn, cá nhỏ thì để nguyên con. Đem ướp muối cá, tuỳ theo kích thước, tính chất nguyên liệu, tỉ lệ ướp khác nhau sao cho đạt độ mặn 1,5-2%. Sau đó đem hun khói cá, bằng cách : Cá sau khi ướp muối được treo vào các móc treo ở phòng hun, cá nhỏ thì xếp vào khay cách nhau đều đặn để khói bám đều. Nhiệt độ hun khói khoảng 40^0C đối với hun khói nguội và 120-140^0C đối với hun khói nóng. Thời gian hun khói nguội khoảng 7-8 ngày, còn hun khói nóng là 2-4 giờ.

- Yêu cầu của sản phẩm :

+ Hun khói nguội phải có hàm lượng nước là 45-52%, muối 6-12%.

+ Hun khói nóng phải có hàm lượng nước là 65-70%, muối 2-4%.

Nhiên liệu để hun khói cá là khói gỗ hay khói mùn cưa, lõi ngô, trấu, vỏ bào có tác dụng sát trùng và tạo mùi vị đặc trưng cho sản phẩm. Khói ngấm vào cá sau khi hun thường có thành phần : 1-34mg% các hợp chất phenol, 5-13mg% foocmaldehit, 5-15mg% các axit bay hơi, 0,2-2mg% các hợp chất xêton.

Không nên dùng các loại gỗ mùn, gỗ có dầu để tạo khói. Độ ẩm cần thiết của nhiên liệu 25-30%, nếu độ ẩm thấp hơn thì khói ít, ẩm quá thì nhiều khói, sản phẩm có vị đắng.

V – VI SINH VẬT TRÊN TÔM, MỰC VÀ CÁC ĐỘNG VẬT NHUYỄN THỂ

5.1. Hệ vi sinh vật trên tôm

5.1.1. Đặc điểm của tôm

Tôm là động vật giáp xác phân bố rất rộng. Tôm rất nhiều giống, loài khác nhau, nhưng đều có một đặc điểm chung là : toàn bộ cơ thể được

Split Unregistered Version - http://www.simpopdf.com
bao phủ bởi lớp kitin cứng nên sự lây nhiễm của VSV vào tôm lúc còn sống cũng như sau khi đánh bắt khó hơn thịt, cá. Bên cạnh đó thì thành phần hoá học của tôm rất thích hợp cho VSV phát triển.

Qua nghiên cứu, Stepahue cho chúng ta thấy rằng tôm có thành phần protein 19-23%, lipit 0,6-1,6%, nước khoảng 73%, nhiều nguyên tố vi lượng và các vitamin nhóm B (B_1, B_2, B_6 và B_{12}). Ngoài ra khi phân tích các axit amin, người ta thấy rằng, trong tôm chứa 18-21 axit amin và hầu như có đủ các axit amin không thay thế, cấu tạo cơ tôm rất lỏng lẻo, lượng đạm hoà tan nhiều. Những đặc điểm trên làm cho dinh dưỡng của tôm có giá trị rất cao về mặt xuất khẩu. Nhưng cũng do đặc điểm trên, sau khi đánh bắt, tôm rất mau chết và mau ươn thối. Một trong những điều kiện bất lợi gây nên sự hư hỏng của tôm là nội tạng của tôm tập trung ở đầu và cũng là nơi chứa nhiều đạm hoà tan nhất.

5.1.2. Hệ vi sinh vật của tôm và các dạng hư hỏng

Hệ VSV trên tôm bao gồm 2 nguồn gốc :

- Có sẵn trong tôm trước khi đánh bắt.

- Lây nhiễm từ không khí, đất trong quá trình vận chuyển, đánh bắt, thô sơ chế. Nhìn chung VSV trong tôm cũng như VSV trên cá chủ yếu là nhóm VSV gây thối rữa. Qua nghiên cứu người ta thấy rằng, tôm sau khi đánh bắt 4-8h thường xảy ra sự biến đen và biến đỏ. Khi tôm đã biến đỏ thì bao giờ cũng kèm theo sự thối rữa.

a) *Sự biến đỏ của tôm*

Khi tôm bị ươn thối bao giờ cũng kèm theo sự biến đỏ. Biến đỏ cũng còn xảy ra khi tôm tươi gia nhiệt, bảo quản tôm trong môi trường axit hoặc tôm ngâm trong rượu. Cơ chế của sự biến đỏ được giải thích như sau : Tôm tươi có vỏ và thịt chứa astaxanthin (màu xanh tím), bình thường astaxanthin kết hợp với protein tạo thành phức bền, nhưng dưới tác dụng của nhiệt độ, sự phân huỷ của thịt tôm (do thối rữa) làm cho phần protein bị tách ra và khi bị tách ra khỏi phức chất, astaxanthin dễ bị oxi hoá tạo thành astaxin màu đỏ gạch.

Sự biến đỏ của tôm còn phụ thuộc vào phương pháp bảo quản cũng như điều kiện môi trường bảo quản, đặc biệt nếu để tôm ở nhiệt độ 30-40^{0}C, thì sự biến đỏ xảy ra rất nhanh. Kèm với sự biến đỏ là sự giảm chất lượng của tôm bằng quá trình thối rữa protein.

Protein → peptone → peptit → axit amin → sản phẩm cấp thấp (NH_3, H_2S, indol, skatol, cadaverin, mercaptal..).

b) *Sự biến đen của tôm biển*

Hiện tượng biến đen của tôm hiện nay vẫn còn nhiều ý kiến khác nhau. Có tác giả cho rằng, hiện tượng biến đen ở tôm là do vi khuẩn lây

Split Unregistered Version - http://www.simpopdf.com
nhiễm vào tôm, chúng sinh sôi nảy nở trong tôm và phát triển thành các khuẩn lạc màu đen. Có tác giả khác lại cho rằng, sự biến đen của tôm là do tirozin có trong tôm bị oxi hoá dưới sự xúc tác của tirozinaza để tạo thành chất màu tối melanin ; melanin tích dần lại trên cơ thể tôm và tạo thành chất đen. Hiện tượng biến đen chỉ làm giảm giá trị của tôm về mặt cảm quan, còn chất lượng thì vẫn bảo đảm.

Ngoài ra cũng có tác giả cho rằng, những chấm đen có trên tôm là do fenylalamin tham gia oxi hoá tạo thành những sợi, nhiều sợi này tập hợp lại thành chất màu tối melanin.

5.1.3. Phương pháp bảo quản tôm

- Để bảo đảm độ tươi của tôm, người ta thường dùng các phương pháp sau đây :

+ Dùng nhiệt độ thấp, chủ yếu là phương pháp ướp đông.

+ Dùng nhiệt độ lạnh kết hợp với hoá chất. Các hoá chất thường dùng là : $Ca(OCl)_2$ với nồng độ 30-40ppm, Na_2SO_3 1,0%.

Để các hoá chất phát huy hết tác dụng, người ta thường cho vào một ít axit xitric tạo pH trong môi trường là 5.

- Ngoài ra người ta có thể đóng hộp và phơi khô tôm.

5.2. Hệ vi sinh vật trên mực và các dạng hư hỏng

5.2.1. Đặc điểm của mực

Mực là động vật chân đầu phân bố rất rộng trong biển. Toàn bộ cơ thể có lớp da bao phủ, bên trong lại có màng dai và màng mực che chở. Vì thế mực ít bị lây nhiễm VSV trong quá trình sinh sống. Nhưng trên da mực lại có nhiều chất nhớt, là nơi cư trú rất tốt cho VSV, đặc biệt là sau khi chết, mực lại tiếp tục tiết chất nhớt, là môi trường thuận lợi để VSV lây nhiễm trong quá trình chuyên chở, sơ chế. Về thành phần hoá học thì mực cũng là một thực phẩm giàu dinh dưỡng : protein của mực 17-18,8%, lipit 0,2-0,5%, nước 78-80%, tro 1,2-1,7%. Cấu tạo cơ mực chặt chẽ hơn cá và tôm, vì thế sau khi đánh bắt, mực lâu ươn thối hơn cá và tôm.

5.2.2. Dạng hư hỏng của mực

Dạng hư hỏng chủ yếu của mực là thối rữa, ngoài ra mực còn hình thành các vết màu (vàng, đỏ đối với mực nang ; đỏ và xanh đối với mực ống phơi khô).

Cơ chế của quá trình thối rữa mực giống với cơ chế quá trình thối rữa cá, thịt. Còn sự hình thành vết mực của mực nang là do các phản ứng sinh hoá xảy ra ; vết đỏ và xanh của mực phơi khô là do vi khuẩn và nấm mốc gây ra.

Split Unregistered Version - http://www.simpopdf.com

5.2.3. Phương pháp bảo quản mực

Phương pháp chủ yếu là đông lạnh và phơi khô.

5.3. Hệ vi sinh vật trên động vật thân mềm và các dạng hư hỏng

5.3.1. Đặc điểm của động vật thân mềm

Đặc điểm nổi bật của thân mềm là có vỏ cứng bằng vôi bao phủ, phần ăn được chiếm khoảng 30-40%, lượng nước chiếm tới gần 80%, protein 17-19%, gluxit 2-10%, lipit 0,2-0,4% (còn thay đổi tuỳ giống loài). Cấu tạo cơ lỏng lẻo nên là thực phẩm dễ tiêu. Đây cũng chính là yếu tố dẫn đến động vật thân mềm dễ bị hư hỏng.

5.3.2. Các dạng hư hỏng

Sự hư hỏng của động vật thân mềm chủ yếu là quá trình thối rữa, ngoài sản phẩm cấp thấp như ở cá, tôm, mực, thịt, còn có các axit nên tạo thành mùi hôi thối khó chịu. Ngoài ra khi ướp đông, thịt của động vật thân mềm thường biến thành màu vàng do quá trình oxi hoá.

5.3.3. Phương pháp bảo quản

Người ta thường bảo quản động vật thân mềm bằng đông lạnh, đóng hộp, phơi khô và chế biến thành các món ăn.

BẢNG 11.9. VI SINH VẬT GÂY HƯ HỎNG HẢI SẢN

Thực phẩm	Hư hỏng	Vi sinh vật
Cá tươi	- Mùi ươn	- *Pseudomonas, Alteromonas, Alterobacter*
	- Mùi quả	- *Vibrio, Aeromonas, Moraxella, Proteus*
	- Mùi amoniac	- *Pseudomonas, Alteromonas*
	- Mùi H_2S	- *Pseudomonas, Alteromonas*
- Ướp muối	- Hồng	- *Halobacterium, Halococcus*
	- Nâu	- *Hemispora stellata*
	- Vị fomat, thối	- Vi khuẩn đỏ ưa mặn
Tôm hùm	- Từ tươi chuyển sang ươn	- *Pseudomonas, Lactobacillus, Coryneformes*
Sò	- Hồng	- Nấm men (*Rhodotorula*)
Tôm	- Mùi ươn	- *Pseudomonas*
Mực	- Màu vàng	- *P. putida*
	- Màu đỏ	- *Serratiaa marcescens*

(Nguồn : Lê Xuân Phương)

HƯỚNG DẪN ÔN TẬP

1. Nắm chắc sự lây lan, xâm nhập của VSV vào các loại thực phẩm rau, quả.
2. Các nhóm VSV chính làm hư hỏng, rau quả, thịt, cá, tôm, mực và các biện pháp phòng chống.
3. Chế biến rau, quả, thịt, cá, tôm, mực và các loại thực phẩm khác.

Split Unregistered Version - http://www.simpopdf.com

Bài 1
TRANG THIẾT BỊ CẦN THIẾT NGHIÊN CỨU VI SINH VẬT VÀ QUAN SÁT HÌNH THÁI VI SINH VẬT

I - MÁY MÓC

Máy móc trong phòng thí nghiệm dùng để nghiên cứu về VSV có nhiều loại, nhưng có một số loại rất cần thiết, phải dùng thường xuyên, do đó cần hiểu biết và nắm vững phương pháp sử dụng.

1.1. Tủ nuôi cấy vi sinh vật

Tủ ấm là thiết bị quan trọng dùng trong công tác nghiên cứu VSV, vì nhiệt độ trong tủ có thể thay đổi từ 0^0 – 80^0C, tuỳ theo ý muốn của người nghiên cứu và nhiệt độ trong tủ sau khi đã được xác định thì luôn luôn ở trạng thái ổn định trong suốt thời gian nuôi cấy.

Cách sử dụng :

Sau khi đóng mạch điện, xoay núm điều chỉnh nhiệt độ lớn cho kim chỉ tới nhiệt độ cần thiết, thí dụ để ở 37^0C, sau đó phải điều chỉnh kim ở núm điều chỉnh nhiệt độ nhỏ về số 0. Nhiệt độ trong tủ ấm tăng dần và đạt tới nhiệt độ trong phạm vi đã xác định. Nếu như nhiệt độ trong tủ tăng cao hoặc thấp hơn nhiệt độ xác định một vài độ thì phải dùng núm điều chỉnh nhiệt độ nhỏ để điều chỉnh giảm hay tăng một vài độ trên bảng chia độ. Theo dõi nhiệt kế cắm trên tủ ấm, nếu thấy có sự tăng, giảm thì lại điều chỉnh lần nữa cho tới khi đạt yêu cầu.

Khi đang có điện đốt nóng thì đèn đỏ bật sáng, khi nhiệt độ đã đạt yêu cầu rồi thì bộ phận cảm nhiệt làm việc và báo cho rơle điều chỉnh hoạt động, mạch bị ngắt, đèn xanh bật sáng, đèn đỏ tắt. Quá trình tiếp diễn liên tục như vậy trong suốt thời gian tủ làm việc để duy trì nhiệt độ.

1.2. Tủ sấy khô

1.2.1. Công dụng

Dùng tủ sấy khô dùng để khử trùng các dụng cụ thủy tinh, đồ sứ, như ống nghiệm, ống tiêm, ống hút, hộp lồng, cốc, phễu, cối, chày sứ, các đồ kim khí như dao, kéo, cặp sắt thẳng và tất cả các đồ linh tinh không có

Split Unregistered Version - http://www.simpopdf.com
nước khác như bông, băng, vải, ; còn cao su và môi trường nuôi cấy không được dùng tủ sấy khô để tiêu độc.

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

1.2.2. Cách sử dụng tủ sấy khô

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

1.3. Nồi hấp hơi nước cao áp

1.3.1. Nguyên lí

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

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

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

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

Split Unregistered Version - http://www.simpopdf.com

- Để loại bỏ hết không khí trong nồi ra có 2 cách :

+ Đóng khóa thoát hơi để tăng áp lực trong nồi lên đến khoảng 0,3atm rồi xì cho thoát hết hơi ra, sau đó khóa lại và cho tăng áp lực.

+ Mở khóa thoát hơi và đun cho đến khi hơi nước bắt đầu thoát ra thành một luồng hơi trắng khá mạnh, khá đều thì đóng lại và cho tăng áp lực.

1.3.2. Cách sử dụng nồi hấp cao áp

- Đổ nước vào nồi hấp với lượng vừa đủ (xem ở vạch ngang ghi trên một ống thủy tinh lắp bên ngoài nồi hấp).

- Các dụng cụ đem hấp phải được bao gói kĩ, đối với các bình và ống môi trường có nút bông phải bọc bằng giấy dầu để tránh hơi nước đọng làm ướt nút.

- Khi sắp xếp dụng cụ vào nồi hấp không nên để sát nhau quá, để vật nặng xuống dưới, vật nhẹ lên trên.

- Đậy nắp, khóa chặt các ốc theo từng đôi đối xứng nhau để khỏi vênh, khỏi hở, khi tháo khóa cũng phải làm như vậy.

- Mở mạch điện hoặc đốt nhiên liệu để đun sôi nước trong nồi, trong khi hấp phải luôn luôn có mặt để theo dõi kim chỉ áp lực trên đồng hồ áp lực kế. Loại hết không khí trong nồi theo 2 phương pháp đã nêu trên. Khi đạt tới mức cần thiết thì xoay núm điện hoặc điều chỉnh nguồn nhiệt để duy trì áp lực không đổi trong một khoảng thời gian cần thiết (người ta thường sử dụng áp lực 1atm và giữ trong khoảng 20 phút thì nha bào của một số loại vi khuẩn cũng sẽ bị tiêu diệt).

- Khi đạt tới thời gian cần thiết thì ngắt điện hoặc rút hết nhiên liệu ra và đợi cho áp lực hạ dần xuống 0, nhiệt độ trong nồi giảm hẳn rồi mới được mở nắp lấy dụng cụ đã khử trùng ra. Chú ý tránh hạ áp lực đột ngột bằng cách mở van xì hơi ra quá mạnh sẽ làm rạn nứt hoặc vỡ dụng cụ. Cũng không nên để nồi hấp nguội lạnh mới lấy dụng cụ ra, vì lúc này nắp nồi sẽ mút chặt vào miếng đệm cao su, rất khó mở.

- Các dụng cụ lấy ra không được để ở nền gạch men, nền đá, nền xi măng (vì dụng cụ đang nóng gặp lạnh sẽ vỡ, nứt).

1.4. Những thiết bị cần thiết khác

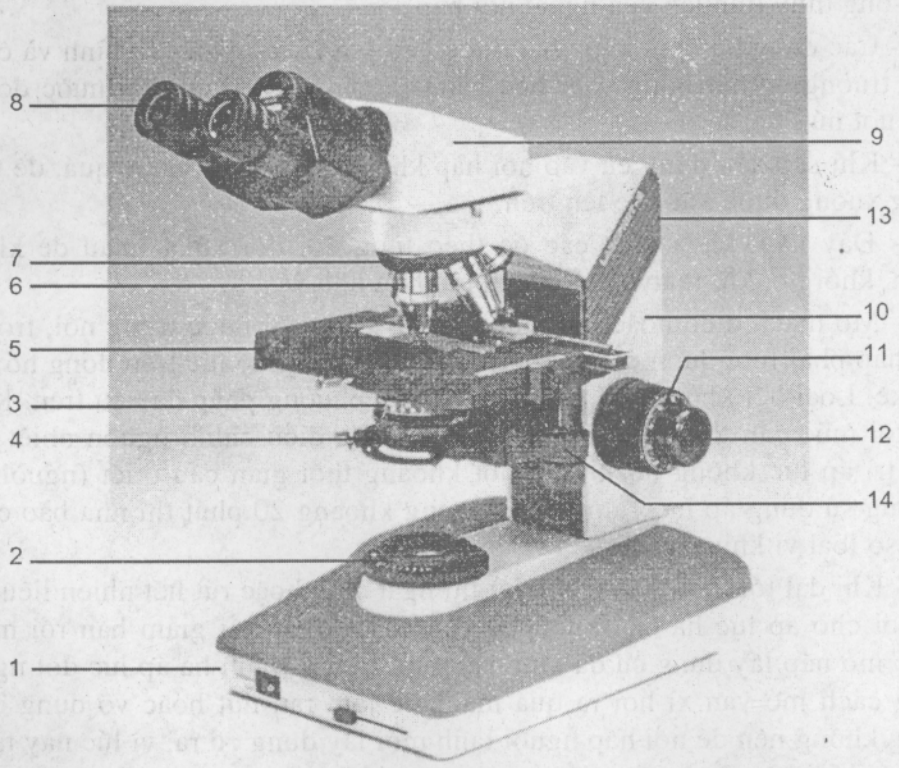
- Máy hút chân không.
- Máy đếm khuẩn lạc.
- Máy đo pH hay hộp đo pH.
- Nồi cất nước.
- Máy đánh tế bào.
- Máy đếm tế bào.

Split Unregistered Version - http://www.simpopdf.com

- Máy lắc.
- Phòng hoặc buồng vô trùng.
- Tủ lạnh.
- Máy li tâm.

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

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



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

2.1. Bộ phận cơ

2.1.1. Chân kính hay đế kính

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

2.1.2. Thân kính

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

Split Unregistered Version - http://www.simpopdf.com

2.1.3. Ống kính

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

2.1.4. Khay kính hay đĩa kính

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

2.1.5. Ốc điều chỉnh

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

2.2. Bộ phận quang kính

2.2.1. Gương phản chiếu

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

2.2.2. Tụ quang kính

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

2.2.3. Bộ phận chắn sáng

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

2.2.4. Vật kính

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

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

Split Unregistered Version - http://www.simpopdf.com

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

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

2.2.5. Thị kính

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

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

2.3. Cách sử dụng kính hiển vi

2.3.1. Kiểm tra kính hiển vi

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

2.3.2. Quan sát tiêu bản bằng vật kính khô

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

2.3.3. Quan sát tiêu bản nhuộm với vật kính dầu

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

Split Unregistered Version - http://www.simpopdf.com

2.4. Cách bảo quản kính hiển vi

- Không được sờ tay vào đầu vật kính và thị kính, nếu bẩn có thể dùng vải mềm hoặc giấy lau kính để lau. Vật kính dầu dùng xong, lấy vải mềm mịn hay giấy lau sạch dầu bạch hương ở đầu vật kính, sau đó tẩm xylon vào vải mềm mịn hay giấy lau cho hết dầu (xylon có tác dụng làm tan dầu bạch hương). Cuối cùng lau lại một lần nữa bằng vải mềm, mịn hay giấy mềm.

- Khi dùng xong phải xoay các bộ phận của kính về đúng chỗ quy định, không được để vật kính nằm trong trục kính như lúc quan sát mà phải xoay vật kính ra hai bên và vặn cho áp sát xuống đĩa kính, tụ quang hạ thấp xuống, gương phản chiếu xoay dọc thân kính. Toàn bộ kính đều coi như ở trạng thái nghỉ.

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

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

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

- Để nghiên cứu hình thái, cấu tạo đặc biệt của VSV như giáp mô, nha bào.

- Để phân loại VSV căn cứ vào tính chất bắt màu gram, tính chất kháng cồn, kháng toan.

- Để dễ có thể phân biệt và quan sát được các vi cấu tạo trong tế bào VSV.

- Để bảo tồn tiêu bản trong một thời gian dài, để chụp ảnh.

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

2.1. Chuẩn bị phiến kính

- Chọn phiến kính trong, sạch, không mờ, không có dầu mỡ, đã được ngâm trong cồn, khi dùng lau khô bằng vải mềm và hơ qua trên ngọn lửa đèn cồn.

- Dùng bút chì mỡ khoanh một vòng ở mặt dưới phiến kính.

Split Unregistered Version - http://www.simpopdf.com

2.2. Phết mẫu vật

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

2.3. Sấy khô tiêu bản : Có 2 cách :

- Để tự khô ở nhiệt độ phòng thí nghiệm.

- Hơ cao trên ngọn lửa đèn cồn, không để sát tiêu bản vào ngọn lửa, nóng quá, thân VSV sẽ co quắp lại, protein trong nguyên sinh chất đông nhanh, ảnh hưởng đến hình thái.

2.4. Cố định tiêu bản

- Cố định tiêu bản có 3 mục đích :

+ Giết chết VSV để việc sử dụng không gây nguy hiểm.

+ Làm cho VSV gắn chặt vào phiến kính, khi rửa nước không bị trôi đi.

+ Làm cho VSV bắt màu tốt hơn (protein chết bắt màu tốt hơn protein sống).

Có thể cố định bằng phương pháp sau đây :

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

III - PHƯƠNG PHÁP NHUỘM TIÊU BẢN

3.1. Thuốc nhuộm đơn và các phương pháp nhuộm đơn

3.1.1. Dung dịch fucxin (fuchsine) trong axit phenic

- Chuẩn bị thuốc nhuộm :

Fucxin kiềm	1g
Cồn nguyên chất hay 96°	10ml
Axit phenic kết tinh	5g
Nước cất	100ml

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

Split Unregistered Version - http://www.simpopdf.com
Khi dùng nhuộm đơn hoặc nhuộm Gram thì đem pha loãng dung dịch này gấp 10 lần với dung dịch axit phenic 5% :

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

- Phương pháp nhuộm đơn :

+ Nhỏ thuốc nhuộm lên tiêu bản đã cố định, để 1 - 2 phút.

+ Rửa nước, để vòi nước từ từ chảy xuống một đầu phiến kính cầm hơi nghiêng đến khi nước trong là được.

+ Thấm khô bằng giấy thấm hay bằng hơi nóng.

+ Quan sát trên kính hiển vi.

3.1.2. Dung dịch xanh metilen trong axit phenic

- Chuẩn bị thuốc nhuộm :

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

Cách pha giống như fucxin ở trên.

- Phương pháp nhuộm cũng giống nhuộm fucxin.

3.2. Phương pháp nhuộm gram (nhuộm kép)

3.2.1. Phương pháp nhuộm gram

- Chuẩn bị thuốc nhuộm :

+ Dung dịch tím gentian trong axit phenic :

Tím gentian	1g
Cồn 96°	10ml
Axit phenic kết tinh	5g
Nước cất	100ml

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

+ Dung dịch fucxin trong axit phenic (như phần 3.1.1.)

+ Pha dung dịch lugol :

Kali iôđua	1g
Iốt tinh thể	0,5g
Nước cất	150ml

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

Split Unregistered Version - http://www.simpopdf.com

- Pha dung dịch tẩy màu cồn axeton:

Cồn nguyên chất	5 phần
Axeton	1 phần

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

- Phương pháp nhuộm gram :

1) Nhỏ dung dịch tím genxian lên tiêu bản 1-2 phút.

2) Rửa nước nhanh, thấm khô nước.

3) Nhỏ dung dịch lugol để 1 phút (tiêu bản có màu nâu đen).

4) Rửa nước nhanh, thấm khô nước.

5) Nhỏ cồn axeton từ đầu phiến kính, nghiêng phiến kính cho cồn chảy qua chỗ phết VSV.

6) Rửa nước nhanh.

7) Nhỏ dung dịch fucxin loãng, để 1 phút.

8) Rửa nước.

9) Thấm khô - Hơ khô - Xem kính.

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

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

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

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

Bài 3
ĐẾM SỐ LƯỢNG TẾ BÀO VI SINH VẬT

I - PHƯƠNG PHÁP ĐẾM BẰNG BUỒNG ĐẾM HỒNG CẦU

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

t Unregistered Version - http://www.simpopdf.com

1.1. Chuẩn bị

- Pha loãng mẫu VSV : tùy theo số lượng VSV nhiều hay ít mà pha loãng thành các hệ số 10, 100, 1000, 10.000, 100.000, 1000.000, 10.000.000.

- Dùng buồng đếm hồng cầu (Gô-ri-a-ep) có khắc : 0,1mm × 1/400 mm^2.

- Đậy lá kính mỏng lên chỗ có khắc ở giữa buồng đếm.

- Đưa buồng đếm đặt lên khay kính hiển vi, rồi tìm những ô vuông nhỏ trong buồng đếm bằng vật kính số 8.

- Để yên buồng đếm, xoay vật kính ra, dùng ống hút Pasteur hút canh trùng đã pha loãng và nhỏ vào khoảng giữa lá kính với buồng đếm. Để yên vài phút nếu không thấy có bọt khí ở khu vực buồng đếm, thì có thể bắt đầu đếm.

- Xoay vật kính vào, tùy theo VSV loại nhỏ hay to mà dùng các vật kính số ×40 ; ×20 hay ×8.

- VSV hiện lên trong buồng đếm như những chấm đen hoặc trong sáng, có chuyển động phân tử, đếm lần lượt số VSV trong 16 ô vuông nhỏ của một ô vuông to và đếm tất cả 5 ô vuông to tức là đếm (16 × 5) = 80 ô vuông nhỏ.

- Nguyên tắc đếm từ trái qua phải và từ trên xuống dưới mới không bị nhầm lẫn vì số lượng tế bào trong 1 ô vuông có thể rất nhiều.

1.2. Phương pháp tính số lượng vi sinh vật

Lấy tổng số VSV đếm được trong 80 ô vuông nhỏ, chia cho 80 để tính số bình quân tế bào VSV đếm được trong 1 ô vuông nhỏ. Diện tích phần kính có khắc là 1mm^2, trong đó có tất cả 25 ô vuông to, mỗi ô vuông to có 16 ô vuông nhỏ, như vậy có tất cả 400 ô vuông nhỏ (25 × 16). Vậy diện tích một ô vuông nhỏ ta đếm là 1/400mm^2. Khoảng cách từ chỗ có khắc của kính đến lá kính mỏng là 0,1mm. Như vậy số tế bào VSV đếm được trong một ô vuông nhỏ chính là số tế bào VSV có trong 1/4000mm^3 canh trùng. Do đó muốn tính số lượng tế bào VSV trong 1ml canh trùng (1cm^3 = 1000mm^3) thì nhân số lượng tế bào vi sinh vật trong một ô nhỏ với 1000. Nếu canh trùng pha loãng với hệ số bao nhiêu thì lại nhân với hệ số pha loãng đó.

Có thể tóm tắt công thức tính như sau :

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

Split Unregistered Version - http://www.simpopdf.com

1.1. Chuẩn bị

- Pha loãng mẫu VSV : tùy theo số lượng VSV nhiều hay ít mà pha loãng thành các hệ số 10, 100, 1000, 10.000, 100.000, 1000.000, 10.000.000.

- Dùng buồng đếm hồng cầu (Gô-ri-a-ep) có khắc : 0,1mm × 1/400 mm^2.

- Đậy lá kính mỏng lên chỗ có khắc ở giữa buồng đếm.

- Đưa buồng đếm đặt lên khay kính hiển vi, rồi tìm những ô vuông nhỏ trong buồng đếm bằng vật kính số 8.

- Để yên buồng đếm, xoay vật kính ra, dùng ống hút Pasteur hút canh trùng đã pha loãng và nhỏ vào khoảng giữa lá kính với buồng đếm. Để yên vài phút nếu không thấy có bọt khí ở khu vực buồng đếm, thì có thể bắt đầu đếm.

- Xoay vật kính vào, tùy theo VSV loại nhỏ hay to mà dùng các vật kính số ×40 ; ×20 hay ×8.

- VSV hiện lên trong buồng đếm như những chấm đen hoặc trong sáng, có chuyển động phân tử, đếm lần lượt số VSV trong 16 ô vuông nhỏ của một ô vuông to và đếm tất cả 5 ô vuông to tức là đếm (16 × 5) = 80 ô vuông nhỏ.

- Nguyên tắc đếm từ trái qua phải và từ trên xuống dưới mới không bị nhầm lẫn vì số lượng tế bào trong 1 ô vuông có thể rất nhiều.

1.2. Phương pháp tính số lượng vi sinh vật

Lấy tổng số VSV đếm được trong 80 ô vuông nhỏ, chia cho 80 để tính số bình quân tế bào VSV đếm được trong 1 ô vuông nhỏ. Diện tích phần kính có khắc là $1mm^2$, trong đó có tất cả 25 ô vuông to, mỗi ô vuông to có 16 ô vuông nhỏ, như vậy có tất cả 400 ô vuông nhỏ (25 × 16). Vậy diện tích một ô vuông nhỏ ta đếm là $1/400mm^2$. Khoảng cách từ chỗ có khắc của kính đến lá kính mỏng là 0,1mm. Như vậy số tế bào VSV đếm được trong một ô vuông nhỏ chính là số tế bào VSV có trong $1/4000mm^3$ canh trùng. Do đó muốn tính số lượng tế bào VSV trong 1ml canh trùng ($1cm^3 = 1000mm^3$) thì nhân số lượng tế bào vi sinh vật trong một ô nhỏ với 1000. Nếu canh trùng pha loãng với hệ số bao nhiêu thì lại nhân với hệ số pha loãng đó.

Có thể tóm tắt công thức tính như sau :

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

Split Unregistered Version - http://www.simpopdf.com

II - PHƯƠNG PHÁP ĐẾM TRÊN ĐĨA THẠCH

Dùng phương pháp này chỉ cho biết số VSV sống trong môi trường.

Số lượng VSV được tính gián tiếp theo một công thức tính dựa trên số khuẩn lạc đếm được khi cấy chúng trên đĩa thạch petri.

2.1. Các bước chuẩn bị

- Pha loãng canh trùng định đếm từ hệ số thấp đến hệ số cao từ 1/10, 1/100, 1/1000, 1/10.000, 1/100.000...

- Lấy pipet vô trùng, hút mỗi nồng độ pha loãng 0,1ml (mỗi nồng độ một pipet riêng), nhỏ vào đĩa thạch petri đã chuẩn bị sẵn, mỗi nồng độ cấy vào 3-5 đĩa thạch, dùng que thủy tinh thước thợ vô trùng dàn mỏng đều trên đĩa thạch, hoặc nghiêng đi, nghiêng lại để 0,1ml dịch khuẩn được dàn đều khắp trên mặt thạch.

- Cấy xong đánh dấu độ pha loãng ở từng đĩa thạch và để nuôi trong tủ ấm 28°C.

- Sau 24 giờ lấy đĩa thạch ra, đếm số khuẩn lạc mọc trên mặt thạch, đếm tổng số khuẩn lạc của 3 - 5 đĩa thạch của cùng một nồng độ, sau đó lấy số lượng khuẩn lạc trung bình. Nhân số lượng khuẩn lạc trung bình với 10 để tìm số lượng khuẩn lạc có trong 1ml canh trùng (vì lúc cấy chỉ cấy có 0,1ml) và cuối cùng nhân với hệ số pha loãng của canh trùng.

2.2. Công thức tính tổng quát

Số lượng VSV trong canh trùng = A × N

A : số lượng khuẩn lạc trong 1ml canh trùng.

N : hệ số pha loãng của canh trùng.

Bài 4

QUAN SÁT HÌNH THÁI CỦA NẤM, XẠ KHUẨN VÀ TẢO LAM

- Quan sát hình thái và bào tử của xạ khuẩn *Streptomycetes*.

- Quan sát hình thái của vi khuẩn lam sống cộng sinh với bèo hoa dâu.

I - QUAN SÁT HÌNH THÁI XẠ KHUẨN

1.1. Quan sát khuẩn lạc

- Khuẩn lạc thường có dạng vôi, chắc, có nếp nhăn, mép không thẳng.

Split Unregistered Version - http://www.simpopdf.com

- Trên môi trường đặc, sợi xạ khuẩn phát triển thành 2 loại : sợi cơ chất (hay sợi thuỷ tinh) và sợi sinh.

1.2. Quan sát sợi khí sinh

- Dùng xạ khuẩn đã nuôi cấy 7 - 8 ngày trở lên.

- Lấy một lá kính (lamelle) sạch, đặt trên mặt khuẩn lạc, khẽ ấn cho lá kính gắn vào bề mặt khuẩn lạc.

- Lấy lá kính ra, úp trên bản kính sạch đã có sẵn thuốc nhuộm xanh metilen.

- Đặt lên kính hiển vi quan sát. Vẽ hình.

Cách làm này có thể quan sát được : sợi khí sinh, hình dạng sợi bào tử, bào tử.

Cách xem trực tiếp không nhuộm màu :

Đưa khuẩn lạc mọc trên môi trường thạch ở hộp petri, xem trực tiếp dưới kính hiển vi với vật kính × 8, × 10.

Phương pháp này đơn giản, nhanh và có thể xem được hình thái tổng quát của xạ khuẩn và sợi bào tử.

1.3. Xem sợi cơ chất

- Dùng kim mũi mác vô trùng, lấy một ít thạch vô trùng có sợi xạ khuẩn.

- Đặt lên bản kính sạch, sau đó lấy phiến kính khác đè lên và ép cho thạch thành một lớp mỏng.

- Để khô trong không khí.

- Nhuộm màu, xem kính.

II - QUAN SÁT NẤM MỐC

2.1. Quan sát nấm mốc Mucor

- Dùng kim khêu sợi nấm khí sinh.

- Đưa lên bản kính có dung dịch lacto - phenol hoặc dung dịch xanh metilen.

- Quan sát sợi khí sinh không có vách ngăn.

- Quan sát cơ quan sinh sản : bào tử nang (Sporangium) và bào tử kín (Sporangiospore).

2.2. Quan sát nấm mốc *Aspergillus* và *Penicillium*

2.3. Quan sát nấm men

Các bước tiến hành :

- Giống nấm men trong ống thạch nghiêng.

nd Split Unregistered Version - http://www.simpopdf.com

- Dùng que cấy lấy một vòng nấm men.

- Trên bản kính nhỏ một giọt lugol, trộn đều vòng nấm men vào dịch lugol.

- Để khô, xem kính.

- Tế bào nấm men màu vàng. Vách tế bào màu sẫm hơn. Trong nguyên sinh chất có các hạt màu tím. Đấy là hạt tinh bột dự trữ của tế bào.

Vẽ hình thái.

III - QUAN SÁT HÌNH THÁI CỦA TẢO

Tảo lam – *Cyanophita* + *Anabaena* (Bèo hoa dâu) :

Lấy bèo hoa dâu đặt trên phiến kính, lấy 2 tấm lam kính ép nát bèo hoa dâu, sau đó để nguyên cả 2 lam và dịch bèo ép, xem trực tiếp dưới kính hiển vi có độ phóng đại nhỏ nhất (× 8). Hình thái như là mắt lưới trắng đan xen nhau.

Vẽ hình thái của tảo lam vào vở học thực tập.

Bài 5
CHUẨN BỊ CÁC MÔI TRƯỜNG ĐỂ NUÔI CẤY VI SINH VẬT

I - SỰ CẦN THIẾT PHẢI CHUẨN BỊ MÔI TRƯỜNG NUÔI CẤY VI SINH VẬT

Bất kì một thực nghiệm nào liên quan đến VSV cũng đều phải chuẩn bị các môi trường dinh dưỡng để nuôi cấy VSV.

- Các VSV tự dưỡng có khả năng dùng CO_2 trong không khí hoặc các muối cacbonat làm nguồn thức ăn cacbon duy nhất đối với chúng, trong khi các hợp chất này không thể đáp ứng được cho nhu cầu dinh dưỡng cacbon của các VSV dị dưỡng. Để nuôi cấy các VSV dị dưỡng, cần phải có các môi trường chứa các hợp chất cacbon có tính khử nhiều hơn, tuỳ theo đặc điểm sinh lí – sinh hoá của VSV mà chúng có thể là các hợp chất khác nhau, chẳng hạn như axit hữu cơ, rượu, hidratcacbon, hidrocacbon.

- Nhu cầu của các VSV đối với nguồn nitơ cũng không giống nhau. Để nuôi cấy các VSV cố định nitơ phân tử, cần sử dụng các môi trường không chứa nitơ ở dạng hợp chất. Trong thành phần của tất cả các môi trường khác, người ta sử dụng các hợp chất chứa nitơ khác nhau. Có thể là nitrat hoặc muối amôn, có thể là một số amino axit.

Split Unregistered Version - http://www.simpopdf.com

- Nhu cầu của các nhóm VSV khác nhau về các nguyên tố khoáng hoặc các nguyên tố vi lượng được đáp ứng thường bằng các loại muối khoáng nào đó. Vì vậy cái gọi là "muối khoáng cơ sở" của các môi trường đối với nhiều loại VSV có thể là rất giống nhau về thành phần.

- Ngoài các nguyên tố cần thiết đối với các quá trình cấu trúc, môi trường còn phải chứa các các nguyên liệu năng lượng. Trong các môi trường nuôi cấy VSV dị dưỡng, các hợp chất cacbon trong phần lớn trường hợp cũng đồng thời là các nguyên liệu năng lượng. Trong các môi trường nuôi cấy các VSV tự dưỡng thì vai trò đó lại được thực hiện bằng các muối khoáng.

II - MỘT SỐ LOẠI MÔI TRƯỜNG NUÔI CẤY VI SINH VẬT

Về thành phần, môi trường nuôi cấy được chia thành hai nhóm : môi trường thiên nhiên hay môi trường tự nhiên, có thành phần không xác định và môi trường tổng hợp.

2.1. Môi trường tự nhiên

2.1.1. Môi trường canh thịt – pepton (MPB) là môi trường dùng để nuôi cấy các loại VSV dị dưỡng. Chuẩn bị môi trường này như sau :

Lấy 500g thịt đã loại bỏ xương, mỡ, gân và thái nhỏ, hoặc đem xay nhỏ trong cối xay thịt, thêm 1 lít nước máy và để ở nhiệt độ phòng trong 12 giờ hoặc để ở tủ ấm ổn nhiệt 30^0C trong 6 giờ, hoặc ở tủ ấm ổn nhiệt 37^0C trong 2 giờ. Trong khoảng thời gian này, nhiều chất khác nhau đã được chiết ra từ thịt, trong đó có vitamin tan trong nước. Sau đó vắt lấy nước, lọc qua vải màn (vải gạc) rồi đem đun sôi 30 phút. Đợi nguội, lọc lại qua bông, bổ sung nước tới mức ban đầu, sau đó bổ sung thêm 0,5% NaCl và 1% pepton. Pepton là một hỗn hợp các polipeptit (các sản phẩm phân giải không triệt để của protein) có chứa nhiều hay ít các amino axit tự do, các enzym, axit nucleic và một số vitamin. Người ta chế tạo ra pepton bằng cách thuỷ phân thịt hoặc cazein nhờ axit hoặc nhờ enzym.

Như vậy môi trường canh thịt – pepton là một môi trường giàu dinh dưỡng, nhưng hầu như không có chứa hidratcacbon. MPB được khử trùng ở 1atm trong 20 – 30 phút.

2.1.2. Môi trường mạch nha là một môi trường tốt đối với nhiều vi khuẩn lactic, vi khuẩn axetic, nấm men, nấm mốc và các VSV dị dưỡng khác, thường sử dụng đường làm nguồn cacbon và làm nguyên liệu năng lượng.

Split Unregistered Version - http://www.simpopdf.com

Mạch nha được chuẩn bị như sau : lấy 250g đại mạch nảy mầm (có thể thay bằng thóc mầm) đã xay nhỏ, thêm 1 lít nước máy, làm nóng lên đến 45 – 50^{0}C và duy trì ở nhiệt độ này trong vòng nửa giờ, liên tục khuấy trộn để trách vón cục. Sau đó nâng lên đến nhiệt độ 55 – 58^{0}C và giữ cho đến khi đường hoá hết tinh bột, tức là cho tới khi không còn thấy phản ứng màu với thuốc thử iốt. Trong điều kiện nói trên đã xảy ra cả quá trình thuỷ phân protein thành amino axit và polipeptit. Nước chiết được lọc qua bông hoặc qua giấy lọc. Nồng độ đường trong dung dịch được xác định bằng tỉ trọng kế Balling, số Bộ Balling (^{0}B) gần tương ứng với số phần trăm của lượng đường chứa trong dung dịch. Nồng độ đường trong nước mạch nha mới chế tạo thường đạt tới 16 – 18^{0}B. Muốn có các nồng độ mạch nha cần thiết, ta dùng nước máy để pha loãng ra. Đối với nấm mốc, sử dụng nồng độ 3 – 4^{0}B, đối với nấm men : 6 – 8^{0}B, còn đối với phần lớn các vi khuẩn lactic : 8 – 12^{0}B, nước mạch nha được khử trùng ở 0,5atm trong 20 – 30 phút.

2.1.3. Môi trường nấm men được sử dụng để nuôi cấy nhiều đại diện khác nhau của các VSV dị dưỡng. Cơ sở của môi trường nấm men là nước nấm men. Để chế tạo nước này, lấy 70 –100g men ép tươi hoặc 7 – 10g men khô hoà vào 1 lít nước máy, rồi đun sôi trong vòng 10 – 30 phút. Sau đó để lắng dung dịch ở ống đong đặt trong tủ lạnh, gạn lấy dịch rồi lọc qua bông. Bổ sung thêm 1 lít nước máy nữa, đun sôi lại 30 phút rồi lọc lại. Bổ sung thêm vào nước men thu được hidratcacbon (1 – 2%) và muối khoáng, thường là K_2HPO_4 (0,1%) và NaCl (0,5%). Điều chỉnh pH của môi trường đến 6,8 – 7,2 ; phân phối môi trường vào các dụng cụ cần thiết rồi khử trùng ở 0,5atm trong 20 – 30 phút.

2.1.4. Môi trường khoai tây được sử dụng chủ yếu để phân lập và nuôi cấy các loài trong giống *Clostridium* và các đại diện vi khuẩn phân giải tinh bột khác. Để chuẩn bị cho môi trường này, ta chọn các củ khoai tây tốt rồi rửa sạch, gọt vỏ, bỏ chồi và các chỗ thương tổn, sau đó rửa lại. Đem 200g khoai tây này cắt nhỏ ra, thêm một lít nước máy, đun sôi 15 phút, phân phối vào các dụng cụ nuôi cấy. Môi trường khoai tây được khử trùng ở 1,5atm trong 30 phút. Sau khi khử trùng, bổ sung thêm $CaCO_3$ đã khử trùng riêng vào môi trường.

2.1.5. Nước chiết đất được dùng để phân lập và nuôi cấy các VSV đất. Để chuẩn bị môi trường này, lấy 1kg đất giàu chất mùn, thêm 1 lít nước máy, hoà đều, rồi đun sôi trong 30 – 40 phút. Để lắng rồi gạn ra,

Split Unregistered Version - http://www.simpopdf.com
đem li tâm, bỏ cặn. Nếu cần thì trung hoà lại dịch lọc, bổ sung 0,5g K_2HPO_4, phân phối vào các dụng cụ nuôi cấy và khử trùng ở 1,5atm trong 30 phút.

2.2. Môi trường tổng hợp

- Môi trường tổng hợp là những môi trường chỉ gồm các hợp chất hoá học tinh khiết, xác định và được lấy với những nồng độ cho trước. Môi trường tổng hợp thích hợp nhất cho việc nghiên cứu trao đổi chất ở VSV. Vì đã biết rõ thành phần và số lượng các chất đưa vào môi trường, cho nên có thể nghiên cứu được nhu cầu của chúng, cũng như sự chuyển hoá của chúng thành các sản phẩm trao đổi tương ứng.

- Để thiết lập các môi trường tổng hợp, cần phải biết rõ nhu cầu của VSV về các chất dinh dưỡng và các đặc điểm trao đổi chất chủ yếu của chúng. Các nhà VSV học đã tạo ra không ít các môi trường tổng hợp với chất lượng không thua kém những môi trường tự nhiên có thành phần không xác định. Tuỳ thuộc vào nhu cầu của VSV, các môi trường tổng hợp có thể gồm rất nhiều thành phần, chẳng hạn như đối với các môi trường nuôi cấy nhiều loại vi khuẩn lactic, trong khi đó cũng có những môi trường khá đơn giản về thành phần, chẳng hạn như các môi trường nuôi cấy các VSV tự dưỡng.

2.3. Môi trường bán tổng hợp

Môi trường bán tổng hợp có thể gồm cả những môi trường chủ yếu cấu tạo bởi các hợp chất biết rõ thành phần hidratcacbon, nitrat hoặc muối amôn, phôtphat và các chất khác, còn hợp chất chưa biết rõ thành phần có thể là dịch thuỷ phân cazein, dịch tự phân nấm men, cao ngô - những thứ bổ sung với tính chất dùng làm nguồn vitamin và chất sinh trưởng.

2.4. Các loại môi trường khác

Khi nuôi cấy VSV người ta còn sử dụng nhiều loại môi trường khác như : Môi trường chọn lọc ; Môi trường chẩn đoán phân biệt ; Môi trường lỏng ; Môi trường đặc ; Môi trường xốp...

III - PHƯƠNG PHÁP LÀM ĐÔNG MÔI TRƯỜNG

Để làm đông môi trường người ta dùng thạch, gelatin và silicagen.

3.1. Dùng thạch làm đông môi trường

- Thạch được dùng phổ biến. Đó là một loại polysacarit phức tạp thu nhận được từ một số loại tảo biển. Thạch được chế biến dưới dạng bản mỏng, "sợi" hoặc bột. Thạch thuận lợi ở chỗ nhiều loại VSV không dùng nó làm cơ chất dinh dưỡng. Trong nước thạch tạo thành dạng gel và chảy

Split Unregistered Version - http://www.simpopdf.com
ra ở 100^0C và đông lại ở nhiệt độ 40^0C. Vì vậy trên các môi trường thạch, có thể sử dụng nuôi cấy VSV ở bất cứ nhiệt độ nào thích hợp đối với sự sinh trưởng của chúng. Khi đông lại, thạch thường tạo thành nước "ngưng tụ". Nồng độ thạch càng thấp thì nước thoát ra càng nhiều.

3.2. Dùng gelatin làm đông môi trường

Gelatin là loại protein nhận được khi ninh xương và sụn của động vật. Gel tạo thành bởi gelatin bị chảy lỏng ở nhiệt độ 23-26^0C, tức thấp hơn so với nhiệt độ nuôi cấy của nhiều loại VSV (30-37^0C). Ngoài ra gelatin còn bị dịch hoá bởi men proteinaza do một số loại VSV tiết vào môi trường. Những đặc điểm này làm hạn chế rất nhiều việc ứng dụng gelatin vào làm đông môi trường. Gelatin được sử dụng chủ yếu để phát hiện hoạt tính phân giải protein của VSV, hoặc để nhận được các khuẩn lạc lớn và chìm sâu của nấm men khi định tên chúng. Trong trường hợp đầu, ta dùng môi trường nước thịt-pepton, còn trong trường hợp thứ 2 dùng môi trường gelatin-mạch nha.

Gelatin được đưa vào môi trường lỏng với khối lượng 10-15%, để cho trương lên trong 10-15 phút và đun trên nồi cách thuỷ cho đến khi tan hết, điều chỉnh pH môi trường đến 6,8-7,0. Tất cả các loại môi trường chứa gelatin được khử trùng ở 0,5atm trong 15 phút. Không nên khử trùng lại các loại môi trường chứa gelatin, nhất là khi pH môi trường thấp hơn 6,0 hoặc cao hơn 7,3, bởi vì nó sẽ làm mất đi khả năng tạo gel.

3.3. Dùng bản silicat-gel làm đông môi trường

Bản silicat-gel được dùng làm chất nền đặc cho các môi trường tổng hợp có thành phần xác định chặt chẽ, bởi vì nó có bản chất của chất vô cơ. Bản silicat-gel được tạo ra như sau : cho axit clohidric kết hợp với một thuỷ tinh lỏng (dung dịch Na_2SiO_3 hay K_2SiO_3). Thể tích axit clohidric và thuỷ tinh lỏng bằng nhau và tỉ trọng đều bằng 1,1. Khuấy đều. Để hỗn hợp vào các đĩa petri, mỗi đĩa khoảng 25-30ml. Các đĩa đặt nằm ngang và giữ yên trong vài giờ để tạo gel, tức là để xảy ra phản ứng sau :

$$2HCl + Na_2SiO_3 \rightarrow H_2SiO_3 + 2NaCl$$

Sau khi gel đã đặc lại, ta bỏ nắp đĩa ra, đặt các đĩa vào chậu men hay chậu thuỷ tinh và cho nước chảy liên tục qua chậu để loại bỏ clorua. Kiểm tra sự có mặt của clorua bằng phản ứng định tính với dung dịch $AgNO_3$ 1-5%. Vì trong nước máy cũng có chứa khá nhiều ion clo, cho nên trước khi kiểm tra gel bằng dung dịch $AgNO_3$, cần rửa lại vài lần bằng nước cất nóng. Nước rửa lần cuối được rót vào 1 ống nghiệm sạch,

Split Unregistered Version - http://www.simpopdf.com
thử thêm vào đó 2-3 giọt dung dịch AgNO$_3$. Nếu có mặt của clorua thì xuất hiện kết tủa trắng hoặc làm đục lên. Nếu không thấy đục là gel đã có thể dùng được.

IV - LÀM TRONG MÔI TRƯỜNG

Việc làm trong môi trường chứa thạch hoặc gelatin là rất cần thiết đối với các nghiên cứu chẩn đoán (định tên) và đối với trường hợp cần nhận được các khuẩn lạc tách rời, thấy rõ các VSV kí sinh.

Nhiều lúc có thể nhận được môi trường trong bằng cách loại bỏ cặn nhờ lọc qua bông. Nếu làm như vậy vẫn chưa đủ thì phải làm trong môi trường bằng lòng trắng trứng gà. Để làm trong 500ml môi trường, chỉ cần dùng lòng trắng của một quả trứng gà là đủ. Lòng trắng trứng được tách cẩn thận khỏi lòng đỏ, rồi đánh tan trong một thể tích nước bằng như vậy cho đến khi tạo thành bọt dày đặc, rồi rót vào môi trường đã nóng chảy và đã để nguội đến 45 - 50^{0}C. Trước đó phải kiểm tra pH của môi trường và nếu cần phải điều chỉnh lại tới pH = 7,0 - 7,3. Trộn kĩ lòng trắng trứng với môi trường rồi đặt vào nồi cách thuỷ sôi trong 1 giờ. Lòng trắng sẽ kết tủa lại và hấp phụ tất cả các hạt lơ lửng trong môi trường. Lọc nhanh môi trường đang nóng để đảm bảo cho môi trường khỏi bị đông lại trong khi lọc.

Không nên cho lòng trắng trứng vào các môi trường tổng hợp có thạch, mà nên làm trong chúng như sau : Rót môi trường vào các cốc thuỷ tinh hoá học, hấp ở nồi hấp áp lực, sau khi khử trùng, giữ yên 10 -12 giờ trong nồi hấp chưa mở nắp. Khi làm nguội từ từ như vậy, các hạt lơ lửng sẽ lắng xuống đáy. Tách lấy phần môi trường trong ở phía trên, phân vào các bình, rồi đem khử trùng lại.

Bài 6
KHỬ TRÙNG CÁC MÔI TRƯỜNG DINH DƯỠNG VÀ DỤNG CỤ

I - KHỬ TRÙNG MÔI TRƯỜNG DINH DƯỠNG

1.1. Mục đích của việc khử trùng môi trường dinh dưỡng

Khử trùng là một trong những biện pháp cần thiết và quan trọng nhất trong thực nghiệm vi sinh vật học. Thuật ngữ "khử trùng" bắt nguồn từ tiếng La tinh với nghĩa là sự "làm tuyệt dục". Trong vi sinh vật học, khử trùng được hiểu là làm chết tất cả mọi VSV. Các nhà vi sinh vật học tiến

Split Unregistered Version - http://www.simpopdf.com
hành khử trùng môi trường, dụng cụ, thiết bị và các thứ khác để tránh sự phát triển lẫn lộn của các hệ VSV ngoại lai vào giống đang nghiên cứu. Việc khử trùng môi trường và dụng cụ là việc bắt buộc phải làm khi thực hiện tất cả các bài tập.

1.2. Phương pháp khử trùng môi trường dinh dưỡng

- Môi trường dinh dưỡng được khử trùng chủ yếu bằng cách hấp trong nồi hấp áp lực. Phương pháp này dựa trên nguyên tắc là gia nhiệt các vật bằng hơi nước bão hoà, dưới một áp suất lớn hơn áp suất của khí quyển. Khi áp suất hơi nước tăng lên thì nhiệt độ cũng tăng theo.

Tác dụng phối hợp giữa nhiệt độ cao và áp suất bảo đảm cho việc khử trùng thực hiện được tốt. Khi hấp áp lực sẽ làm tiêu diệt cả tế bào dinh dưỡng lẫn bào tử của VSV. Khi ghi chế độ khử trùng bằng các đơn vị áp suất 0,5 ; 1,0 ; 1,6 ; 2,0atm, có nghĩa là người ta muốn nói đến các áp suất bổ sung. Việc tăng áp suất hơi nước được tạo ra trong những thiết bị đậy kín, thành dày, đóng kín, đó là các nồi hấp áp lực.

1.3. Chế độ khử trùng môi trường

- Nhiệt độ và thời gian khử trùng bằng cách hấp áp lực trước hết quyết định bởi thành phần của môi trường dinh dưỡng. Các cơ chất có chứa những chất không bền đối với nhiệt độ 120^0C phải được khử trùng ở 0,5atm. Sữa, dịch tự phân nấm men, nước nấm men và các môi trường chứa gelatin được khử trùng ở 0,5atm trong 15 phút. Các môi trường có chứa đường và vitamin, chẳng hạn như môi trường mạch nha, môi trường nước ép thực vật được khử ở 0,5atm trong 20 - 30 phút. Canh thịt - pepton và thạch - thịt - pepton được khử trùng ở 1atm trong 20 -30 phút. Môi trường khoai tây, nước chiết đất được khử trùng ở 1,5atm trong 30 phút.

- Để lựa chọn chế độ khử trùng, phải tính đến pH của môi trường. Khi môi trường có phản ứng axit, các hợp chất cao phân tử trong đó có thể bị thuỷ phân khi hấp áp lực. Chẳng hạn khi pH môi trường thấp hơn 6,0 - 6,5 thì sẽ xảy ra việc pepton hoá gelatin và sau khi khử trùng, môi trường sẽ không đông lại được. Khi pH thấp hơn 5,0, sẽ xảy ra sự thuỷ phân và thạch mất khả năng tạo gel.

- Nếu môi trường có phản ứng kiềm thì khi khử trùng sẽ xuất hiện kết tủa sắt, xuất hiện việc caramen hoá đường và đường trở nên không hấp thu được đối với VSV. Để tránh những hiện tượng này, các môi trường được dùng để nuôi cấy các VSV ưa axit hoặc ưa kiềm phải được tiến hành khử trùng ở pH trung tính và sau khi hấp áp lực mới axit hoá hoặc kiềm hoá môi trường. Ngoài ra có nhiều thành phần của môi trường thường được khử trùng riêng ở những chế độ pH không ảnh hưởng tới chúng, sau đó mới đưa vào môi trường một cách vô trùng với những khối lượng thích hợp.

Split Unregistered Version - http://www.simpopdf.com

II - KHỬ TRÙNG CÁC DỤNG CỤ THUỶ TINH

Phương pháp cơ bản để khử trùng các dụng cụ thủy tinh là phương pháp khử trùng bằng không khí nóng. Công việc này được thực hiện trong tủ sấy ở nhiệt độ 165 - 180^{0}C trong vòng 2 giờ. Khi đó có thể tiêu diệt cả tế bào dinh dưỡng lẫn các bào tử của VSV.

2.1. Cấu tạo của tủ sấy

Tủ sấy cấu tạo bởi các vật liệu chịu nhiệt - thường là bằng kim loại và amiăng. Trong tủ có các ngăn và phía trên có lỗ để cắm nhiệt kế sao cho bầu thuỷ ngân của nhiệt kế phải đặt ở bên trong tủ, cách thành trên của tủ khoảng 6-8cm, không nên đặt sát thành tủ vì ở đấy nhiệt độ thường cao hơn nhiều. Phía trên còn có lỗ thông hơi mà khi khử trùng được đóng lại. Việc duy trì nhiệt độ cần thiết được thực hiện nhờ một thiết bị điều hoà nhiệt (thermoregulator).

2.2. Chuẩn bị dụng cụ để khử trùng

Chai lọ trước khi khử trùng phải được rửa kĩ càng, làm khô và gói giấy để bảo đảm tính vô trùng sau khi sấy, mỗi pipet được gói trong dải giấy dài có chiều rộng 4 - 5cm. Đầu pipet được dùng để hút bằng miệng được đút nút bằng một ít bông. Pipet được gói bắt đầu từ phía đầu nhỏ giọt, quận giấy dần dần vào theo kiểu xoáy trôn ốc cho đến khi hết ở phía đầu có nút bông. Phải quận giấy cho sát khít vào pipet. Sau khi quận giấy, ta phải giữ cho khỏi bẩn và khỏi rách bằng cách buộc thành từng bó hoặc cho vào ống đựng pipet làm bằng kim loại hay bằng bìa cứng. Các que gạt cũng được gói riêng từng cái và sau đó cũng bó lại như pipet. Các đĩa petri được gói thành từng chồng, mỗi chồng khoảng 2-4 cái. Các chai lọ, ống nghiệm và ống burri được đậy bằng nút bông.

2.3. Phương pháp khử trùng dụng cụ thuỷ tinh

Các dụng cụ đã chuẩn bị tốt được đưa vào tủ sấy. Không nên xếp quá khít nhau để không khí có thể lưu thông được và làm nóng đều các vật cần khử trùng. Đóng cửa tủ sấy lại thật kín và đóng các lỗ thông khí, sau đó bật công tắc điện. Khi nhiệt độ trong tủ lên đến 165 - 180^{0}C thì bắt đầu tính thời gian. Duy trì nhiệt độ này trong thời gian 2 giờ liền. Nếu tủ không có thiết bị điều nhiệt thì phải theo dõi trong suốt quãng thời gian này, vì nếu nhiệt độ tụt xuống thì không đủ để khử trùng, còn nếu nhiệt độ vượt quá 180^{0}C thì sẽ làm cháy giấy. Khử trùng xong, tắt ngay công tắc điện nhưng không được mở cửa tủ ra trước khi nhiệt độ tụt xuống dưới

Split Unregistered Version - http://www.simpopdf.com

80^0C, nếu không có thể làm nứt vỡ dụng cụ và làm ảnh hưởng đến tính vô trùng của dụng cụ.

Các dụng cụ đã khử trùng được cất giữ ở chỗ kín, tránh bụi bặm. Chỉ bóc giấy trước khi sử dụng.

Bài 7
LÊN MEN RƯỢU ETILIC

I - DỤNG CỤ, NGUYÊN LIỆU

1.1. Dụng cụ

Ống lên men, ống hút 1ml ; bình tam giác (bình cầu) 250 ; 500, 1000ml ; giấy polietilen ; nấm men *Saccaromyces* ; nút bông và nút cao su, lam kính, kính hiển vi.

1.2. Môi trường đạm sunphat

II - PHƯƠNG PHÁP NUÔI CẤY

Cân môi trường cho vào bình. Khử trùng ở 110°C trong 20 phút (0,7 – 0,8at). Rót vào ống lên men môi trường. Cấy nấm men *Saccaromyces carevisiae*. Dùng giấy polietilen bịt kín. Đem nuôi ở 28 – 30°C trong 16 - 18 giờ.

III - KIỂM TRA KẾT QUẢ

- Trong quá trình nuôi cấy ta thấy giải phóng ra CO_2. Khí này tụ trên mặt môi trường, đẩy môi trường xuống.

- Mở ống nghiệm, ngửi thấy mùi rượu.

+ Muốn xác định lượng CO_2 sinh ra trong ống lên men, người ta làm như sau :

+ Mở nút bông ở ống lên men ra, nhanh chóng cho vào đó 1ml NaOH 10%.

Dùng ngón tay chặn đầu ống nghiệm đồng thời lắc mạnh bình để CO_2 tác dụng với NaOH. Cột CO_2 mất dần và nước dâng lên đầy ống lên men và thấy ngón tay bịt miệng ống bị hút chặt vào miệng ống.

Phản ứng của quá trình như sau :

$$CO_2 + NaOH \rightarrow NaHCO_3 \text{ (natri axit cacbonat)}$$

Split Unregistered Version - http://www.simpopdf.com

+ Để tính toán lượng khí CO_2 bay ra, người ta nuôi cấy trong bình tam giác 250–300ml. Trong đó có môi trường và có VSV. Để tránh nhiễm khuẩn, kĩ thuật phải đạt như sau :

* Nồng độ đường trong môi trường cấy phải cao trên 20%.

* Phải nuôi cấy trong điều kiện yếm khí.

* Trong quá trình cấy sự tích luỹ rượu phải đạt cao trên 10^0.

- Dụng cụ nuôi cấy : bình lên men Meisslia.

Để tính lượng CO_2 người ta cân khối lượng bình giữ CO_2 trước và sau lúc nuôi cấy. Hiệu số của 2 khối lượng, tức là lượng CO_2 thu được. Có thể khắc vạch bình giữ CO_2 ở trên miệng bình tam giác. Khi đó ta có thể biết ngay được thể tích CO_2 bay ra bao nhiêu. Trường hợp này không cần phải cân dụng cụ giữ CO_2, mà chỉ cần tính quy đổi ra khối lượng gam. Thường khối lượng CO_2 được giải phóng ra trong quá trình lên men bằng 50% của khối lượng đường lên men.

$$C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2CH_3CH_2OH + 2CO_2$$

$$180 = [2 \times 46 = 92] + [2 \times 44 = 88]$$

Ví dụ : Trong thí nghiệm môi trường nuôi cấy có 15 gam đường, vậy ta có thể biết được lượng CO_2 tương ứng là 7 – 7,5g. Từ lượng CO_2 bay ra người ta tính được một cách dễ dàng khối lượng rượu tạo thành và đường lên men.

Ví dụ : Người ta thu được lượng CO_2 bay ra trong quá trình lên men là 6g. Vậy lượng rượu được tạo thành là :

88g CO_2 tương ứng với 92g rượu

Vậy 6g CO_2 tương ứng là x g rượu

$$x\ (g)\ \text{rượu} = \frac{6 \times 92}{88} = 6,3$$

Lượng đường lên men Y là :

188g $C_6H_{12}O_6$ cho 88g CO_2

y = 6g CO_2

$$y = \frac{6 \times 92}{88} = 12,3\ (g)$$

Vậy nếu thu được 6g CO_2 thì rượu tạo thành sẽ là 6,3g và đường bị phân huỷ là 12,3g.

nd Split Unregistered Version - http://www.simpopdf.com

IV - XÁC ĐỊNH CƯỜNG ĐỘ LÊN MEN

Cường độ lên men là khối lượng đường lên men được tính theo % so với lượng sản phẩm theo thời gian định sẵn.

Nếu cho 100ml môi trường chứa 15g đường, mà trong 15g ấy có 12,3g lên men (bị phân huỷ), vậy ta có :

15 – 100%

12,3 – X % $X\% = \frac{12,3 \times 100}{15} = 82\%$

Cường độ lên men là 82%.

Bài 8

QUÁ TRÌNH LÊN MEN LACTIC VÀ QUÁ TRÌNH LÊN MEN BUTIRIC

I - QUÁ TRÌNH LÊN MEN LACTIC

Quá trình chuyển hóa đường glucozơ thành axit lactic dưới tác dụng của VSV trong điều kiện yếm khí, gọi là quá trình lên men lactic.

1.1. Dụng cụ, nguyên liệu

Bình tam giác 100 ml ; Ống lên men ; Dao con ; Ống hút 1ml ; Ống nghiệm 1,5 × 12mm ;

Cà rốt, rau cải ;

Dung dịch NaCl = 8% ; $KMnO_4$ = 2% ; dung dịch H_2SO_4 đậm đặc.

1.2. Môi trường sữa

Lấy một lít sữa, thêm 1,5 – 5g panereatin, giữ ở 45°C trong 72 giờ. Sau đó lọc và bổ sung vào đó dung dịch sau :

NaCl	5g	Pepton	10g
Thạch	20g	Điều chỉnh	pH = 7,0 – 7,2

1.3. Cách tiến hành

Lấy 10ml sữa, thêm 20ml nước cất và 2 – 3 giọt dung dịch phenolphtalain 1% trong cồn. Trộn đều, đem chuẩn độ bằng KOH hay NaOH 0,1N cho đến khi thấy xuất hiện màu hồng và không đổi màu sau 1 phút. Lấy số ml NaOH 0,1N đã dùng để chuẩn độ với 10, ta sẽ có độ therner. Một độ therner (10T) tương ứng với 9mg axit lactic.

Split Unregistered Version - http://www.simpopdf.com

1.4. Phương pháp kiểm nghiệm

Có nhiều cách kiểm nghiệm, dưới đây giới thiệu 3 phương pháp dễ làm :

1.4.1. Axit lactic chuyển thành CH_3CHO

$$2KMnO_4 + 3H_2SO_4 = K_2SO_4 + 2MnSO_4 + 5H_2O + 5O$$

$$5CH_3CHOHCOOH + 5O = 5CH_3CHO + 5CO_2 + 5H_2O$$

$$CH_3CHO + AgNO_3 = Ag\downarrow + CH_3COOH.$$

Kết quả cách thử này là bạc kết tủa có ánh trắng.

Cách tiến hành :

Lọc dung dịch nuôi cấy lấy 10ml dung dịch trong. Cho thêm vào đó 10ml H_2SO_4 đặc. Đem đun nóng. Thêm 1- 3 giọt $KMnO_4$ có nồng độ 1/10 đến khi kết tủa màu đen, sau đó cho 1 – 2ml $AgNO_3$. Tiếp tục đun đến khi có ánh bạc trên thành ống nghiệm.

1.4.2. Phản ứng Tiophen

Rót vào ống nghiệm chứa dịch nuôi cấy để xác định axit lactic 1 - 2ml H_2SO_4 đặc và 10 giọt dung dịch $CuSO_4$ đậm đặc. Lắc ống nghiệm và đun 5 phút trong nồi cách thuỷ (100°C). Đợi nguội. Sau đó thêm vài giọt dung dịch tiophen 0,2% trong cồn. Nếu có axit lactic thì sẽ xuất hiện màu đỏ anh đào.

1.4.3. Phản ứng với phenol

Thêm vào dịch cần phân tích vài giọt thuốc thử ufemmen (chứa 100ml phenol 5%, 2ml Fe_2Cl_6 5% và 25ml nước cất). Nếu có mặt axit lactic, thuốc thử sẽ chuyển từ màu xanh tím sang vàng.

II - QUÁ TRÌNH LÊN MEN BUTIRIC

2.1. Dụng cụ, nguyên liệu

Củ khoai tây ; ống nghiệm ; dao nhọn ; ống hút 1ml và 10ml ;

$CaCO_3$; H_2SO_4 đậm đặc ; bình tam giác 100ml ; cồn 96%.

2.2. Môi trường nuôi cấy (môi trường khoai tây)

Rửa sạch khoai tây, cắt thành mảnh nhỏ cho vào bình tam giác đến 1/3 bình, cho một ít $CaCO_3$. Cho nước đến 4/5 bình. Sau khi đã chuẩn bị môi trường xong, cấy 1ml dung dịch đất ở nồng độ pha loãng nào đó hay cấy giống vi khuẩn lên men butiric vào. Nếu không có khoai tây ta có thể dùng sắn tươi để thay thế. Miệng bình gắn ống nghiệm lên men. Sau đó đậy nút bông lại và đem nuôi ở tủ ấm 28 – 30°C. Qua 1 tuần đem ra kiểm nghiệm.

Split Unregistered Version - http://www.simpopdf.com

2.3. Kiểm tra kết quả

Sau thời gian nuôi cấy, đem ống nghiệm ra quan sát ta thấy : khoai tây thối rữa, có bọt khí bay ra, có mùi thối, đó là mùi axit butiric.

Kiểm tra kết quả :

Lấy ống nghiệm sạch, cho vào ống nghiệm 2 – 3 ml dung dịch nuôi cấy, cho thêm 1 – 2 ml H_2SO_4 đặc. Đem đun nóng. Sau đó cho thêm 1 – 2ml C_2H_5OH. Ta thấy có mùi thơm của dầu dứa. Đó là este của axit butiric. Phản ứng xảy ra như sau :

$$CH_3CH_2CH_2COOH + C_2H_5OH \xrightarrow{H_2SO_4} CH_3CH_2CH_2-COOC_2H_5 + H_2O$$

este butirat sắt màu nâu

Bài 9

PHƯƠNG PHÁP LẤY MẪU VÀ PHÂN LẬP TUYỂN CHỌN VI KHUẨN NỐT SẦN - *RHIZOBIUM* (VKNS)

I - DỤNG CỤ VÀ NGUYÊN, VẬT LIỆU

1.1. Dụng cụ

Dao, kéo, kẹp sắt, kéo, hộp lồng, cồn 76^0, 95^0, nước vô trùng, bình tam giác hoặc bình cầu 100, 250, 500, 1000ml, dung dịch $HgCl_2$ 0,1%, lam kính, đèn cồn, thuốc nhuộm, kính hiển vi.

1.2. Môi trường Pochon

Manit hay glucozơ	10g	K_2HPO_4	0,5g
$MgSO_4$	0,2g	NaCl	0,2g
Nước men bia	100ml	$CaCO_3$	1g
Côngô đỏ 1%	10ml	Thạch	15 - 20g
Nước cất	880ml		

Cân môi trường cho vào bình thuỷ tinh có nút mài, khử trùng ở 0,6 - 0,8atm (105- 110^0C) qua 30 phút. Để ấm, phân vào hộp lồng 25-30ml/ hộp, công việc này được tiến hành hoàn toàn trong phòng vô trùng.

II - PHÂN LẬP VI KHUẨN *Rhizobium*

Lấy rễ cây đậu đỗ có nốt sần to, nhiều kẻ sọc trắng, màu hồng, ở thời kì cây ra hoa, mang về phòng thí nghiệm phân lập. Bên ngoài nốt sần có

Split Unregistered Version - http://www.simpopdf.com

nhiều tạp khuẩn, phải tiệt trùng trước khi phân lập. Rửa sạch nốt sần, lấy kéo cắt nốt sần ra khỏi rễ. Chú ý không làm nốt sần sây sát. Cho nốt rễ vào nước trong. Rửa thật sạch. Cho vào cồn 95^0 trong 3 phút. Cho tiếp vào dung dịch $HgCl_2$ 0,1% trong 5 phút. Rửa bằng nước vô trùng 5 - 6 lần, mỗi lần 3 - 5 phút. Cho nốt sần vào hộp lồng có một ít nước vô trùng. Dùng kẹp sắt bóp nát và làm thành dung dịch nốt rễ. Dùng que cấy lấy dung dịch cấy lên môi trường thạch phẳng. Cấy thành nhiều đường thẳng song song với lượng dịch giảm dần. Sau đó đem nuôi ở tủ nuôi có 25 - 28^0C, trong 2 - 3 ngày đối với vi khuẩn mọc nhanh. Để 5 - 7 ngày đối với vi khuẩn mọc chậm. Khuẩn lạc nốt sần có màu trong suốt hoặc 1/2 trong suốt. Biên khuẩn lạc đều. Nếu có côngô đỏ hay violet gentian, khuẩn lạc vẫn không bị nhuộm màu. Vi khuẩn gram âm, không bào tử, di động nhờ tiên mao.

III - XÁC ĐỊNH KHẢ NĂNG CỐ ĐỊNH NITƠ

3.1. Thí nghiệm trồng cây trong ống thạch

Phương pháp này cho phép nhận biết có khả năng cố định nitơ của vi khuẩn nốt rễ.

3.1.1. Chuẩn bị môi trường

- Môi trường Jenhsen (1942) hoặc môi trường Thornton (1930) :

Môi trường Jenhsen		Môi trường Thornton	
$CaHPO_4$	1,0g	$CaHPO_4$	2,0g
K_2HPO_4	0,2g	K_2HPO_4	0,5g
$MgSO_4.7H_2O$	0,2g	$MgSO_4.7H_2O$	0,2g
$FeCl_3$	0,1g	NaCl	0,1g
Nước	1000ml	Nước	1000ml
Thạch	8 - 15g	Thạch	8 - 15g
pH = 6,5 - 7,0		pH = 6,5 - 7,0	

Có thể dùng ống môi trường thạch nghiêng hoặc đứng.

- Dùng dung dịch dinh dưỡng Gibson (1963) 1ml/lít môi trường.

Thành phần dung dịch như sau :

H_3PO_3	0,05g	$(NH_4)_2MoO_4$	0,05g
KCl	0,005g	NaBr	0,005g
$ZnSO_4$	0,003g	$Al_2(SO_4)_3.18H_2O$	0,003g
$MnSO_4$	0,002g	Nước cất	1000ml

Split Unregistered Version - http://www.simpopdf.com

- Chuẩn bị ống môi trường :

Ống nghiệm 150 × 20mm cho hạt đậu nhỏ.

Ống nghiệm 200 × 30mm cho hạt đậu lớn.

- Lượng môi trường cho vào theo bảng sau :

Cỡ ống nghiệm (mm)	Thạch đứng (ml)	Thạch nghiêng (ml)
150 × 20	8	12
150 × 25	12	18
150 × 30	18	30
200 × 30	25	40

Cho môi trường trồng cây theo bảng hướng dẫn trên. Nút bông và khử trùng ở 1atm trong 20 phút. Sau đó đặt nghiêng nếu cần trồng cây trên ống thạch nghiêng.

3.1.2. Chuẩn bị hạt giống

Chọn hạt giống sạch không bị tổn thương. Khử trùng bằng etanol 95%, ngâm trong 3 phút hoặc 0,2% $HgCl_2$ được axit hóa (50ml/lít HCl). Hạt được khử trùng phải được rửa sạch bằng nước vô trùng ít nhất là 5 lần. Sau đem ủ cho nảy mầm (ủ trên giấy lọc ẩm vô trùng hoặc ủ trên môi trường thạch đĩa hoặc trên cát vô trùng).

3.1.2. Nhiễm khuẩn

Những hạt đã nảy mầm được đưa ra một đĩa vô trùng. Cho dịch vi khuẩn vào. Hạt được nhiễm khuẩn có thể trồng ngay vào ống thạch vô trùng hoặc để sau 7 ngày rồi mới trồng (tốt hơn là để sau 7 ngày) vào ống nghiệm.

3.2. Gieo trồng cây vào ống nghiệm

Những ống nghiệm đã được khử trùng đem đặt lên giá sắt, thay cho nút bông đầu ống nghiệm môi trường bằng bọc giấy đen, giấy thiếc hoặc tốt hơn là bằng nút gỗ mềm có lỗ khoan dọc theo chiều dài của nút gỗ. Công việc này phải tiến hành trong điều kiện vô trùng. Đục một lỗ trên giấy bọc miệng ống nghiệm. Cho hạt đậu nảy mầm đã được nhiễm khuẩn cấy vào ống nghiệm qua lỗ thủng. Có thể trồng 2 hạt, nhưng về sau chỉ để 1 cây. Cây mầm lúc đầu mọc ở phía trên đỉnh ống thạch đứng hoặc thạch nghiêng. Về sau đẩy vào vị trí ở ống thạch đứng, nằm trên bề mặt môi trường. Nếu là ống thạch nghiêng, thì đẩy cây nằm ở khoảng 1/3 mặt thạch về phía đầu ống nghiệm. Ở ống thạch đứng, rễ cây sẽ phát triển trên bề mặt thạch, còn ống thạch nghiêng rễ sẽ phát triển dọc theo mặt thạch.

Split Unregistered Version - http://www.simpopdf.com
Trồng cây xong để vào giá sắt trong phòng có chiếu sáng thích hợp. Có thể chiếu sáng từ trên xuống hoặc từ 2 bên vào.

3.3. Điều kiện

3.3.1. Chiếu sáng

Tuỳ từng giống đậu khác nhau, tuổi của cây khác nhau, mức độ phát triển khác nhau mà cần cường độ chiếu sáng khác nhau (có thể dùng bóng đèn nê-ông 60W).

3.3.2. Nhiệt độ và độ ẩm

Nhiệt độ từ 20 - 30^0C, độ ẩm tốt nhất là 60 - 70%.

3.3.3. Chăm sóc

- Thường xuyên quan sát sự khác nhau giữa ống đối chứng và ống được nhiễm khuẩn.

- Nếu bổ sung đạm để nuôi cây với nồng độ 70ppm (0,05% KNO_3), thì có thể cho vào môi trường thạch trong ống nghiệm trước khi gieo hạt hoặc vào lúc cây đã mọc. Tốt nhất là bón khi cây trồng được 5 - 7 ngày.

- Nếu quan sát thấy cây xấu, không đủ xanh (cả đối chứng lẫn nhiễm khuẩn) thì phải bổ ung thêm đạm ngay, nhưng lượng bón không được cao hơn 0,07% KNO_3, nếu cao hơn có thể bị độc cho cây và vi khuẩn.

3.4. Đánh giá kết quả

Ở ống nghiệm nhiễm *Rhizobium* sẽ tạo được nốt sần ở rễ cây, sau trồng 3 - 6 tuần, còn ở công thức đối chứng sẽ không tạo nốt sần.

- Đánh giá mối liên quan giữa thời gian và sự phát triển của cây theo công thức sau :

$$Rw = \frac{\log W_2 - \log W_1}{t_2 - t_1}$$

Rw = mối liên quan giữa sự phát triển và thời gian.

W_1 ,W_2 = Khối lượng khô của cây ở thời gian t_1 và t_2.

- Đánh giá mối liên quan giữa cố định đạm của cây và vi khuẩn qua các thời gian theo công thức :

$$Rn = \frac{\log N_2 - \log N_1}{t_2 - t_1}$$

Rn = liên quan cố định đạm

N_1 và N_2 = đạm tổng số của cây ở thời điểm t_1 và t_2.

Split Unregistered Version - http://www.simpopdf.com

Bài 10
QUÁ TRÌNH CHUYỂN HÓA NITƠ DƯỚI TÁC DỤNG CỦA VI SINH VẬT (CHUYỂN HÓA : AMÔN HÓA ; NITRAT HÓA ; PHẢN NITRAT HÓA)

I - VI KHUẨN AMÔN HOÁ

Quá trình phân giải protein và các hợp chất hữu cơ chứa nitơ để thành NH_3 gọi là quá trình amôn hóa. Việc phát hiện và xác định số lượng VSV amôn hóa được thực hiện bằng cách nuôi cấy mẫu phân tích lên môi trường canh thịt - peptôn hoặc lên bề mặt môi trường thạch bằng nước thịt - peptôn - thạch - mạch nha.

1.1. Tiến hành trên môi trường thạch bằng

Pha loãng dung dịch mẫu vật, lấy 1ml dung dịch pha loãng nhất định cho vào hộp petri. Đổ môi trường nước thịt - peptôn - thạch - mạch nha vào hộp petri sao cho dịch mẫu phân phối đều trong môi trường (thường để môi trường 37 - 40^{0}C là vừa). Sau đó cho vào tủ nuôi ở 28 - 30^{0}C, nuôi 2 - 3 ngày. Quan sát và đếm số lượng tế bào VSV theo công thức :

$X = A . K . 10$

X = Số lượng tế bào VSV trong 1g (ml).

A = Số lượng khuẩn lạc trung bình thực tế trong 1 hộp petri.

10 = Hệ số quy đổi 0,1ml về ml.

K = Hệ số khô kiệt.

1.2. Trên môi trường dịch thể

Môi trường canh thịt - peptôn được phân vào ống nghiệm khoảng 1/3 chiều cao mỗi ống, đem tiệt trùng ở 1atm/30 phút. Giấy quỳ và giấy tẩm chì axetat được khử trùng ở 0,5at. Pha loãng dung dịch mẫu vật từ 10^{-1}...10^{-10}.

Mỗi độ pha loãng cấy lặp lại 4 lần, 3 ống nghiệm môi trường không cấy VSV để làm đối chứng. Dịch mẫu cho vào mỗi ống nghiệm là 0,2 - 0,5ml. Sau khi cấy, dùng kẹp sắt đã khử trùng lấy giấy quỳ và giấy tẩm chì axetat cài vào miệng ống nghiệm nút bông. Đem nuôi ở nhiệt độ 28 - 30^{0}C, thời gian 5 - 7 ngày. Sau đó ghi kết quả.

Dựa vào sự sản sinh ra H_2S và NH_3 để kết luận sự phát triển của vi khuẩn amôn hóa. Ống nghiệm có vi khuẩn, thì giấy quỳ đỏ biến thành

Split Unregistered Version - http://www.simpopdf.com
xanh và giấy chì axetat biến thành đen (do PbS). Số lượng VSV được tính theo phương pháp thống kê toán học (phương pháp định tính) theo bảng Mc.Crady (xem phần Phụ lục).

II - VI KHUẨN NITRAT HÓA

NH_4^+ dưới tác dụng của một số VSV tự dưỡng hoá năng đặc biệt được oxi hoá để biến thành NO_3^-, gọi là quá trình nitrat hoá.

2.1. Quá trình nitrit hóa

Đây là quá trình chuyển hóa từ NH_4^+ thành NO_2^- dưới tác dụng của VSV.

2.1.1. Dụng cụ và nguyên liệu

- Bình tam giác hay bình cầu 100, 250, 500, 1000 ml, hộp lồng, que cấy, đèn cồn, giá đựng ống nghiệm, ống nghiệm 1,5 × 10cm, thuốc thử.
- Dung dịch nước thử Griess I và Griess II.

Bản sứ có lỗ, ống hút 1ml, dung dịch đất $10^{-1}...10^{-5}$.

2.1.2. Môi trường nuôi cấy vi khuẩn môi trường Vinogradxkii

$(NH_4)_2SO_4$	2g	K_2HPO_4	1g
NaCl	2g	$MgSO_4$	0,5g
$FeSO_4$	0,4g	$CaCO_3$	5g
Nước cất	1000ml	pH = 8,5	

Cho môi trường vào ống nghiệm, mỗi ống 2 - 5ml. Tiệt trùng ở 121^0C trong 30 phút.

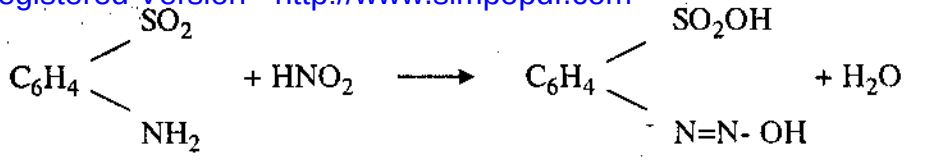
2.1.3. Phương pháp tiến hành

Dùng ống hút lấy 0,1ml môi trường cho vào bản sứ. Nhỏ dung dịch Griess I và Griess II vào, mỗi loại 1 giọt. Nếu không xuất hiện màu hồng nghĩa là không có NO_2^-, thì tiếp tục các bước tiếp theo. Cho 0,2ml dung dịch đất 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5} vào ống nghiệm có môi trường. Đem nuôi ở nhiệt độ 28 - 30^0C, trong 5 - 7 ngày.

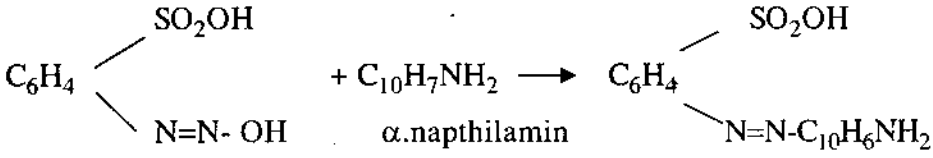
2.1.4. Quan sát vi khuẩn và kiểm tra kết quả

NO_2^- tác dụng với dung dịch Griess I và Griess II sẽ tạo thành hợp chất màu hồng hoặc đỏ theo phản ứng sau :

Split Unregistered Version - http://www.simpopdf.com



Axit sunfonic — Hidroxiazoic sunfoaxit



Napthilaminazoic sunfoaxit
(Màu hồng)

Căn cứ vào màu hồng tạo được, sẽ xác định được cường độ hoạt động của vi khuẩn.

2.2. Quá trình nitrat

Đây là quá trình chuyển hoá NO^-_2 thành NO^-_3 dưới tác dụng của VSV.

2.2.1. Dụng cụ, hoá chất

Dung dịch diphenylamine : Dung dịch Griess I và Griess II ; Axit axetic ; Bản sứ, Ống hút ; Kính hiển vi ; Thuốc nhuộm.

2.2.2. Môi trường Vinogradxkii

$NaNO_2$	1,0g	Na_2CO_3	1,0g
K_2HPO_4	0,5g	NaCl	0,5g
$MgSO_4.7H_2O$	0,3g	$FeSO_4$	0,4g
Nước cất	1000ml		

Chuẩn bị môi trường và khử trùng giống như môi trường ở giai đoạn 1.

Cho dịch vi khuẩn vào ống nghiệm có môi trường. Nuôi trong tủ ấm nhiệt độ 28 - 30^{0}C, trong 7 ngày.

2.2.3. Kiểm tra kết quả

Cho một ít môi trường đã nuôi cấy lên bản sứ. Cho 1 giọt H_2SO_4 đậm đặc và 1 giọt diphenylamine. Nếu có màu xanh xuất hiện, tức có NO^-_3.

Cơ chế tác dụng như sau :

Diphenylamine + NO_3^- $\xrightarrow{H_2SO_4}$ Sulfonylindiphenylamine
(Màu xanh)

Split Unregistered Version - http://www.simpopdf.com

III - VI KHUẨN PHẢN NITRAT

Là quá trình khử NO_3^- đến nitơ phân tử (N_2) dưới tác dụng của VSV.

3.1. Dụng cụ và nguyên liệu

Dung dịch đất $10^{-1}...10^{-5}$; Ống hút ; Bản sứ.

Thuốc thử Griess I, Griess II. Thuốc thử Nesler và Diphenylamine.

3.2. Môi trường

KNO_3 = 2g ; K_2HPO_4 = 1g ; $MgSO_4.7H_2O$ = 2g ; $FeSO_4$ = vệt ;

Kali xitrạt 5g ; Nước cất 1000ml.

Điều chỉnh pH môi trường đến 7, sau đó cho vào ống nghiệm, mỗi ống 3ml, đem tiệt trùng 121^0C trong 30 phút.

3.3. Phương pháp tiến hành

- Cho vào ống nghiệm có môi trường 0,5ml dung dịch đất. Để trong phòng ấm 28 - 30^0C trong 4 - 5 ngày. Kiểm tra kết quả. Tiến hành kiểm tra như sau :

+ Nếu trong quá trình nuôi cấy không ngừng sinh bọt khí và trên mặt môi trường có 1 lớp bọt khí. Như thế tức là trong quá trình chuyển hóa NO_3^- có sinh N_2.

+ Lấy một ít dung dịch nuôi cấy vi khuẩn, cho vào bản sứ và cho dung dịch Griess I, Griess II vào. Nếu có màu hồng đỏ xuất hiện, nghĩa là có phản nitrat hóa, sinh NO_2^- sinh NO_3^-

+ Lấy một ít dung dịch vi khuẩn cho vào bản sứ. Cho 1 vài giọt Nessler vào. Nếu có màu vàng xuất hiện tức có NH_4^+ để tiếp tục chuyển thành N_2.

- Cách tính số lượng VSV theo phương pháp định tính theo bảng Mc. Grady) :

Ví dụ : Ta có dãy pha loãng từ 10^1 đến 10^9. Số lần cấy lặp lại = 3, nghĩa là có 3 đĩa môi trường được làm thí nghiệm ở 1 nồng độ pha loãng. (có thể cấy ở 3 nồng độ liên tiếp).

- *Sau khi nuôi ta đọc được kết quả như sau :*

10^1	10^2	10^3	10^4	10^5	10^6	10^7	10^8	10^9
+++	+++	+++	+++	++	++	+	-	-
3	3	3	3	2	2	1	0	0

+ Nguyên tắc chọn số để tra bảng Mc.Crady. Chọn 3 chữ số nhỏ nhất trong dãy số, mà chữ số đầu có chữ số đứng đằng trước nó giống nó. Kết quả thí nghiệm trên ta phải chọn số 210.

Split Unregistered Version - http://www.simpopdf.com

+ Tra số 210 theo cột dọc đầu của bảng Mc. Crady, chiếu theo hàng ngang có số 3 (số lần nhắc lại) ta được số = 1,5.

+ Tính theo công thức : $N = A \times n \times K$

N - số tế bào/1g đất khô, hoặc 1ml mẫu phân tích.

A - hệ số tra được ở bảng Mac. Crady (= 1,5).

n - số nghịch đảo của nồng độ pha loãng (10^6).

K - hệ số khô kiệt (quy đổi từ độ ẩm mẫu phân tích. Ví dụ : K = 1,2).

Vậy số lượng tế bào VSV = $1,5 \times 10^6 \times 1,2 = 1,8. 10^6$ tế bào/1g đất khô.

Bài 11
VI SINH VẬT PHÂN GIẢI LÂN (PHOTPHO)

I - VI KHUẨN PHÂN GIẢI LÂN HỮU CƠ

Lân hữu cơ có thể được phân giải bởi nhiều loại VSV. Có thể dùng môi trường có thành phần sau để phân lập.

1.1. Môi trường phân lập

Lơxitin	0,05g	$MgSO_4$	0,3g
$(NH_4)_2SO_4$	0,3g	$FeSO_4$	vệt
$CaCO_3$	5g	Glucozơ	10g
NaCl	0,3g	Nước	1000ml
$MnSO_4$	vệt	Thạch	15 - 18g

Lân hữu cơ có thể dùng lơxitin hoặc axit nucleic.

1.2. Dụng cụ, nguyên liệu

Ống nghiệm có 9ml nước vô trùng.

Ống hút 1ml và 10ml.

Hộp lồng đã tiệt trùng.

Ống nghiệm có thạch nghiêng.

1.3. Các bước thực hiện

Cân 10g đất. Cho vào bình tam giác có 90ml nước vô trùng. Lắc 10 phút. Pha loãng 10^{-2} - 10^{-5}. Trong điều kiện không có axit nucleic hoặc lơxitin thì dùng lòng đỏ trứng gà. Dùng dung dịch $HgCl_2$ 0,1% tiệt trùng trứng. Dùng nước cất rồi nước vô trùng rửa sạch $HgCl_2$. Luộc trứng. Lấy

nd Split Unregistered Version - http://www.simpopdf.com
lòng đỏ nghiền nhỏ. Ngâm cồn, gạn nước cồn. Làm như thế nhiều lần. Lọc. Dùng axeton kết tủa. Dùng rượu và axeton để hoà tan và kết tủa. Cuối cùng dùng rượu hoà tan, như thế có thể dùng được.

- Cho môi trường vào ống nghiệm 1,8 × 18cm mỗi ống 15ml. Tiệt trùng 120^0C/15 phút.

- Nấu chảy môi trường, để nguội 50^0C. Đổ vào hộp lồng, mỗi hộp 15ml. Chờ môi trường đông lại. Dùng ống hút đã tiệt trùng lấy 0,1ml dung dịch đất ở nồng độ 10^{-3} hoặc 10^{-4} . Cấy lên trên mặt môi trường. Dùng que thuỷ tinh dàn đều khắp môi trường. Để ở 28 - 30^0C, trong 3 - 4 ngày.

1.4. Kiểm tra kết quả

Trên mặt môi trường sẽ xuất hiện khuẩn lạc màu trắng đục, có hình tròn, có nếp nhăn. Đấy là khuẩn lạc của vi khuẩn phân giải lân hữu cơ.

Dùng que cấy lấy vi khuẩn làm tiêu bản - nhuộm đơn. Xem kính. Vi khuẩn hình que, hai đầu tròn, đứng riêng rẽ hoặc liên lại thành chuỗi. Lấy vi khuẩn này tiếp tục thuần hoá.

Chú ý : Có thể dùng lòng đỏ trứng trực tiếp, không qua rửa rượu và kết tủa bằng axeton. Cách làm như sau :

Rửa sạch vỏ trứng bằng $HgCl_2$ 0,1% hoặc bằng cồn 95%. Dùng nước cất rồi nước vô trùng rửa sạch $HgCl_2$ hoặc cồn. Cho lòng đỏ trứng vào bình tam giác đã tiệt trùng. Cho vào 50ml nước vô trùng đánh vào cho đều. Cho vào mỗi hộp lồng 1ml nước lòng đỏ trứng. Đổ môi trường vào. Lắc nhẹ trộn đều và để đông lại. Lấy ống hút cho dung dịch cần phân lập vào. Mỗi hộp lồng cấy 0,5ml dung dịch đất. Để 2 - 3 hộp làm đối chứng. Để ở 28 - 30^0C trong 24 giờ. Thời gian nuôi cấy không được quá lâu vì dễ nhiễm tạp vi khuẩn. Khuẩn lạc mọc. Lấy vi khuẩn làm tiêu bản, xem kính. Nếu đúng như vi khuẩn phân giải lân đã miêu tả trên thì tiếp tục cấy vào thạch nghiêng nhiều lần để thuần hoá.

II - VI SINH VẬT PHÂN GIẢI LÂN VÔ CƠ KHÓ TAN

2.1. Môi trường

Saccarozơ	10g	$MnSO_4$	0,03g
$(NH_4)_2SO_4$	0,5g	$Fe_2(SO_4)_3 .7H_2O$	0,03g
NaCl	0,3g	$Ca_3(PO_4)_2$	10g
KCl	0,3g	Thạch	20g
$MgSO_4$	0,3g	Nước cất	1000ml

Split Unregistered Version - http://www.simpopdf.com

2.2. Dụng cụ và nguyên liệu

Bình tam giác ; Hộp lồng ; Ống nghiệm ; Dung dịch $(NH_4)_6Mo_7O_{24}.2H_2O$; HCl đậm đặc và 0,1N ; Bình định mức 50cc ; Dung dịch đất pha loãng ; Bèo dâu.

2.3. Các bước

Đổ môi trường vào các hộp lồng đã tiệt trùng. Dùng dung dịch đất 0,1ml đổ vào, san đều trên bề mặt môi trường. Để ở 28 - 30^{0}C.

2.4. Đánh giá kết quả

- Sau 5 - 7 ngày, quan sát khuẩn lạc và hình thái vi khuẩn. Khuẩn lạc trong nhờ, lồi, đường biên thẳng. Xung quanh khuẩn lạc có vòng phân giải trong suốt. Vòng này lớn hay bé tùy vi khuẩn. Thường thì vòng phân giải bé và muốn xem phải lật ngược đĩa petri.

Muốn đánh giá chắc chắn hơn nên kết hợp chặt chẽ giữa quan sát bằng mắt thường và dùng dung dịch Molibdatamon để kiểm tra kết quả có lân dễ tiêu không. Nếu có, lân sẽ kết hợp với Molibdatamon thành hợp chất photpho molibdatamon, kết tủa màu vàng.

- Quan sát vi khuẩn :

+ Từ khuẩn lạc có vòng phân giải, lấy một ít vi khuẩn. Làm tiêu bản và quan sát dưới kính hiển vi. Vi khuẩn phân giải hợp chất lân khó tan thành dễ tan hình que. Đầu tròn có vỏ nhày bé, có bào tử, gram dương. Muốn thuần khiết thì cấy vào thạch nghiêng nhiều lần. Mỗi lần cấy đều kiểm tra dưới kính hiển vi.

+ Để phân lập vi khuẩn phân giải hợp chất lân vô cơ khó tan thành dễ tan, có thể dùng bèo dâu. Ở cánh bèo dâu và rễ điền thanh có nhiều vi khuẩn phân giải lân khó tan thành dễ tan.

Lấy cánh bèo dâu. Rửa qua nước máy cho sạch, nghiền nhỏ trong một ít nước vô trùng để thành 1 dung dịch. Lấy dịch bèo dâu cấy trên môi trường thạch phẳng. Để ở 28 - 30^{0}C trong 5 - 7 ngày, quan sát khuẩn lạc và tế bào vi khuẩn dưới kính hiển vi.

Chú ý :

- Nghiền bèo dâu thành dịch để cho dễ cấy vào môi trường.

- Để xác định cường độ phân giải của vi khuẩn, ta định lượng lân dễ tiêu trên máy so màu.

Split Unregistered Version - http://www.simpopdf.com

Bài 12

PHÂN TÍCH SỐ LƯỢNG VI SINH VẬT TRONG MỘT CƠ CHẤT

I - CÁC BƯỚC PHÂN TÍCH

1.1. Lấy mẫu nghiên cứu

- Nguyên tắc : Mẫu phải đại diện và đạt được yêu cầu nghiên cứu.
- Tất cả các dụng cụ đều phải tiệt trùng :

+ Dụng cụ thuỷ tinh phải được hấp ở nhiệt độ cao.

+ Dụng cụ bằng nhựa, nilon phải được tiệt trùng bằng $HgCl_2$ 0,2% hoặc bằng cồn.

+ Các dụng cụ khác như khay men, cuốc, khoan có thể rửa sạch rồi dùng cồn đốt trực tiếp.

1.2. Bảo quản mẫu

- Mẫu lấy về cần phân tích ngay.
- Trường hợp lấy mẫu xong nhưng chưa có điều kiện phân tích thì phải để vào tủ lạnh ở nhiệt độ 4 -5°C.

1.3. Tiến hành phân tích

Phải tiến hành phân tích trong điều kiện vô trùng : trong buồng cấy hay trong phòng vô trùng.

Buồng cấy hay phòng vô trùng phải được tiệt trùng bằng đèn tia tử ngoại 20 phút. Có thể dùng foocmôn 10% hoặc $HgCl_2$ 0,2%, đốt hoặc phun để tiệt trùng.

1.3.1. Tính độ ẩm và hệ số khô kiệt

Kết quả phân tích thường tính theo số lượng VSV trong 1 gam chất khô. Do đó phải tính độ ẩm và hệ số khô kiệt.

a) *Cách xác định độ ẩm*

- Dùng một hộp nhôm rửa sạch, sấy khô ở 105°C trong 2 giờ. Cân khối lượng hộp [C].
- Cho vào hộp một lượng cơ chất nhất định, sấy khô.

Tuỳ đối tượng nghiên cứu mà nhiệt độ sấy khô sẽ khác nhau. Nếu là một loại bột thực phẩm thì thường sấy ở nhiệt độ 80 - 85°C. Nếu là đất thì sấy ở 105 -110°C, trên 2 giờ.

Split Unregistered Version - http://www.simpopdf.com

$$\text{Độ ẩm } x\% = \frac{A - B}{B - C} \times 100$$

x : Độ ẩm %.

A : Khối lượng hộp + cơ chất còn ướt.

B : Khối lượng hộp + cơ chất đã sấy khô.

C : Khối lượng hộp.

b) *Tính hệ số khô kiệt k :*

$$k = \frac{100}{1 - x}$$

1.3.2. Dãy pha loãng

Muốn đếm được số lượng VSV dễ dàng, khi phân tích, cần pha loãng cơ chất đến một độ nhất định.

- Xếp một dãy ống nghiệm, mỗi ống nghiệm đựng 9ml nước vô trùng.
- Cân 1g cơ chất cho vào ống nghiệm thứ nhất, lắc 20 -30 phút, như vậy chúng ta đã có dung dịch pha loãng 10^{-1} cơ chất.
- Dùng pipet 1ml hút 1ml dung dịch ở nồng độ 10^{-1} cho vào 9ml nước ở ống nghiệm thứ hai, lắc đều, chúng ta có nồng độ pha loãng 10^{-2}.
- Tiếp tục làm như vậy .đối với các ống nghiệm thứ 3, 4...đến khi chúng ta có được dãy pha loãng cần thiết để nuôi cấy và tính số lượng VSV.

1.3.3. Nuôi cấy

Cùng một dung dịch cơ chất có thể phân tích nhiều loại VSV như nấm, xạ khuẩn và các loại vi khuẩn... bằng cách cấy vào môi trường thích hợp. Môi trường có thể là dịch thể, có thể là cố thể và từ những khuẩn lạc đã mọc trên môi trường cố thể và những đặc trưng của môi trường dịch thể, chúng ta có thể tính số lượng của VSV.

II - TÍNH SỐ LƯỢNG VI SINH VẬT

2.1. Phương pháp thạch bằng (trên môi trường thạch)

- Mỗi VSV trên môi trường thích hợp sẽ phát triển và cho chúng ta một khuẩn lạc. Do đó số lượng khuẩn lạc cho ta biết số lượng VSV trong một gam cơ chất.

$$S = t \times 10 \times n \times k$$

S : Số lượng VSV trong một gam cơ chất.

t : Số khuẩn lạc trung bình trong một hộp petri.

Split Unregistered Version - http://www.simpopdf.com

10 : Số khuẩn lạc quy ra 1 ml (vì lúc nuôi cấy trong hộp lồng chúng ta dùng 0,1ml dung dịch cơ chất).

n : Số nghịch đảo của nồng độ pha loãng.

2.2. Tính số lượng vi sinh vật trong môi trường lỏng (phương pháp dịch thể)

Có những loại vi khuẩn không thể dùng mắt thường quan sát khuẩn lạc hoặc sản phẩm sinh ra cũng không có màu gì đặc biệt để đánh giá vi khuẩn hoạt động. Trong trường hợp này phải dùng phản ứng màu để xác định. Cứ mỗi ống nghiệm có phản ứng màu gọi là ống (+). Dựa vào các ống dương tính, căn cứ vào bảng Mc.Crady chúng ta tính ra số lượng VSV.

Ví dụ :

Độ pha loãng	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}
Số ống dương tính	3^+	3^+	3^+	2^+	1^+	0

- Tìm số chỉ tiêu : 321.

Số chỉ tiêu là con số có 3 hàng số. Hàng số đầu là số biểu hiện ở nồng độ loãng nhất các ống nghiệm đều dương tính. Hai số tiếp theo là số ống dương tính ở 2 nồng độ tiếp theo sau.

- Đem số chỉ tiêu này tra bảng Mc.Crady ta sẽ có số lượng vi khuẩn tương ứng : 15.

- Từ con số này ta tính ra số lượng vi khuẩn trong một gam cơ chất theo công thức :

$$S = t \times 10 \times n \times k$$

S : Số lượng VSV.

t : Số lượng vi khuẩn tra bảng.

10 : Số lượng vi khuẩn quy ra 1ml.

n : Số nghịch đảo của nồng độ pha loãng.

k : Hệ số khô kiệt.

Split Unregistered Version - http://www.simpopdf.com

Bài 13
THAM QUAN KIẾN TẬP MÔN HỌC

A - MỤC ĐÍCH VÀ YÊU CẦU

- Nhằm trang thiết bị kiến thức thực tế cho sinh viên, về ứng dụng công nghệ VSV trong nông nghiệp và xử lí ô nhiễm môi trường.

- Yêu cầu sinh viên tham gia đầy đủ các buổi học ngoại khóa theo chương trình môn học.

- Sau khi học xong sinh viên phải viết tiểu luận về bài học ngoại khóa này.

B - NỘI DUNG VÀ ĐỊA ĐIỂM HỌC NGOẠI KHÓA

- Các phòng thí nghiệm VSV hiện đại chuyên phục vụ trong giảng dạy và nghiên cứu về lĩnh vực công nông nghiệp.

- Các loại chế phẩm đang được sản xuất và áp dụng trong công, nông nghiệp.

- Trung tâm VSV ứng dụng trường Đại học khoa học tự nhiên.

- Phòng nghiên cứu VSV nông nghiệp trường Đại học Nông nghiệp 1.

- Viện Sinh học Viện khoa học Việt Nam.

- Nhà máy (phân xưởng) lên men VSV ở các tỉnh trên toàn quốc.

- Xưởng sản xuất thức ăn gia súc, gia cầm ; thuốc thú y của Viện Chăn nuôi thú y và các trung tâm thú y ở các tỉnh.

- Các trang trại, các công ti nuôi trồng thuỷ hải sản trên toàn quốc.

- Các nhà máy sản xuất đồ hộp, đông lạnh, chế biến ở các thành phố trên toàn quốc.

Split Unregistered Version - http://www.simpopdf.com

Phụ lục

BẢNG 1 : PHA DUNG DỊCH ĐỆM SORENSEN I VÀ DUNG DỊCH NA_2HPO_4 1/15 M VÀ KH_2PO_4 1/15 M - THỂ TÍCH DUNG DỊCH (ML)

pH	Na_2HPO_4 1/15 M	KH_2PO_4 1/15 M
4,53	0,00	10,00
4,48	0,10	9,90
5,29	0,25	9,75
5,59	0,50	9,50
5,91	1,00	9,00
6,24	2,00	8,00
6,47	3,00	7,00
6,64	4,00	6,00
6,81	5,00	5,00
6,98	6,00	4,00
7,17	7,00	3,00
7,38	8,00	2,00
7,73	9,00	1,00
8,04	9,50	0,50
8,34	9,75	0,25
8,67	9,90	0,10
9,18	10,00	0,00

Split Unregistered Version - http://www.simpopdf.com

BẢNG 2 : TÍNH SỐ LƯỢNG VI SINH VẬT THEO MC. CRADY

Chỉ số	Số lượng VSV có xác suất lớn nhất khi cấy lặp lại ở các ống nghiệm				Chỉ số	Số lượng VSV có xác suất lớn nhất khi cấy lặp lại ở các ống nghiệm			
	2	3	4	5		2	3	4	5
000	0,0	0,0	0,0	0,0	132	-	-	1,6	-
001	0,5	0,3	0,2	0,2	140	-	-	1,4	1,1
002	-	-	0,5	0,4	141	-	-	1,7	-
003	-	-	0,7	-	200	2,5	0,9	0,6	0,5
010	0,5	0,3	0,2	0,2	201	5,0	1,4	0,9	0,7
011	0,9	0,6	0,5	0,4	202	-	2,0	1,2	0,9
012	-	-	0,7	0,6	203	-	-	1,6	1,2
013	-	-	0,9	-	210	6,0	1,5	0,9	0,7
020	0,9	0,6	0,5	0,4	211	13,0	2,0	1,3	0,9
021	-	-	0,7	0,6	212	20,0	3,0	1,6	1,2
022	-	-	0,9	-	213	-	-	2,0	-
030	-	-	0,7	0,6	220	25,0	2,0	1,3	0,9
031	-	-	0,9	-	221	17,0	3,0	1,6	1,2
040	-	-	0,9	-	222	110,0	3,5	2,0	1,4
041	-	-	1,2	-	223	-	4,5	-	-
100	0,6	0,4	0,3	0,2	230	-	3,0	1,7	1,2
101	1,2	0,7	0,5	0,4	231	-	3,5	2,0	1,4
102	-	1,1	0,8	0,6	232	-	4,0	-	-
103	-	-	1,0	0,8	240	-	-	2,0	1,4
110	1,3	0,7	0,5	0,4	241	-	-	3,0	-
111	2,0	1,1	0,8	0,8	300	-	2,5	1,1	0,8
112	-	-	1,0	0,8	301	-	4,0	1,6	1,1
113	-	-	0,5	-	302	-	6,5	2,0	1,4
120	2,0	1,1	0,8	0,6	303	-	-	2,5	-
121	3,0	1,5	1,1	0,3	310	-	4,5	1,6	1,1
122	-	-	1,3	1,1	311	-	7,5	2,0	1,4
123	-	-	1,6	-	312	-	11,5	3,0	1,7
130	-	1,6	1,1	0,8	313	-	16,0	3,5	2,0
131	-	-	1,4	1,0	320	-	9,5	2,0	1,4

Split Unregistered Version - http://www.simpopdf.com

Chỉ số	Số lượng VSV có xác suất lớn nhất khi cấy lặp lại ở các ống nghiệm				Chỉ số	Số lượng VSV có xác suất lớn nhất khi cấy lặp lại ở các ống nghiệm			
	2	3	4	5		2	3	4	5
321	-	15,0	3,0	1;7	451	-	-	-	5,0
322	-	20,0	3,5	2,0	500	-	-	-	2,5
330	-	25,0	3,0	1,7	501	-	-	-	3,0
331	-	45,0	3,5	2,0	502	-	-	-	4,0
332	-	110,0	4,0	-	503	-	-	-	6,0
333	-	140,0	5,0	-	504	-	-	-	7,5
340	-	-	3,5	2,0	510	-	-	-	3,5
341	-	-	4,5	2,5	511	-	-	-	4,5
350	-	-	-	2,5	512	-	-	-	6,0
400	-	-	2,5	1,3	513	-	-	-	8,5
401	-	-	3,5	1,7	520	-	-	-	5,0
402	-	-	5,0	2,0	521	-	-	-	7,0
403	-	-	7,0	2,5	522	-	-	-	9,5
410	-	-	3,5	1,7	523	-	-	-	12,0
411	-	-	5,5	2,0	524	-	-	-	15,0
412	-	-	8,0	2,5	525	-	-	-	17,5
413	-	-	11,0	-	530	-	-	-	8,0
414	-	-	11,0	-	531	-	-	-	11,0
420	-	-	6,0	2,0	532	-	-	-	14,0
421	-	-	9,5	2,5	533	-	-	-	17,0
422	-	-	13,0	3,0	534	-	-	-	20,0
423	-	-	17,0	-	535	-	-	-	25,0
424	-	-	20,0	-	540	-	-	-	13,0
430	-	-	11,5	2,5	541	-	-	-	17,0
431	-	-	16,5	3,0	542	-	-	-	25,0
432	-	-	20,0	4,0	543	-	-	-	30,0
433	-	-	30,0	-	544	-	-	-	35,0
434	-	-	35,0	-	545	-	-	-	45,0
440	-	-	25,0	3,5	550	-	-	-	25,0
441	-	-	40,0	4,0	551	-	-	-	35,0
450	-	-	-	1,4	555	-	-	-	180,0

plit Unregistered Version - http://www.simpopdf.com

MỤC LỤC

Trang

Lời nói đầu

Phần một : LÍ THUYẾT

Chương 1 : **Mở đầu**

I. Đối tượng và nhiệm vụ của VSV học công nghiệp 5
II. Vai trò của VSV 6

Chương 2 : **Virus**

I. Khái niệm 11
II. Hình thái, kích thước của virus 11
III. Cấu trúc của virus 13
IV. Sức đề kháng của virus 13
V. Nuôi cấy virus 14
VI. Quá trình nhân lên của virus trong tế bào cảm thụ 15
VII. Phân loại virus 17
VIII. Vai trò của virus 18

Chương 3 : **Các nhóm vi sinh vật**

I. Vi khuẩn 19
II. Xạ khuẩn 26
III. Nấm 30
IV. Tảo 37

Chương 4 : **Sinh lí học vi sinh vật**

I. Dinh dưỡng của VSV 42
II. Hô hấp và quá trình lên men 47
III. Quá trình lên men 49
IV. Sinh trưởng, phát triển của vi khuẩn 53

Chương 5 : **Di truyền vi sinh vật**

I. Những đặc điểm và nhân tố di truyền của vi khuẩn 57
II. Cơ chế chuyển nguyên liệu di truyền ở vi khuẩn 58
III. Sự biến dị của VSV – sự đột biến 64
IV. Ứng dụng của di truyền học vi khuẩn 68

Chương 6 : **Ảnh hưởng của điều kiện ngoại cảnh đến vi sinh vật và sự phân bố của vi sinh vật trong tự nhiên**

I. Ảnh hưởng của điều kiện ngoại cảnh đối với VSV 71
II. Phân bố của vi sinh vật trong tự nhiên 76

Split Unregistered Version - http://www.simpopdf.com

Chương 7 : **Vi sinh vật ứng dụng trong công nghiệp lên men**

I. Những nguyên tắc cơ bản của nuôi cấy VSV công nghiệp 83
II. Dinh dưỡng của VSV và nguyên liệu nuôi cấy VSV công nghiệp 91

Chương 8 : **Vi sinh vật ứng dụng trong nông - lâm nghiệp**

I. VSV trong quá trình hình thành và kết cấu mùn 97
II. VSV phân giải và chuyển hóa các hợp chất cac bon 99
III. Quá trình tổng hợp và phân giải các hợp chất chứa nitơ 105
IV. Phân VSV cố định nitơ phân tử (đạm sinh học) 114
V. Chế phẩm VSV dùng trong phòng trừ sâu, bệnh hại cây trồng 118

Chương 9 : **Vi sinh vật ứng dụng trong chăn nuôi, thú y**

I . VSV ứng dụng trong thú y 125
II. VSV ứng dụng trong chăn nuôi 135

Chương 10 : **Vi sinh vật ứng dụng trong nuôi trồng thuỷ sản**

I. VSV ứng dụng trong nuôi thuỷ sản 160
II. Vi sinh học ứng dụng trong phòng trừ dịch hại thuỷ sản 167
III. VSV trong chế biến, bảo quản thủy sản 173

Chương 11 : **Hệ vi sinh vật thực phẩm và các sản phẩm thực phẩm**

I. Khái niệm 175
II. Hệ VSV rau , quả và các sản phẩm rau quả 176
III. Hệ VSV thịt và các sản phẩm thịt 184
IV. VSV của cá và các sản phẩm của cá 196
V. VSV trên tôm, mực và các động vật nhuyễn thể 203

Phần hai : THỰC HÀNH

Bài 1 : Trang thiết bị cần thiết nghiên cứu vi sinh vật và quan sát hình thái vi sinh vật 207
Bài 2 : Phương pháp cố định tiêu bản và nhuộm tế bào vi sinh vật 213
Bài 3 : Đếm số lượng tế bào vi sinh vật 216
Bài 4 : Quan sát hình thái của nấm, xạ khuẩn và tảo lam 218
Bài 5 : Chuẩn bị các môi trường để nuôi cấy vi sinh vật 220
Bài 6 : Khử trùng các môi trường dinh dưỡng và dụng cụ 225
Bài 7 : Lên men rượu etilic 228
Bài 8 : Quá trình lên men lactic và quá trình lên men butiric 230
Bài 9 : Phương pháp lấy mẫu và phân lập tuyển chọn vi khuẩn nốt sần 232
Bài 10 : Quá trình chuyển hóa nitơ dưới tác dụng của vi sinh vật 236
Bài 11 : Vi sinh vật phân giải lân (Photpho) 240
Bài 12 : Phân tích số lượng vi sinh vật trong một cơ chất 243
Bài 13 : Tham quan kiến tập môn học 246
Phụ lục 247

Split Unregistered Version - http://www.simpopdf.com

Chịu trách nhiệm xuất bản :
Chủ tịch HĐQT kiêm Tổng Giám đốc NGÔ TRẦN ÁI
Phó Tổng Giám đốc kiêm Tổng biên tập VŨ DƯƠNG THỤY

Biên tập nội dung :
NGUYỄN HỒNG ÁNH

Trình bày bìa :
BÙI QUANG TUẤN

Chế bản :
PHÒNG CHẾ BẢN (NXB GIÁO DỤC)

Sửa bản in :
NGUYỄN THU HUYỀN

GIÁO TRÌNH VI SINH VẬT HỌC CÔNG NGHIỆP
Mã số : 6G115M5-DAI

In 1.000 bản, khổ 16 x 24cm, tại Xí nghiệp In ACS Hải Phòng.
Giấy phép xuất bản số : 89/79-05.
In xong và nộp lưu chiểu tháng 6 năm 2005.

Split Unregistered Version - http://www.simpopdf.com

CÔNG TY CỔ PHẦN SÁCH ĐẠI HỌC - DẠY NGHỀ
HEVOBCO
Địa chỉ : 25 Hàn Thuyên, Hà Nội

TÌM ĐỌC SÁCH THAM KHẢO KĨ THUẬT CỦA NHÀ XUẤT BẢN GIÁO DỤC

1	**Đất ngập nước**	GS. TS. Lê Văn Khoa
2	**Động vật học có xương sống**	GS. TS. Lê Vũ Khôi
3	**Sinh thái học côn trùng**	PGS. TS. Phạm Bình Quyền
5	**Cơ sở hoá sinh**	PGS. TS. Trịnh Lê Hùng
6	**Tài nguyên nước Việt Nam**	Nguyễn Thanh Sơn
7	**Virut học**	PGS. TS. Phạm Văn Ty
8	**Vật lý kỹ thuật**	Đặng Hùng
9	**Vật lý siêu dẫn và ứng dụng**	TS. Nguyễn Huy Sinh
10	**Dụng cụ bán dẫn và vi mạch**	Lê Xuân Thê
11	**Mạng máy tính**	Ngạc Văn An
12	**Vô tuyến điện tử**	Ngạc Văn An
13	**Giáo trình cơ học**	Bạch Thành Công
13	**Kinh tế môi trường**	PGS. TS. Hoàng Xuân Cơ
14	**Tiếng Anh cơ bản cho sinh viên khoa học tự nhiên**	Trần Thị Nga
15	**Bộ sách về công nghệ sinh học**	
	Tập một : Sinh học phân tử - Cơ sở khoa học của công nghệ sinh học	PGS. TS. Nguyễn Như Hiền
	Tập hai : Công nghệ sinh học tế bào	PGS. TS. Vũ Văn Vụ PGS. TS. Nguyễn Mộng Hùng
	Tập ba : Công nghệ sinh học enzym và protein (XB - 2006)	TS. Phan Tuấn Nghĩa
	Tập bốn : Công nghệ sinh học di truyền (XB - 2006)	GS. TS. Lê Đình Lương
	Tập năm : Công nghệ sinh học vi sinh và công nghệ môi trường (XB - 2006)	PGS. TS. Phạm Văn Ty

Bạn đọc có thể mua tại các Công ti Sách - Thiết bị trường học ở địa phương hoặc các Cửa hàng của Nhà xuất bản Giáo dục :

- *25 Hàn Thuyên, 187 Giảng Võ, 23 Tràng Tiền- Hà Nội.*
- *15 Nguyễn Chí Thanh - TP Đà Nẵng*
- *104 Mai Thị Lựu - Quận 1 - TP. Hồ Chí Minh.*

8 934980 533918

gt vi sinh vật học công
1 005070 800061
25.000 VNĐ

Giá : 25.000đ