

CHƯƠNG I

MỞ ĐẦU (3 tiết)

-Giảng viên: BSTY. Nguyễn Xuân Hòa - PGS. TS. Phạm Hồng Sơn. Trường Đại Học Nông Lâm Huế- Khoa Chăn Nuôi –Thú Y-Bộ môn Ký sinh – Truyền nhiễm

-Tóm tắt: Chương mở đầu với thời lượng 2 tiết trình bày trong 9 trang với các hình ảnh minh họa nhằm thể hiện các vấn đề chính sau:

Đối tượng của vi sinh vật học đại cương là vi khuẩn, virus, nấm men, nấm mốc tảo và protozoa. Vi sinh vật phân bố rộng rãi trong tự nhiên và ảnh hưởng rất lớn đến đời sống của con người và mọi sinh vật khác. Là môn học đại cương nên người học cần nắm vững đặc điểm hình thái, cấu tạo, tính chất lý hóa của mỗi đối tượng đồng thời nghiên cứu phương pháp để phát triển vi sinh vật có lợi phát triển và tìm cách để ức chế, hạn chế sự phát triển của vi sinh vật có hại trong cuộc sống. Lịch sử nghiên cứu về vi sinh vật được thể hiện qua 4 giai đoạn: trước khi phát minh ra kính hiển vi, kính hiển vi ra đời, Pasteur với các thực nghiệm, giai đoạn sau Pasteur và sinh học hiện đại. Ngày nay con người đã có thể có nhiều nghiên cứu chuyên sâu về vi sinh vật nhờ sự phát triển của sinh học phân tử và các kỹ thuật di truyền hiện đại.

- Mục tiêu của chương 1: Chương mở đầu giúp cho sinh viên có cách nhìn tổng quát về lịch sử các giai đoạn phát triển của ngành vi sinh vật học.

I. ĐỐI TƯỢNG VÀ NHIỆM VỤ CỦA VI SINH VẬT HỌC

1.1. Đối tượng của vi sinh vật học đại cương

Xung quanh chúng ta, ngoài các sinh vật lớn mà chúng ta có thể nhìn thấy được, còn có vô vàn vi sinh vật nhỏ bé, muốn nhìn thấy chúng phải sử dụng kính hiển vi, người ta gọi chúng là **vi sinh vật**. Môn khoa học nghiên cứu về hoạt động sống của các vi sinh vật được gọi là **Vi sinh vật học**.

Vi sinh vật học phát triển rất nhanh và đã dẫn đến việc hình thành các lĩnh vực khác nhau: vi khuẩn học (Bacteriology), nấm học (Mycology), tảo học (Algology) virus học (Virology),... Việc phân chia các lĩnh vực còn có thể dựa vào phương hướng ứng dụng. Do đó chúng ta thấy hiện nay còn có y sinh vi sinh vật học, vi sinh vật học thú y, vi sinh vật công nghiệp, vi sinh vật học nông nghiệp. [1]

Ngay trong vi sinh vật học nông nghiệp cũng có rất nhiều chuyên ngành: vi sinh vật lương thực, vi sinh vật thực phẩm,... Mỗi lĩnh vực có đối tượng cụ thể riêng, cần đi sâu. Tuy nhiên ở mức độ nhất định các chuyên ngành trên đều có những điểm cơ bản giống nhau.

Vi sinh vật học đại cương, nghiên cứu những quy luật chung nhất về vi sinh vật.

Đối tượng nghiên cứu của vi sinh vật học là vi khuẩn, xạ khuẩn (*Actinomycetes*), virus, *Bacteriophage* (thể thực khuẩn), nấm, tảo, nguyên sinh động vật.

Vi khuẩn: là nhóm vi sinh vật có nhân nguyên thủy, cơ thể đơn bào, sinh sản chủ yếu bằng hình thức trực phân, cơ thể nhỏ bé, muốn quan sát được phải sử dụng kính hiển vi quang học.

Virus: là những sinh vật mà kích thước của chúng vô cùng nhỏ bé, ký sinh nội bào tuyệt đối, muốn quan sát chúng phải sử dụng kính hiển vi điện tử.

Nấm: trước đây được coi là thực vật bậc thấp nhưng không có diệp lục tố, thường đơn bào, có nhóm giả đa bào, cơ thể phân nhiều nhánh nhưng không có vách ngăn hoặc vách ngăn nhưng chính giữa có lỗ thông, thuộc tế bào nhân thật.

Vi sinh vật tuy có kích thước nhỏ bé và có cấu trúc cơ thể tương đối đơn giản nhưng chúng có tốc độ sinh sôi nảy nở rất nhanh chóng và hoạt động trao đổi chất vô cùng mạnh mẽ.

Vi sinh vật có thể phân giải hầu hết tất cả các loại chất có trên thế giới, kể cả những chất rất khó phân giải, hoặc những chất gây hại đến nhóm sinh vật khác. Bên cạnh khả năng phân giải, vi sinh vật còn có khả năng tổng hợp nhiều hợp chất hữu cơ phức tạp, trong điều kiện nhiệt độ, áp suất bình thường.

1.2. Sự phân bố của vi sinh vật

Vi sinh vật phân bố rộng rãi trong tự nhiên: trong đất, nước, không khí, trên cơ thể các sinh vật khác, trên lương thực, thực phẩm và các loại hàng hóa. Chẳng những thế, sự phân bố của chúng còn theo một hệ sinh thái vô cùng phong phú, đa dạng, từ lạnh đến nóng, từ chua đến kiềm, từ háo khí đến kỵ khí,... Do sự phân bố rộng rãi và do hoạt động mạnh mẽ nên vi sinh vật có tác dụng rất lớn trong việc tham gia các vòng tuần hoàn vật chất trên trái đất cũng như tham gia vào các quá trình sản xuất nông nghiệp.

Vi sinh vật học đại cương, nghiên cứu những quy luật chung nhất về vi sinh vật.

1.3. Vai trò của vi sinh vật

Trong thiên nhiên, vi sinh vật giữ những mắt xích trọng yếu trong sự chu chuyển liên tục và bất diệt của vật chất, nếu không có vi sinh vật hay vì một lý do nào đó mà hoạt động của vi sinh vật bị ngừng trệ dù chỉ trong thời gian ngắn, có thể nó sẽ làm ngưng mọi hoạt động sống trên trái đất. Thật vậy người ta đã tính toán nếu không có vi sinh vật hoạt động để cung cấp CO₂ cho khí quyển thì đến một lúc nào đó lượng CO₂ sẽ bị cạn kiệt, lúc bấy giờ cây xanh không thể quang hợp được, sự sống của các loài sinh vật khác không tiến hành bình thường được, bề mặt trái đất sẽ trở nên lạnh lẽo. [1]

Vi sinh vật còn là nhân tố tham gia vào việc giữ gìn tính bền vững của các hệ sinh thái trong tự nhiên.

Đối với sản xuất nông nghiệp, vi sinh vật có vai trò rất lớn, vi sinh vật tham gia vào việc phân giải các hợp chất hữu cơ, chuyển hóa các chất khoáng, cố định nitơ phân tử để làm giàu thêm dự trữ nitơ của đất. Trong quá trình sống, vi sinh vật còn sản sinh ra rất nhiều chất có hoạt tính sinh học cao có tác dụng trực tiếp đối với quá trình sinh trưởng, phát triển của cây trồng, vật nuôi. Người ta nhận thấy nếu không có vi sinh vật tiêu thụ các sản phẩm trao đổi chất do cây trồng tiết ra quanh bộ rễ thì một số sản phẩm này sẽ đầu độc trở lại cây trồng.

Trong chăn nuôi và ngư nghiệp, vi sinh vật cũng có tác dụng rất to lớn, trong cơ thể của các loài động vật đều có một hệ vi sinh vật rất phong phú, hệ vi sinh vật này giúp cho quá trình đồng hóa các chất dinh dưỡng và thải các chất cặn bã trong quá trình sống.

Trong chăn nuôi một vấn đề lớn là làm thế nào để phòng chống được các bệnh truyền nhiễm, môn vi sinh vật thú y đã cùng môn dịch tễ học đã đề ra những biện pháp phòng dịch bệnh của súc vật và một số bệnh có thể lây sang người, như dại, lao, nhiệt thán,...

Hiện nay vi sinh vật là một môn khoa học mũi nhọn trong cuộc cách mạng sinh học. Nhiều vấn đề quan trọng của sinh học hiện đại như, nguồn gốc sự sống, cơ chế thông tin, cơ chế di truyền, cơ chế điều khiển học và các tổ chức sinh vật học, vi sinh vật học đang có những bước tiến vĩ đại, đang trở thành vũ khí sắc bén trong tay con người để nhằm chinh phục thiên nhiên phục vụ đắc lực cho sản xuất và đời sống.

1.4. Nhiệm vụ của vi sinh vật học đại cương[2]

-Nghiên cứu các đặc điểm cơ bản về hình thái, cấu tạo, di truyền, hoạt động sinh lý hóa học,...của các nhóm vi sinh vật.

-Sự phân bố của vi sinh vật trong tự nhiên và mối quan hệ giữa chúng với môi trường và các sinh vật khác.

-Nghiên cứu các biện pháp thích hợp để có thể sử dụng một cách có hiệu quả nhất vi sinh vật có lợi cũng như các biện pháp tích cực nhằm ngăn ngừa các vi sinh vật có hại trong mọi hoạt động của đời sống con người.

II. KHÁI YẾU VỀ LỊCH SỬ PHÁT TRIỂN CỦA VI SINH VẬT HỌC

Căn cứ vào quá trình phát triển có thể chia vi sinh vật học ra làm 4 giai đoạn phát triển.[3]

2.1. *Giai đoạn trước khi phát minh ra kính hiển vi*

Từ thời thượng cổ người ta đã biết ủ phân, trồng xen cây họ đậu với cây trồng khác, ủ men, nấu rượu,... nhưng chưa giải thích được bản chất của các biện pháp. Trong quá trình định canh con người đã thấy được tác hại của bệnh cây. Đối với bệnh "rỉ sắt" ở thời Aristote người ta xem như là do tạo hóa gây ra. Ở Hy Lạp bấy giờ người ta cho rằng cây bị bệnh là do đất xấu, phân xấu, gây ra khí hậu không ôn hoà nhưng chủ yếu là do trời đất. Trung Quốc vào thế kỷ thứ nhất trước công nguyên trong quyển "Ký thắng Chi thu" đã ghi: muốn cho cây tốt phải dùng phân tằm, không có phân tằm thì dùng phân tằm lẫn tạp cũng được. Trong sách này cũng đã ghi nhận trồng xen cây họ đậu với các loại cây trồng khác.

Trong các tài liệu "Giáp cốt" của Trung Quốc cách đây 4000 năm đã thấy đề cập đến kỹ thuật nấu rượu. Người ta nhận thấy trong quá trình lên men rượu có sự tham gia của mốc vàng, như vậy vi sinh vật đã được ứng dụng vào sản xuất, phục vụ cuộc sống từ rất lâu, nhưng người ta chưa hiểu được bản chất của vi sinh vật, mãi đến khi kính hiển vi quang học ra đời, những hiểu biết về vi sinh vật dần dần được phát triển, mở ra trước mắt nhân loại một thế giới mới, thế giới của những vi sinh vật vô cùng nhỏ bé nhưng vô cùng phong phú.

2.2. *Giai đoạn sau khi phát minh ra kính hiển vi (Phát hiện ra vi sinh vật)*

Leewenhoek là người đầu tiên phát hiện ra vi sinh vật nhờ phát minh ra kính hiển vi, Ông là một thương nhân buôn vải, muốn tìm hiểu cấu trúc của sợi vải ông đã chế tạo ra các thấu kính và lắp ráp chúng thành một kính hiển vi có độ phóng đại 160 lần, Ông đã quan sát nước ao tù, nước ngâm các chất hữu cơ, bựa răng,... Leewenhoek nhận thấy ở đâu cũng có những sinh vật nhỏ bé. Rất ngạc nhiên trước những hiện tượng quan sát được ông viết "Tôi thấy trong bựa răng của miệng của tôi có rất nhiều sinh vật tí hon hoạt động, chúng nhiều hơn so với vương quốc Hà Lan hợp nhất".

Phát minh của Leewenhoek củng cố quan niệm về khả năng tự hình thành của vi sinh vật. Thời gian này người ta cho rằng sinh vật quan sát được là từ các vật vô sinh, thịt, cá sinh ra dòi và sau đó người ta cho ra đời thuyết tự sinh (hay thuyết ngẫu sinh).

A- Kính hiển vi đầu tiên của nhân loại

B- Bình cổ ngỗng mà Pasteur đã đánh đổ học thuyết tự sinh

2.3. *Giai đoạn vi sinh vật học thực nghiệm với Pasteur*

Đến thế kỷ XIX cùng với sự phát triển của chủ nghĩa tư bản, các ngành khoa học kỹ thuật nói chung và vi sinh vật học nói riêng, phát triển mạnh mẽ, nhiều nhà khoa học đã quan sát và nghiên cứu về một số vi sinh vật gây bệnh và sáng tạo ra một số phương pháp mới để nghiên cứu về vi sinh vật. Đóng góp cho sự phát triển của vi sinh vật ở giai đoạn này phải kể đến nhà bác học người Pháp Pasteur (1822-1895). Với công trình nghiên cứu của mình ông đã đánh đổ học thuyết tự sinh, nhờ chế tạo ra bình cổ ngỗng.

Ông đã chứng minh thuyết tự sinh là không đúng bằng các thí nghiệm sau:

TN1: Dùng một cái bình chứa nước thịt đun sôi, để nguội sau một thời gian thì nước thịt đục, quan sát thấy có vi sinh vật.

TN2: Tiến hành như thí nghiệm thứ nhất nhưng sau đó ông bịt kín miệng bình lại, để một thời gian nước thịt không bị vẩn đục. Lúc này mọi người phản đối, họ nói không có không khí nên vi sinh vật không phát triển được, chưa thuyết phục được họ ông làm thí nghiệm tiếp theo.

TN3: Ông uốn cổ bình giống như hình cổ ngỗng kéo dài ra cho thông với không khí, sau khi đun sôi để một thời gian nước thịt không bị đục, khi đó người ta mới công nhận bác bỏ thuyết tự sinh.

Pasteur là người đã đề xuất thuyết mầm bệnh, thuyết miễn dịch học, là cơ sở để sản xuất vaccin trong phòng bệnh. Ông đã chứng minh bệnh than ở cừu là do vi khuẩn gây ra và lan truyền từ con bệnh sang con lành và ông đã tiến hành thí nghiệm tiêm phòng vaccin nhiệt thán cho cừu năm 1881, ông chọn 50 con cừu khỏe mạnh, tương đồng, tiêm vaccin cho 25 con còn 25 con không tiêm vaccin, sau đó cường độc thì 25 con không tiêm vaccin bị chết còn 25 con tiêm vaccin sống bình thường.

Thời đó hề bị chó dại cắn là phải chết, rất thương tâm trước cái chết của những người bị chó dại cắn, ông đã lao vào nghiên cứu vaccin phòng và trị bệnh chó dại, thành công đầu tiên là cứu một bé trai thoát khỏi phát bệnh dại. Sau khi thành công đó các nhà hảo tâm đã xây dựng viện Pasteur tại pháp, sau này nhân rộng ra, đây là thành công lớn nhất của Pasteur đối với nhân loại.

L. Pasteur tốt nghiệp sinh hóa, ông rất thành công trong nghiên cứu nhưng gia đình ông rất bất hạnh, anh trai và các con của ông đều chết do bệnh tật.

Mặc dầu L. Pasteur là người đầu tiên chứng minh cơ sở khoa học của việc chế tạo vaccin nhưng thuật ngữ vaccin lại do một bác sĩ nông thôn người anh Edward Jenner (1749-1823) đặt ra. Ông là người đầu tiên nghĩ ra phương pháp chủng đậu bằng mù đậu mùa bò cho người lành, để phòng bệnh đậu mùa, một căn bệnh hết sức nguy hiểm cho tính mạng thời bấy giờ.

2.4. Giai đoạn sau Pasteur và vi sinh học hiện đại

Tiếp theo sau Pasteur là Koch (Robert Koch 1843-1910), là người có công trong việc phát triển các phương pháp nghiên cứu vi sinh vật. Ông đề ra phương pháp chứng minh một vi sinh vật là nguyên nhân gây ra bệnh truyền nhiễm mà ngày nay mọi nhà nghiên cứu bệnh học phải theo và gọi là quy tắc Koch.

Ngày 24-3-1882, Koch công bố công trình khám phá ra vi trùng gây bệnh lao và gọi nó là *Mycobacterium tuberculosis*, là một bệnh nan y thời đó. Khám phá này mở đường cho việc chữa trị bệnh ngày nay.

Kế đó học trò của Koch là Petri (Juliyes Richard Petri, 1852-1921) chế ra các dụng cụ nghiên cứu vi sinh vật mà ngày nay còn dùng tên của ông để đặt cho dụng cụ ấy: đĩa Petri. Ông cũng nêu ra các biện pháp nhuộm màu vi sinh vật.

Ivanopxki, 1892 và Beijerrinck, 1896 là những người phát hiện ra virus đầu tiên trên thế giới khi chứng minh vi sinh vật nhỏ hơn vi khuẩn, qua được lọc bằng sứ xốp, là nguyên nhân gây bệnh khảm cây thuốc lá.

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



Hooke (1665) là người đầu tiên quan sát thấy tế bào

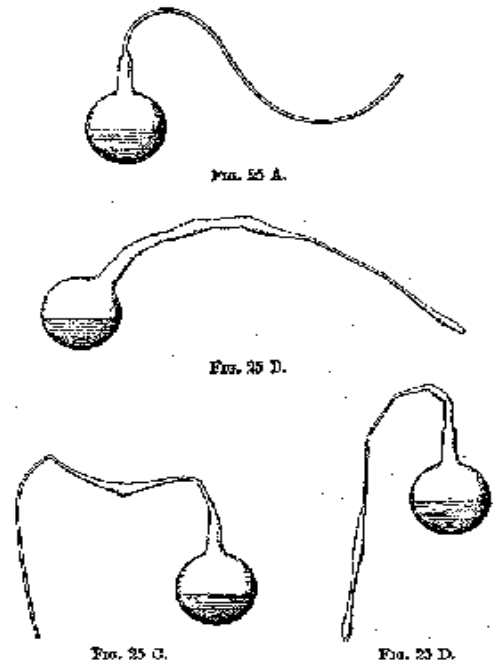


Anton van Leeuwenhoek (1632-1723)





Louis Pasteur (1822-1895)

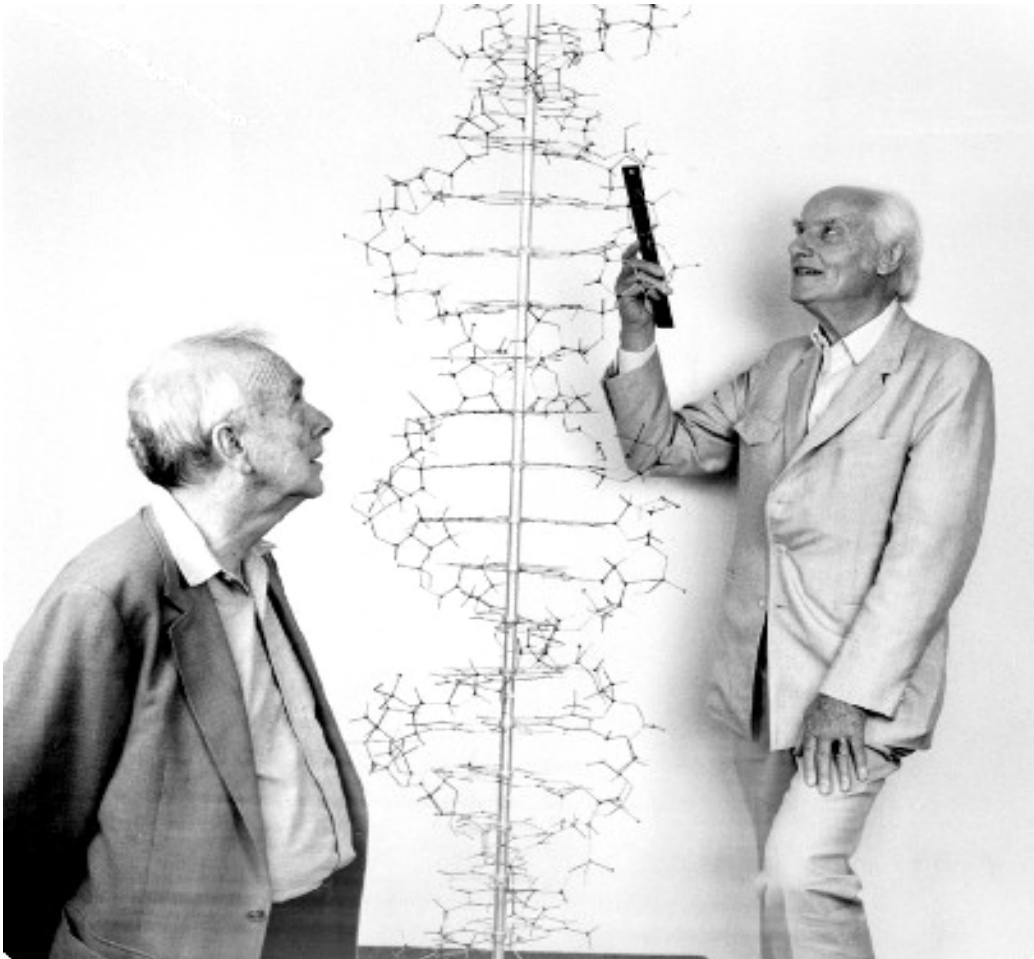


Robert Koch (1843-1910)

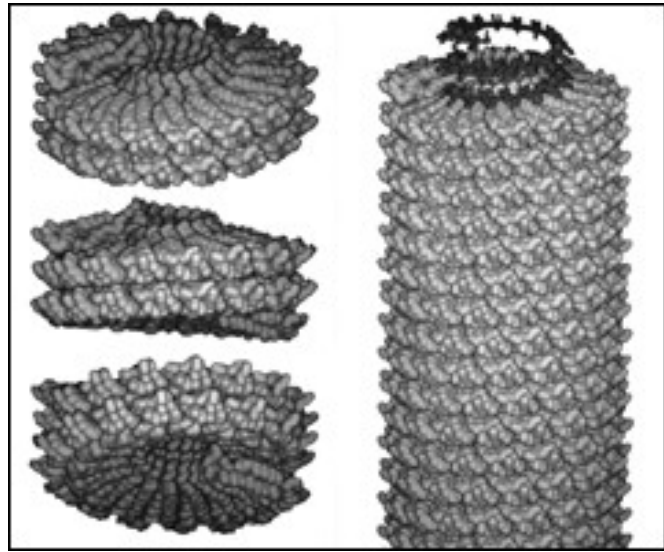




Alexander Fleming (1881-1955)



Watson and Crick (1953) phát hiễn ra cấu trúc của DNA



Klug (1982) phát hiên ra cấu trúc virus khảm thuốc lá (TMV)

MỘT SỐ MỐC TRONG LỊCH SỬ PHÁT TRIỂN VI SINH VẬT

Năm	Tác giả	Công trình
1665	Hooke	Lần đầu tiên quan sát thấy tế bào (bản)
1673	Van Leewenhoek	Lần đầu tiên quan sát thấy vi sinh vật sống
1785	Linnaeus	Phân loại các sinh vật
1798	Jenner	Lần đầu tiên tiêm chủng (mủ đậu) vaccin để phòng bệnh đậu mùa
1835	Bassi	Phát hiện ra bệnh nấm của tằm
1840	Semmelweis	Phát hiện sốt ở trẻ sơ sinh do nhiễm khuẩn
1853	Debary	Phát hiện ra bệnh nấm ở thực vật
1857	Pasteur	Phát hiện quá trình lên men
1864		Bác bỏ thuyết tự sinh
1866		Phát hiện phương pháp khử trùng kiểu Pasteur
1867	Lister	Đề xuất phương pháp phẫu thuật vô trùng
1870	Abbes	Phát hiện ra vật kính dầu
1876	Koch	Đề xuất lý thuyết mới về mầm bệnh
1879	Neisser	Phát hiện ra lậu cầu
1880	Pasteur	Đề xuất các kỹ thuật gây miễn dịch
1881	Koch	Đề xuất phương pháp phân lập thuần khiết vi khuẩn
1882	Koch	Phát hiện ra trực khuẩn nhiệt thán <i>Bacillus anthracis</i> và vi khuẩn lao <i>Mycobacterium tuberculosis</i> Phát hiện ra môi trường đặc nuôi cấy vi sinh vật
1883	Koch	Phát hiện ra vi khuẩn tả, đề xuất biện pháp tẩy uế
1884	Metchnikoff Gram Escherich	Đề xuất học thuyết thực bào Đề xuất phương pháp nhuộm Gram Phát hiện ra vi khuẩn <i>E. coli</i>

1887	Petri	Đề xuất nuôi cấy vi sinh vật bằng hộp lồng
1890	Von Bering Erhlich	Phát hiện kháng độc tố bạch hầu Đề xuất lý thuyết miễn dịch
1892	Ivanopxki	Phát hiện ra virus
1898	Shiga	Phát hiện vi khuẩn lị
1910	Erhlich	Phát hiện ra xoắn thể giang mai
1928	Fleming Griffith	Khám phá ra Penicillin Phát hiện hiện tượng biến nạp
1934	Lancefield	Phát hiện kháng nguyên của liên cầu khuẩn
1935	Stanley, Northrup, Summer	Phát hiện ra virus kết tinh
1941	Bead and Tatum	Đề xuất mối quan hệ giữa gen và enzyme
1943	Delbruck and Luria	Sự xâm nhập của virus vào vi khuẩn
1944	Avery, McLeod, McCarty	Chứng minh vật chất di truyền là ADN
1946	Lederberg and Tatum	Phát hiện hiện tượng tiếp hợp
1953	Watson and Crick	Khám phá ra cấu trúc của ADN
1957	Jacob and Monod	Phát hiện ra sự điều hòa trong tổng hợp protein
1959	Sterwart	Nguyên nhân virus đối với ung thư
1962	Edelman and Porter	Phát hiện ra kháng thể
1964	Epstein, Achong, Barr	Phát hiện ra virus gây ung thư ở người
1969	Whittaker	Đề xuất hệ thống phân loại 5 giới sinh vật
1971	Nathans, Smith, Arber	Phát hiện ra men Pesticitaza dùng trong kỹ thuật di truyền
1973	Berg, Boyer, Cohen	Đề xuất kỹ thuật di truyền
1975	Dulbeco, Temin, Baltimore	Phát hiện ra Transcriptaza ngược
1978	Aber, Smith, Nathans Mithchell	Phát hiện ra men Endonucleaza giới hạn Phát hiện ra cơ chế thẩm thấu hóa học
1981	Margulis	Đề xuất nguồn gốc tế bào nhân thực
1982	Klug	Phát hiện ra cấu trúc của virus khảm thuốc lá
1983	McClintock	Phát hiện ra gen nhảy ở ngô 1983
1988	Deisenhofer, Huber, Michel	Phát hiện sắc tố quang hợp của vi khuẩn

-Câu hỏi ôn tập:

1. Trình bày đối tượng, nhiệm vụ của vi sinh vật học đại cương.
2. Nêu khái yếu về các giai đoạn phát triển của vi sinh vật học.

-Tài liệu tham khảo:

1. Nguyễn Lân Dũng, Nguyễn Đình Quyến, Phạm Văn Ty (2000). Nhà xuất bản giáo dục Hà Nội.

2. Biên Văn Minh, Phạm Văn Ty, Kiều Hữu ảnh, Phạm Hồng Sơn, Phạm Ngọc Lan, Nguyễn Thị Thu Thủy (2006). Giáo trình vi sinh vật học. Nhà xuất bản Đại học Huế.

3. Nguyễn Khắc Tuấn(1999). Vi sinh vật học, nhà xuất bản nông nghiệp Hà Nội.

-Giải thích thuật ngữ:

Actinomycetes (xạ khuẩn): Vi khuẩn hiếu khí, Gram dương có tỷ lệ G+C cao, khuẩn ty phân nhánh, hình thành bào tử vô tính.

Bacteriophage (thể thực khuẩn): Virus gây nhiễm ở prokaryota.

CHƯƠNG II - HÌNH THÁI HỌC VI KHUẨN (9 tiết)

-**Tên giảng viên:** BSTY. Nguyễn Xuân Hòa - PGS. TS. Phạm Hồng Sơn

-**Tóm tắt:** 29 trang và hình ảnh minh họa phục vụ cho 9 tiết giảng chương 2 nhằm giới thiệu một số thiết bị sử dụng trong nghiên cứu vi sinh vật, phương pháp nghiên cứu về hình thái, cấu tạo của vi khuẩn. Chương hai còn giới thiệu một số dạng hình thái phổ biến của vi khuẩn và cấu trúc của tế bào vi khuẩn.

-**Mục tiêu:** thông qua chương hai giúp cho sinh viên nắm được các phương pháp chính trong nghiên cứu vi sinh vật, đồng thời thấy được sự khác nhau cơ bản trong cấu trúc của hai nhóm vi khuẩn Gram âm và Gram dương liên quan đến đời sống con người và thú y.

I. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU HÌNH THÁI, KÍCH THƯỚC VÀ CẤU TẠO TẾ BÀO VI KHUẨN

Phương tiện nghiên cứu: kính hiển vi quang học, kính hiển vi điện tử, các phương pháp làm tiêu bản soi tươi, nhuộm màu và các máy cần thiết khác.

1. Kính hiển vi quang học thường

Kính hiển vi: có nhiều loại như quang học, phản pha, huỳnh quang, soi nổi,...

Nguyên lý các loại kính hiển vi có cấu tạo giống nhau. Có hai phần chính là phần cơ học và phần quang học.

Phần cơ học: bảo đảm cho kính vững chắc và điều khiển được. Phần này cấu tạo gồm chân kính, khay kính, trụ, ống kính, ốc điều chỉnh vĩ cấp, ốc điều chỉnh vi cấp, bàn quay, vật kính và các vít dịch chuyển mẫu vật.

Phần quang: hệ thống cung cấp ánh sáng và hệ thống thấu kính phóng đại.

+ Phần cung cấp ánh sáng: gương, đèn, (hoặc ánh sáng tự nhiên), tụ quang kính, màn chắn.

+ Hệ thống thấu kính gồm có vật kính, thị kính và khối lăng kính.

+ Độ phóng đại của kính bằng tích độ phóng đại của vật kính và thị kính

+ Vật kính có hai loại: khô và dầu, vật kính dầu có độ phóng đại lớn và độ mở hẹp nên người ta cho thêm giọt dầu (nước, glycerin) dưới kính để loại trừ sự khúc xạ ánh sáng giữa vật kính và không khí.

2. Quy tắc sử dụng kính hiển vi

-Trước hết phải kiểm tra vị trí của tụ quang kính. Nó phải ở vị trí cao nhất. Màn chắn phải mở.

-Vặn ổ quay vật kính để lấy vật kính nhỏ nhất

- Nhìn vào thị kính và điều chỉnh gương để có được ánh sáng tốt nhất.

-Sau đó nhỏ một giọt dầu lên tiêu bản đặt lên bàn kính. Vặn ổ quay vật kính để lấy vật kính dầu (100) sao cho phần thấu kính ngấp trong dầu.

Nhìn vào thị kính và điều chỉnh ốc vĩ cấp (quay chậm) để lấy tiêu cự. Điều chỉnh độ tương phản bằng ốc vi cấp.

-Sau khi quan sát, quay ổ quay vật kính để lau dầu bằng dung môi thích hợp, thấm trên giấy thấm hoặc vải màn. Hạ tụ quang kính. Đặt kính.

Hiện nay còn có kính hiển vi hai ống ngắm, hay kính hiển vi soi nổi, kính hiển vi nền đen, kính hiển vi tương phản cấu tạo hiện đại và phù hợp với mục đích sử dụng.

3. Kính hiển vi điện tử

Tất cả các bộ phận được đặt trong một trụ kính và tạo chân không bằng một bơm hút. Trong chân không, hoạt động của điện tử không bị cản trở.

Các điện tử bắn xuyên qua mẫu vật, được các vật kính và thị kính bằng từ trường làm tán rộng ra (phân kỳ), sau cùng hiện lên màn huỳnh quang có bộ máy chụp ảnh để chụp khi cần.

Vi khuẩn là những vi sinh vật đơn bào, chúng có kích thước thay đổi tùy từng loài, chiều dài từ 0,2-20 μm chiều ngang 0,2-8 μm , vi khuẩn có hình thái riêng đặc tính sinh học riêng, một số loại có khả năng gây bệnh cho người, động vật và thực vật, một số có khả năng tiết ra chất kháng sinh (*Bacillus subtilis*). Đa số sống hoại sinh trong tự nhiên.

Đa số vi khuẩn có hình thái xác định, hình thái này do màng tế bào quyết định, cá biệt một số loại không có màng nên hình thái không xác định.



II. Phương pháp làm tiêu bản hiển vi

2.1. Phương pháp làm tiêu bản soi tươi (giọt ép, giọt treo)

Tiêu bản giọt ép: Dùng phiến kính sạch đã tẩy mỡ, giở lên phiến kính một giọt canh khuẩn hay dung dịch bệnh phẩm, sau đó đặt la men (lá kính) lên, quan sát kính hiển vi quang học.

Tiêu bản giọt treo: dùng phiến kính có hốc lõm ở giữa, cho lên giữa la men một giọt canh khuẩn hay dung dịch bệnh phẩm, đặt phiến kính lên, sau đó lật ngược phiến kính sao cho giọt dung dịch treo lơ lửng trong hốc lõm, cho vaselin lên cạnh của la men để chống mất nước.

Sau khi làm tiêu bản soi tươi, quan sát kính hiển vi quang học có thể biết được hình thái, kích thước, tính chất di động của vi khuẩn, nó cho phép bước đầu phân biệt, nhận dạng được hình thái của vi khuẩn.

2.2. Phương pháp làm tiêu bản nhuộm và soi kính hiển vi quang học

Khi quan sát mẫu vật qua kính hiển vi quang học, phần lớn cơ cấu bên trong của vi sinh vật có chiết suất gần bằng nhau cho nên rất khó phân biệt được. Để có thể quan sát dễ dàng hơn chúng ta phải nhuộm màu tiêu bản.

Nhuộm vi khuẩn quan sát dưới kính hiển vi quang học là phương pháp không thể thiếu được trong quá trình xét nghiệm vi khuẩn.

Phần lớn màu nhuộm trong vi sinh vật là các muối và được phân làm hai nhóm: nhóm màu acid gồm các muối mà ion mang màu là anion (mang điện tích -), và các nhóm base có ion mang màu là các cation (mang điện tích dương). Ví dụ: sodium⁺ (có tính base), eosinate⁻ (có tính acid).

Màu acid vì nó mang màu hợp với một base (NaOH) để cho ra muối màu. Còn màu base vì ion mang màu có tác dụng như một base, phối hợp với một acid (HCl) cho ra muối màu.

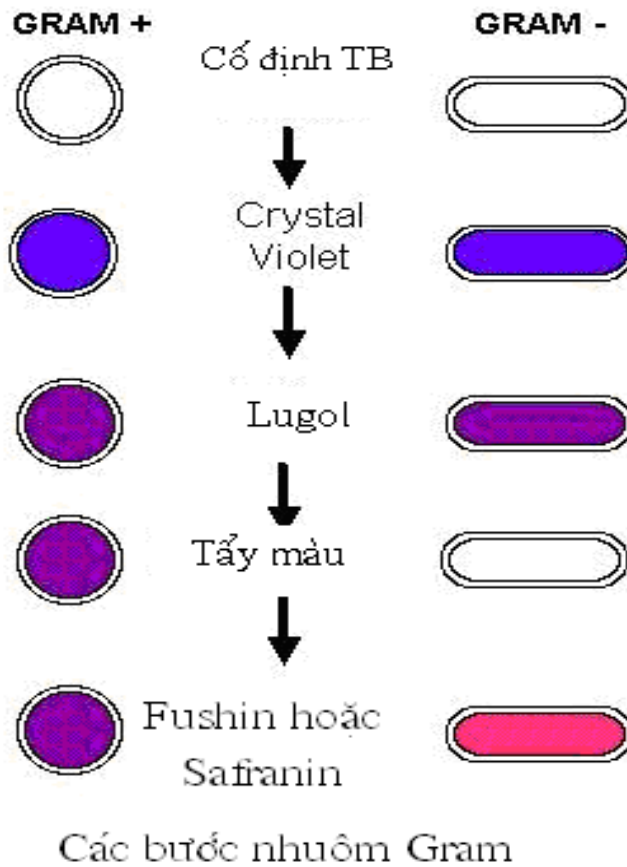
Một cách tổng quát, màu acid phối hợp chặt với thành phần của tế bào chất của tế bào còn màu base phối hợp (ăn màu) với thành phần của nhân tế bào (có tính acid).

Một số màu thuốc nhuộm chỉ bao phủ mặt ngoài mẫu vật, được nhuộm do quá trình hấp thu hoặc nó tan hay kết tủa chung quanh vật được nhuộm.

Nhuộm đơn: là phương pháp nhuộm màu chỉ sử dụng một loại thuốc nhuộm, các loại thuốc nhuộm thường dùng là methylene blue, crystal violet, fuchsin, với nấm thường dùng dung dịch Lactophenol cotton blue (nấm bắt màu xanh).

Nhuộm Gram: phương pháp này do Hans Christian J. Gram (1853-1938) là phương pháp nhuộm màu kép phổ biến trong nghiên cứu vi khuẩn, thường dùng để nhuộm màu của một số chi vi khuẩn, cũng có những chi không bắt màu. Phương pháp nhuộm màu này cho phép chúng ta chia vi khuẩn ra làm hai nhóm chính, nhóm vi khuẩn Gram âm và nhóm vi khuẩn Gram dương, đây là phương pháp quan trọng trong việc phân loại vi khuẩn.[1]

+Phương pháp nhuộm Gram



Đầu tiên cố định tiêu bản trên ngọn lửa đèn cồn, nhuộm màu qua 4 bước:

-Thuốc đầu tiên là dung dịch tím tinh thể (Crystal violet) trong khoảng 1 phút. Rửa bằng nước.

-Nhuộm tiếp bằng dung dịch lugol (dung dịch cồn Iot 1%) trong 1phút, rửa lại bằng nước.

-Phủ lên vết bôi dung dịch tẩy màu (metanol 95% acetone 1:1) hoặc cồn 96^o trong khoảng 20 giây đến 1 phút, rửa bằng nước,

-Cuối cùng nhỏ lên vết bôi dung dịch fuchsin (đỏ tím) hay safranin (đỏ vàng) để 1 phút rửa nước, để khô tự nhiên sau đó soi dưới kính hiển vi.

Nhóm vi khuẩn Gram dương có đặc tính không bị dung môi hữu cơ tẩy phức chất màu giữa tím tinh thể và Iod. Kết quả cuối cùng sẽ bắt màu tím. Nhóm vi khuẩn Gram âm bị dung môi hữu cơ tẩy phức chất màu giữa tím tinh thể và Iod, do đó sẽ bắt màu thuốc nhuộm bổ sung, kết quả bắt màu đỏ hồng.

Bằng nhiều phương pháp kỹ thuật nhuộm khác nhau như phương pháp nhuộm đơn, nhuộm kép.

Nhuộm tiêu mao: Đường kính của roi vi khuẩn rất nhỏ nên khó quan sát được ở kính hiển vi quang học. Để quan sát được cần nhuộm màu đặc biệt. Nguyên tắc, trước hết phủ lên roi một lớp hóa chất để làm cho roi to ra, hóa chất này giữ màu nhuộm. Hóa chất thường dùng để phủ lên roi có thể là tannic acid, màu nhuộm có thể dùng pararosaniline.

2.3. Phương pháp quan sát dưới kính hiển vi điện tử

Để quan sát dưới kính hiển vi điện tử, mẫu vật được cắt lát thành những lát cắt thật mỏng, bề dày dưới 1 μm có thể đạt đến 0,02 μm , mẫu vật cần được nhuộm bằng những chất ngăn cản điện tử để tạo sự tương phản của ảnh trên màn huỳnh quang. Các hóa chất dùng để

nhuộm mẫu là basic lead citrate, hoặc uranyl acetate 1%,... Ảnh do kính hiển vi điện tử cung cấp có thể quan sát trực tiếp, cũng có thể chụp nhờ bộ phận chụp gắn dưới màn huỳnh quang. Qua kính hiển vi điện tử ta có thể thấy rõ được các vi cấu trúc bên trong của vi khuẩn.

II. HÌNH THÁI VÀ KÍCH THƯỚC CỦA VI KHUẨN [2]

Vi khuẩn (*Bacteria*) là những vi sinh vật mà cơ thể chỉ gồm một tế bào, chúng có hình dạng và kích thước thay đổi tùy theo từng loại, chiều dài khoảng 1-10 μm chiều ngang khoảng 0,2 - 10 μm . Vi khuẩn có hình thái riêng, đặc tính sinh vật học riêng. Cấu tạo chưa hoàn chỉnh (chưa có nhân thật) một số có khả năng gây bệnh cho người, động vật, và thực vật, một số có khả năng tiết kháng sinh (*Bacillus subtilis*) đa số sống hoại sinh trong tự nhiên.

Dựa vào hình thái bên ngoài của vi khuẩn, người ta chia vi khuẩn ra làm 6 loại hình thái khác nhau: cầu khuẩn, trực khuẩn, cầu trực khuẩn, phẩy khuẩn, xoắn khuẩn, xoắn thể.

2.1. Cầu khuẩn (*Coccus*)

Coccus, số nhiều là *cocci*, từ chữ Hy Lạp là *Kokkys* (quả mọng), có nghĩa là loại vi khuẩn này có hình thái giống như quả mọng.

Cầu khuẩn là những vi khuẩn có dạng hình cầu, tuy nhiên có loại không thật giống với hình cầu, thường có hình bầu dục như lậu cầu khuẩn *Neisseria gonorrhoeae*, bắt màu Gram âm hoặc có dạng hình ngọn lửa nến như *Streptococcus pneumoniae*, bắt màu Gram dương. Kích thước của cầu khuẩn thay đổi trong khoảng 0,5 - 1 μm (1 μm = 10^{-3} mm). Tùy theo vị trí của mặt phẳng phân cắt và đặc tính rời hay dính nhau sau khi phân cắt mà cầu khuẩn được chia thành các loại sau đây:

a- Đơn cầu khuẩn (*Micrococcus*):

Thường đứng riêng rẽ từng tế bào một, đa số sống hoại sinh trong đất, nước, không khí như: *M. agillis*, *M. roseus*, *M. luteus*.

b- Song cầu khuẩn (*Diplococcus*)

Cầu khuẩn được phân cắt theo một mặt phẳng xác định và dính với nhau thành từng đôi một, một số loại có khả năng gây bệnh như lậu cầu khuẩn gonococcus.

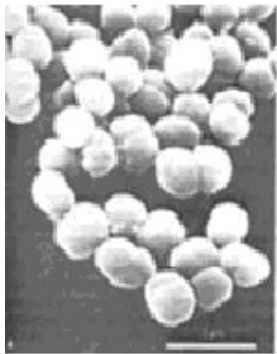
c-Liên cầu khuẩn

Cầu khuẩn phân cắt bởi một mặt phẳng xác định và dính với nhau thành một chuỗi dài. *Streptococcus lactis* vi khuẩn lên men lactic, *Streptococcus pyogenes* liên cầu khuẩn sinh mủ.

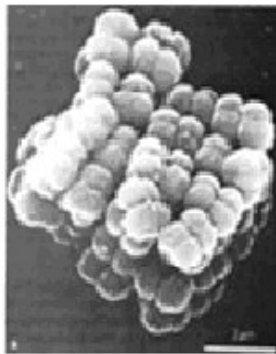
Trong chi này còn có loại liên song cầu khuẩn, tức là song cầu khuẩn tập trung từng đôi một thành chuỗi dài.

Liên cầu khuẩn có trong đất, nước không khí, ký sinh trên niêm mạc đường tiêu hoá, hô hấp của người và động vật, một số loại có khả năng gây bệnh. Chiều dài của liên cầu phụ thuộc vào môi trường. Trong bệnh phẩm liên cầu xếp thành chuỗi ngắn 6-8 đơn vị, trong môi trường lỏng 10-100 đơn vị, môi trường đặc hình thành chuỗi ngắn.

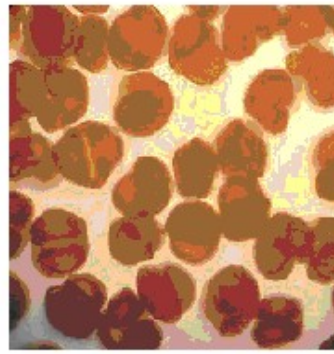
Các dạng hình thái cầu khuẩn



Micrococcus



Staphylococcus



Diplococcus



Sarcina



Streptococcus

d- Tứ cầu khuẩn (*Tetracoccus*)

Cầu khuẩn phân cắt theo hai mặt phẳng trực giao và sau đó dính với nhau thành từng nhóm 4 tế bào, tứ cầu khuẩn thường sống hoại sinh nhưng cũng có loại gây bệnh cho người và động vật như *Tetracoccus homari*.

e- Bát cầu khuẩn (*Sarcina*)

Cầu khuẩn phân cắt theo 3 mặt phẳng trực giao và tạo thành khối gồm 8, 16 tế bào. Hoại sinh trong không khí như *Sarcina urea* có khả năng phân giải ure khá mạnh. *Sarcina putea*, *Sarcina aurantica*.

f- Tụ cầu khuẩn (*Staphylococcus*)

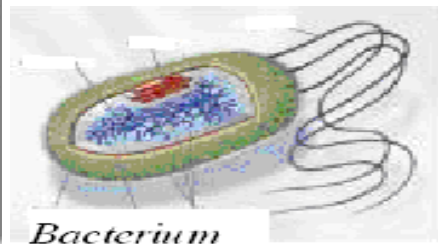
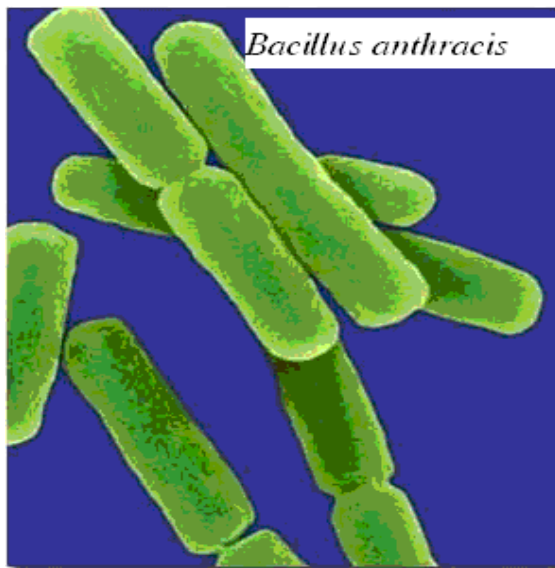
Phân cắt theo các mặt phẳng bất kỳ và dính với nhau thành từng đám như hình chùm nho, hoại sinh hoặc ký sinh gây bệnh cho người và gia súc, nói chung cầu khuẩn không có tiên mao roi nên không có khả năng di động, khi nhuộm màu đa số cầu khuẩn bắt màu Gram dương. Đa số sống hoại sinh một số gây bệnh như *Staphylococcus aureus* - tụ cầu vàng

2.2. Trục khuẩn (*Bacillus*, *Bacterium*)

Bacillus (nghĩa rộng) số nhiều là *Bacilli*, tiếng La Tinh nghĩa là que ngắn.

Bacterium (nghĩa hẹp) số nhiều là *Bacteriae* từ chữ Hy Lạp là Bakterion: que ngắn.

Trục khuẩn là tên chung để chỉ những vi khuẩn có dạng hình que, hình gậy, kích thước của vi khuẩn khoảng 0,5-1 x 1-4µm, có những chi thường gặp như:



a- *Bacillus (Bac)*

Là trực khuẩn Gram dương, sống yếm khí tùy tiện, sinh nha bào, chiều ngang của nha bào không vượt quá chiều ngang của tế bào vi khuẩn, do đó khi vi khuẩn mang nha bào vẫn không thay đổi hình dạng. Ví dụ: Trực khuẩn gây bệnh nhiệt thán *Bacillus anthracis*, trực khuẩn cỏ khô *Bacillus subtilis*. *Bacillus subtilis* là một trực khuẩn có lợi trong hệ vi khuẩn đường ruột, chúng ức chế sự phát triển các vi sinh vật có hại đối với đường tiêu hoá.

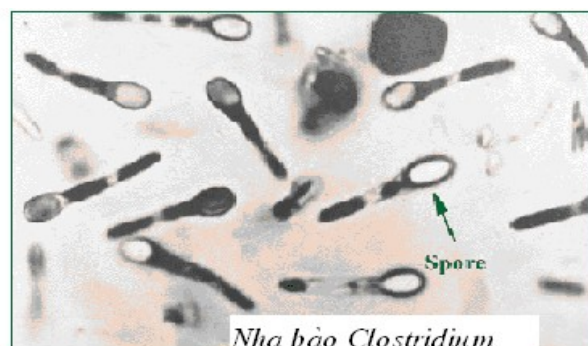
b- *Bacterium*

Là trực khuẩn Gram âm, sống hiếu khí tùy tiện không sinh nha bào, thường có tiên mao ở xung quanh thân, có nhiều loại *Bacterium* gây bệnh cho người và gia súc như, *Salmonella*, *Escherichia*, *Shigella*, *Proteus*.

c- *Clostridium*

Là trực khuẩn Gram dương, hình gậy hai đầu tròn kích thước khoảng 0,4 -1 x 3 - 8 μ m, sinh nha bào, chiều ngang của nha bào thường lớn hơn chiều ngang của tế bào vi khuẩn, nên khi mang nha bào vi khuẩn bị biến đổi hình dạng như hình thoi, hình vọt, hình dùi trống.

Clostridium là loại vi khuẩn kỵ khí bắt buộc, có nhiều loại gây bệnh cho người và gia súc như: *Clostridium tetani*, *Clostridium chauvoei* (ung khí thán), *Clostridium pasteurianum* (vi khuẩn cố định nitơ). *Clostridium tetani* nha bào có trong đất và những nơi ẩm ướt dơ bẩn, nha bào tồn tại rất lâu, nếu chúng xâm nhập vào vết thương sẽ phát triển, sinh độc tố thần kinh gây co cứng gọi là bệnh uốn ván.



d- *Corynebacterium*

Vi khuẩn không sinh nha bào, có hình dạng và kích thước thay đổi khá nhiều tùy từng giống, khi nhuộm màu vi khuẩn thường tạo thành các đoạn nhỏ bất màu khác nhau ví dụ:

Corynebacterium diphtheriae (gây bệnh bạch hầu) bắt màu hai đầu hình quả tạ, *Erysipelothrix rhusiopathiae* gây bệnh đóng dấu lợn, gây viêm da và tổ chức dưới da.

2.3. Cầu trực khuẩn (Cocco-Bacillus)

Là những vi khuẩn trung gian giữa cầu khuẩn và trực khuẩn, vi khuẩn có hình bầu dục, hình trứng, kích thước khoảng 0,25-0,3 x 0,4 -1,5 μm . Một số bắt màu tập trung ở hai đầu (vi khuẩn lưỡng cực). Ví dụ: vi khuẩn gây bệnh tụ huyết trùng: *Pasteurella*. Vi khuẩn gây sẩy thai truyền nhiễm *Brucella*.

2.4. Phẩy khuẩn (Vibrio)

Là tên chung để chỉ những vi khuẩn hình que uốn cong lên, có hình giống hình dấu phẩy, hình lưỡi liềm, đứng riêng rẽ hay nối với nhau thành hình chữ S hay số 8, có tiên mao. Phần lớn sống hoại sinh, có một số loại gây bệnh như *Vibrio cholerae*.

2.5. Xoắn thể (Spirillum)

Là nhóm vi khuẩn Gram âm hiếu khí hoặc vi hiếu khí, di động, có dạng xoắn, xoắn khuẩn gây bệnh thuộc chi *Campylobacter*. Trước đây *Campylobacter* được xếp vào chi *Vibrio* về sau chúng được xếp vào nhóm *Spirillum* vì các vi khuẩn này khác biệt với nhóm phẩy khuẩn nhờ số vòng xoắn đầy đủ. Về hình thái xoắn thể khác với nhóm xoắn khuẩn (*Spirochaeta*) do số vòng xoắn ít hơn, vòng xoắn của xoắn thể không làm cho đường kính cơ thể tăng lên, xoắn thể không có cấu trúc sợi trục chu chất và lớp bao ngoài, vách tế bào cứng và di động mạnh nhờ có lông roi ở cực tế bào.

Campylobacter là những vi khuẩn Gram âm, có dạng chữ S hay dấu phẩy, có một lông roi ở một cực hoặc hai cực, di động theo kiểu vặn nút chai, kích thước 0.2-0.8 x 0.5 –5.0 μm nhưng đôi khi có dạng cầu khuẩn, thông thường không có giáp mô, tuy có khi *C. jejuni* lại thấy có giáp mô.

2.6. Xoắn khuẩn (Spirochaeta)

Cấu trúc cơ bản của xoắn khuẩn là màng tế bào chất của tế bào kéo dài được bọc trong một màng phức hợp bên ngoài vách tế bào tạo thành ống tế bào chất, phía ngoài được bao bọc bởi lớp vỏ ngoài hay lớp bao nhầy. Khoảng không gian giữa màng tế bào chất và lớp vỏ ngoài này được gọi là không gian chu chất. Có tiên mao xuất phát từ hai cực tế bào, những sợi tiên mao này hướng vào giữa tế bào. Bắt màu Gram âm, nhưng thường khó bắt màu nên để quan sát xoắn khuẩn thường sử dụng các phương pháp nhuộm nhiễm bạc, hoặc quan sát tiêu bản sống dưới kính hiển vi nền đen.

Xoắn khuẩn di động uốn khúc, vặn xoắn, uốn lượn, sinh sản bằng cách phân chẻ theo chiều ngang.

Leptospira canicola theo nước và thức ăn vào máu, gan, thận gây loạn chức năng của các cơ quan này dẫn đến xuất huyết và vàng da.

Điểm so sánh	Xoắn thể	Xoắn khuẩn
Số vòng xoắn	Số vòng xoắn ít hơn	Số vòng xoắn lớn hơn 2
Đặc điểm vòng xoắn	Không làm cho đường kính cơ thể tăng lên	Làm cho đường kính cơ thể tăng lên
Nhuộm Gram	Âm	Gram âm, khó bắt màu, nhuộm nhiễm bạc
Lông roi	ở một cực hoặc ở hai cực	Xuất phát từ hai cực tế bào hướng vào giữa
Di động	Nhờ lông roi ở cực tế	Di động uốn khúc, vặn xoắn, uốn

	bào	lượn
Cấu trúc	Không có cấu trúc sợi trục chu chất và lớp bao ngoài Có vách tế bào cứng	Có cấu trúc sợi trục chu chất và lớp bao ngoài, màng tế bào chất kéo dài Không có vách cứng, chỉ là lớp màng hay bao nhầy

2.7. Một số nhóm vi khuẩn đặc biệt

2.7.1. Xạ khuẩn [3]

Là nhóm vi sinh vật đơn bào, dạng sợi hình tia phóng xạ, có kích thước và cấu trúc tương tự như tế bào vi khuẩn thông thường, đa số sống hiếu khí trong đất, gram dương.

Xạ khuẩn có kết cấu tế bào dạng sợi-khuẩn ty, có đường kính trong khoảng 1-1.5 μ . Nuôi cấy trên môi trường đặc có thể phân biệt được ba loại khuẩn ty:

-Khuẩn ty cơ chất (ăn sâu vào trong môi trường làm nhiệm vụ hấp thụ chất dinh dưỡng) còn gọi là khuẩn ty dinh dưỡng.

-Khuẩn ty trên cơ chất phát triển trên bề mặt môi trường

-Khuẩn ty khí sinh mọc lộ ra khỏi bề mặt môi trường. Đôi khi khuẩn ty không có khuẩn ty cơ chất hặc khuẩn ty khí sinh. Khuẩn ty cơ chất hoặc khí sinh thường phân hóa thành các cành bào tử (sinh ra các bào tử theo kiểu kết đoạn và cắt khúc) và chúng tạo thành khuẩn lạc của xạ khuẩn.

-Khuẩn lạc xạ khuẩn rắn chắc, bề mặt xù xì, có dạng nhẵn. Dạng vôi, dạng nhung tơ hay dạng màng xơ. Khuẩn lạc xạ khuẩn thường có dạng phóng xạ hay dạng đồng tâm đường kính 0.5-10 μ .

-Khuẩn lạc xạ khuẩn thường có màu sắc rất đẹp: trắng, đỏ, vàng, nâu, xanh, hồng tím,...đây là tiêu chí quan trọng trong định tên xạ khuẩn.

Xạ khuẩn phân bố rộng rãi trong tự nhiên và có vai trò quan trọng về nhiều mặt:

+Tham gia vào quá trình phân giải mạnh các hợp chất hữu cơ kể cả các chất phức tạp như cellulose, kitin, keratin, pectin, linhin,...trong đất bùn do đó làm tăng độ phì của đất và góp phần làm cân bằng các thành phần vật chất trong tự nhiên.

+Hầu hết các xạ khuẩn thuộc chi *Actinomyces* có khả năng sinh kháng sinh, nhiều kháng sinh quan trọng hiện nay được chiết suất từ xạ khuẩn như: tetracyclin, streptomycin, chloramphenicol (chất này hiện nay thú y cấm sử dụng),...một số kháng sinh sản xuất từ xạ khuẩn có tác dụng diệt côn trùng hay tuyến trùng,...

+Một số xạ khuẩn có khả năng tổng hợp mạnh các chất sinh học như vitamin nhóm B, một số acid hữu cơ hay các enzyme như proteaza, amylaza, kitinaza,...

+Một số xạ khuẩn có thể gây hại cho các vi sinh vật trong đất do nó tiết độc tố phytotoxin. Một số có khả năng gây bệnh cho người, gia súc được gọi chung là bệnh *Actinomycose*.

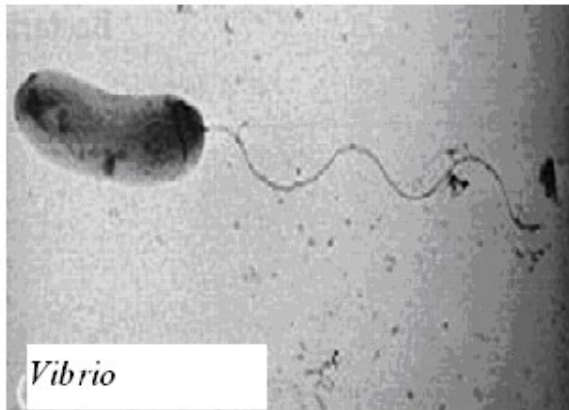
2.7.2. Mycoplasma và dạng L của vi khuẩn

Năm 1898, Nocard và Roux (Pháp) đã phát hiện thấy *Mycoplasma* trong bệnh viêm phổi-màng phổi nên được đặt tên là P.P.O (Pleuro pneumonia organisme), nhưng sau đã phân lập thấy các dạng tương tự trong cơ thể dê, cừu, chó,... nên gọi chung là nhóm P.P.L.O (Pleuro pneumonia like organisme nhóm vi sinh vật giống loại gây nên bệnh viêm màng phổi-phổi).

Hình thái: do chưa có vỏ tế bào nên có hình thái dễ biến đổi như hình hạt nhỏ riêng lẻ hay kết thành đôi hình chuỗi ngắn, hình ovan, hình vòng khuyên, hình sợi hay hình sao.

Kích thước nhỏ bé 0.1µm nhỏ hơn vi khuẩn hàng chục lần. Nhiều *Mycoplasma* chỉ chứa khoảng 1.200 đại phân tử protein.

Cấu tạo tế bào chưa hoàn chỉnh, chưa có vỏ tế bào chỉ có màng nguyên sinh chất. Trong tế bào có chứa các hạt ribosom và sợi nhân (thể nhân-nucleoid).



Một số đặc điểm chính của *Mycoplasma*

-Sinh sản không theo phương pháp phân cắt do không có mezosome mà bằng cách tương tự như nảy chồi hoặc phân cắt các đầu sợi thành các thể hình cầu mới.

-Khó bắt màu thuốc nhuộm thông thường, phải dùng thuốc nhuộm Gemsa là nhóm Gram âm.

-Sống hiếu khí hoặc yếm khí tùy tiện, thích hợp ở nhiệt độ 37°C và pH 7-8.

-Phát triển tốt ở môi trường phôi gà, có thể phát triển trên môi trường nhân tạo chứa hemoglobin, huyết thanh hay xistein.

Mycoplasma bị tiêu diệt ở nhiệt độ 45-55°C trong 15 phút. Chúng rất mẫn cảm với sự khô cạn, tia tử ngoại và những chất sát trùng nhưng lại không mẫn cảm với Sunfonamit và penicillin, kháng sinh ức chế *Mycoplasma* như Clotetracillin, Streptomycin và oxitetracillin.

Mycoplasma phân bố rộng trong tự nhiên, nhiều loại có thể gây bệnh cho người và gia súc. Gần đây còn thấy *Mycoplasma* gây bệnh cho cây trồng như *Spiroplasma citri* gây bệnh héo vàng ở cam, chanh. Các cá thể từ một khuẩn lạc có hình thái rất khác nhau.

Dạng L của vi khuẩn hình thành khi tế bào bị mất vách cố định bên ngoài do đột biến trong phòng thí nghiệm.

2.7.3. Rickettsia [5]

Rickettsia là nhóm vi sinh vật nhỏ bé (kích thước nhỏ hơn vi khuẩn, lớn hơn virus), có nhiều hình thái, sống ký sinh bắt buộc, được nhà khoa học Mỹ H.T. Rickettsia phát hiện thấy năm 1909 trong máu người mắc bệnh sốt phát ban.

Hình thái: hình que ngắn, hình cầu, hình que dài hay hình sợi, kích thước 0.3-5µm.

Cấu tạo: *Rickettsia* có thành tế bào, màng nguyên sinh chất, tế bào chất và thể trung tâm hình sợi (thể nhân). Thành phần hoá học của tế bào 30% protein, lipid trung tính, photpholipid và hydrat carbon, acid nucleic (ADN và ARN) và một số enzyme nên có thể thực hiện một số quá trình đường phân nhưng do không đủ men cần thiết để thực hiện quá trình sinh tổng hợp protein và đường phân nên *Rickettsia* phải ký sinh bắt buộc.

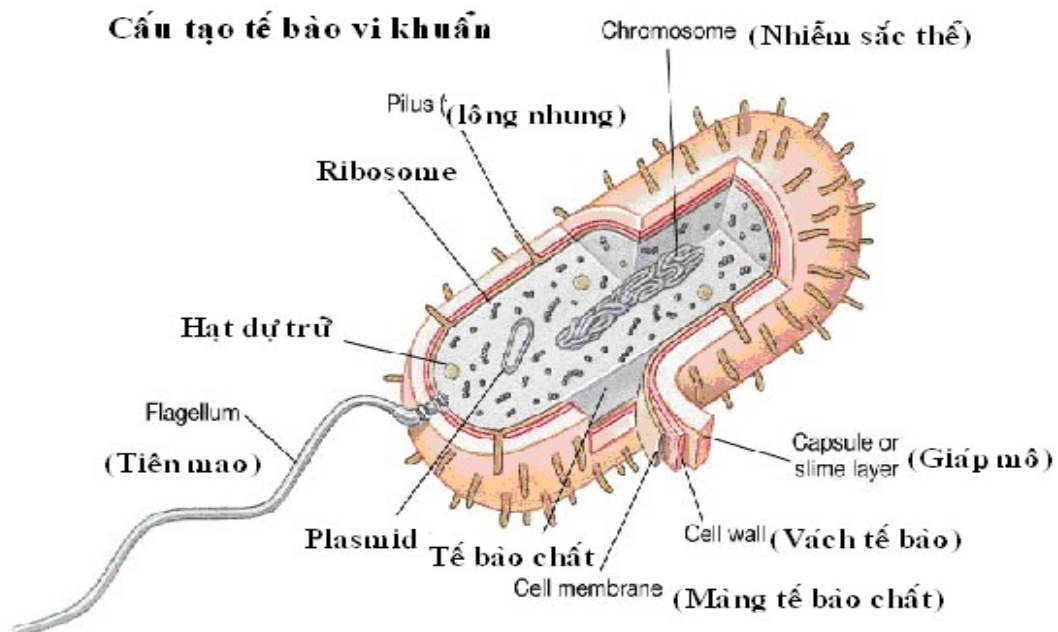
Một số đặc điểm cơ bản của *Rickettsia*

-Ký sinh tuyệt đối, phát triển tốt trên môi trường phôi gà, chuột lang, nhau thai, thỏ.

- Tế bào không di động.
- Khó bắt màu thuốc nhuộm, phải dùng phương pháp nhuộm đặc biệt như Giemsa,...*Rickettsia* bắt màu Gram âm.
- Sinh sản bằng phương pháp phân cắt giống như vi khuẩn
- Đề kháng yếu với nhiệt độ cao, 80°C chết sau 1 phút, miễn cảm với sự khô hạn và các chất sát trùng.
- Gây bệnh sốt phát ban *Rickettsia prowazekii* và sốt hồi quy *Coxiella burnetii*.

Trên đây là những hình dạng vi khuẩn thường gặp, ngoài ra trong tự nhiên còn gặp các hình dạng vi khuẩn như: hình khối vuông, khối tam giác, khối hình sao. Chi *Beggiatoa saprospira* có tế bào nối dài thành hình sợi. Chi *Caryophanon* có tế bào hình đĩa xếp chồng lên nhau như một xâu các đồng xu.

III. CẤU TẠO CỦA TẾ BÀO VI KHUẨN [4]



Cấu trúc của tế bào vi khuẩn khác với tế bào của vi sinh vật khác. Dựa vào cấu trúc có thể thấy được sự khác nhau giữa tế bào vi khuẩn và tế bào động thực vật theo bảng sau:

TT	Tế bào động vật và thực vật	Tế bào vi khuẩn
Nhân	Có màng nhân Nhiều nhuộm sắc thể hình que Có bộ máy phân bào	Không có màng Một nhuộm sắc thể hình tròn Không có phân bào
Nguyên sinh chất	Thường có lưới nội bào Có ty thể Đôi khi có lục lạp Chuyển động dòng nội bào Ribosom 80S gắn vào lưới nội chất. 70S gắn lưới nội chất	Không có lưới nội bào Không có ty thể có (Mesosom) Không có lục lạp Không chuyển động dòng nội bào 70 S trong bào quan
Các phân tử nhỏ	Không có glycopeptit màng	Có glycopeptit màng

3.1. Thành tế bào (Cell wall)

Thành tế bào còn gọi là vách tế bào, chiếm 10-40% trọng lượng khô của tế bào, độ dày thành tế bào vi khuẩn Gram âm là 10nm Gram dương là 14-18nm. Thành tế bào là lớp cấu trúc ngoài cùng, có độ rắn chắc nhất định để duy trì hình dạng tế bào, có khả năng bảo vệ tế bào đối với một số điều kiện bất lợi. Nồng độ đường muối bên trong tế bào thường cao hơn bên ngoài tế bào (áp suất thẩm thấu tương đương với dung dịch glucose 10-20%) do đó tế bào hấp thu khá nhiều nước từ bên ngoài vào. Nếu không có thành tế bào vững chắc thì tế bào sẽ bị phá vỡ. Khi thực hiện cơ nguyên sinh rồi quan sát dưới kính hiển vi, thấy rõ lớp thành tế bào. Quan sát dưới kính hiển vi điện tử thấy rõ hơn.

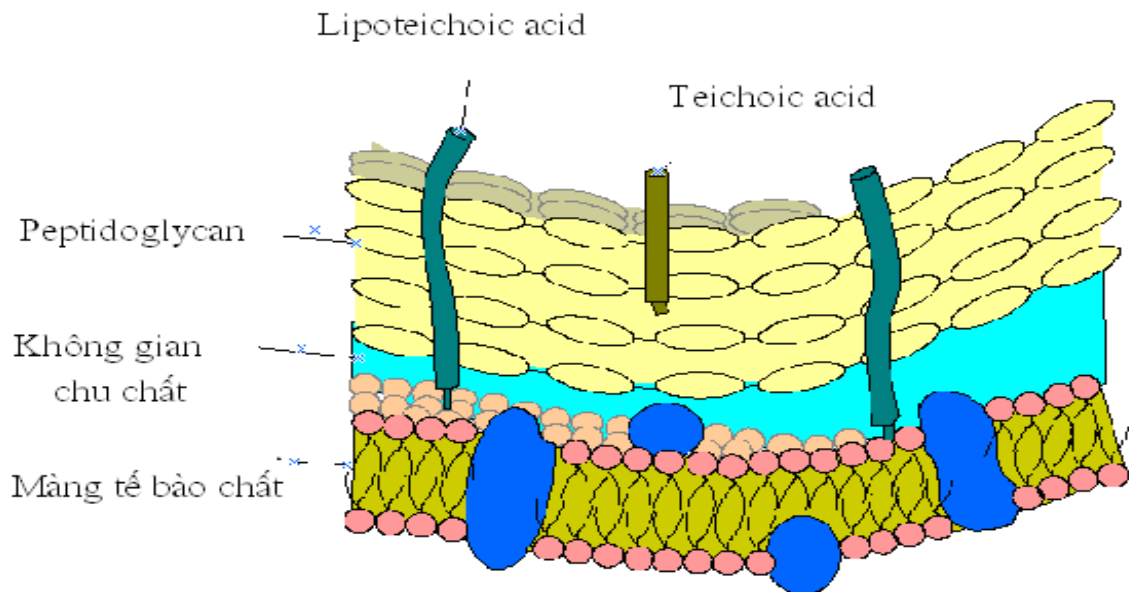
Thành tế bào vi khuẩn G^- và G^+ có sự sai khác về thành phần cấu tạo như sau:

Thành phần	Tỷ lệ % đối với khối lượng khô của thành tế bào vi khuẩn	
	G^+	G^-
Peptidoglycan	30-95	5-20
Acid teicoic	Cao	0
Lipid	Hầu như không	20
Protein	0 hoặc ít	Cao

Vi khuẩn Gram dương có thành phần cấu tạo cơ bản là peptidoglycan (PG) hoặc còn gọi là glucopetrit, murein,...chiếm 95 % trọng lượng khô của thành, tạo ra một màng polime

xốp, không hòa tan và rất bền vững, bao quanh tế bào thành mạng lưới. Cấu trúc của PG gồm 3 thành phần:

Cấu tạo màng tế bào vi khuẩn Gram dương

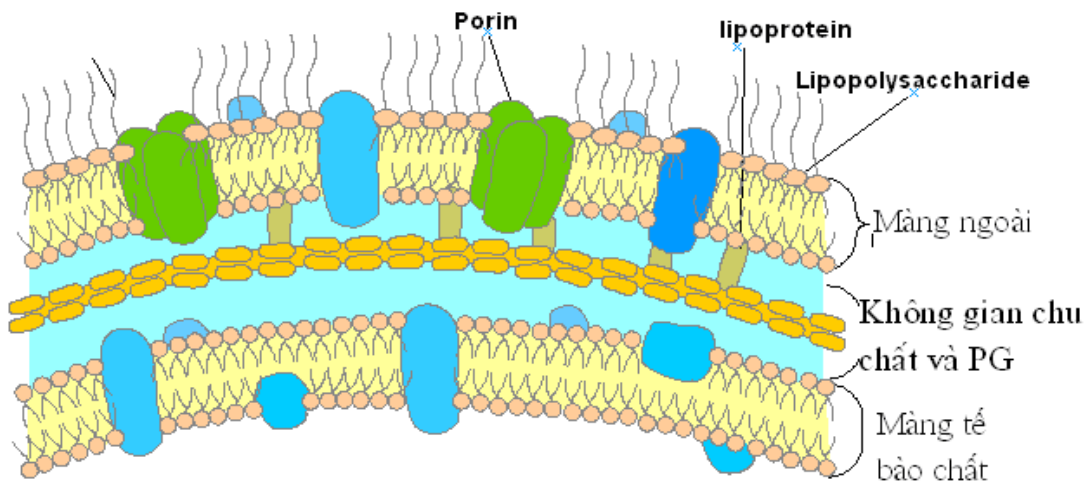


N. acetylglucosamin, N. acetylmuramic và galactozamin. Thành tế bào vi khuẩn Gram dương chứa PG dày đủ 4 lớp (chiếm >50% trọng lượng khô của thành). Ngoài ra còn thấy thành phần acid teichoic (là các polime của glycerol và ribitol photphat), gắn với PG hay màng tế bào.

Vi khuẩn Gram âm

Vách vi khuẩn Gram âm gồm một màng ngoài và một khoang chu chất chứa 1-2 lớp PG (chiếm 5-10%) trọng lượng khô vách, giữa lớp PG và màng ngoài có cầu nối lipoprotein. Ngoài ra ở màng ngoài còn có thành phần lipopolysaccharit (LPS) và các protein. LPS chiếm 1-50% trọng lượng khô của vách. Phần lipid của LPS là nội độc tố (gây sốt, tiêu chảy, phá hủy hồng cầu)

Cấu tạo hai lớp màng của vi khuẩn Gram âm



Trong những trường hợp sau đây có thể không quan sát thấy sự có mặt của thành tế bào:

Thể nguyên sinh (Protoplast): Sau khi dùng lysozyme để phá vỡ thành tế bào hoặc dùng penicillin ức chế sự tổng hợp thành tế bào có thể chỉ tạo ra những tế bào chỉ được bao bọc bởi màng tế bào chất. Thường gặp ở vi khuẩn G^+ .

Thể cầu (tế bào trần, sphaeroplast): là thể nguyên sinh chỉ còn sót lại một phần thành tế bào, thường chỉ gặp ở vi khuẩn G^- .

Vi khuẩn dạng L: Năm 1935 Viện nghiên cứu dự phòng Lister ở Anh phát hiện ra một dạng đột biến không có thành tế bào ở trực khuẩn *Streptobacillus moniliformis*. Tế bào của chúng phình to lên và rất mẫn cảm với áp suất thẩm thấu. Nhiều vi khuẩn G^- và G^+ đều có thể hình thành dạng L. Trước đây người ta hay nhầm lẫn thể nguyên sinh và thể cầu với dạng L. Hiện nay ta chỉ coi dạng L là chủng vi khuẩn không có thành tế bào được sinh ra do đột biến trong phòng thí nghiệm và có thể mang tính di truyền ổn định.

Mycoplasma: Một dạng vi khuẩn không có thành tế bào được sinh ra trong quá trình tiến hoá lâu dài của tự nhiên.

Thể nguyên sinh và thể cầu có đặc điểm chung là không có thành tế bào, tế bào trở nên có hình cầu, rất mẫn cảm với áp suất thẩm thấu, có thể có tiên mao, nhưng không di động được, không mẫn cảm với thực khuẩn thể, không phân bào được,...

Thành tế bào có các chức năng chủ yếu sau:

- Duy trì hình dạng của tế bào
- Duy trì áp suất thẩm thấu bên trong tế bào
- Hỗ trợ sự chuyển động của tiên mao
- Giúp tế bào đề kháng với các lực tác động bên ngoài
- Cần thiết cho quá trình phân cắt bình thường của tế bào
 - Điều tiết sự xâm nhập của một số chất, ngăn cản sự thất thoát các enzyme, sự xâm nhập của các chất hóa học hoặc enzyme từ bên ngoài gây hại tế bào, như muối mật, enzyme tiêu hóa, lysozim, chất kháng sinh.
- Có liên quan mật thiết đến tính kháng nguyên, của vi khuẩn gây bệnh, đặc biệt liên quan đến nội độc tố của vi khuẩn Gram âm.
- Có vai trò trong việc bắt màu thuốc nhuộm khi nhuộm Gram.

3.2. Màng tế bào chất [6]

Màng tế bào chất còn được gọi là màng tế bào hay màng chất (Cytoplasmic membrane), viết tắt là CM, dày khoảng 7-8 nm.

Có cấu tạo 3 lớp: hai lớp phân tử protein (chiếm hơn 50% trọng lượng khô của màng và 10-20% protein tế bào) và một lớp kép photpholipit (20-3% trọng lượng khô của màng) nằm ở giữa, 70-90% lipid của tế bào tập trung ở photpholipit của màng. Sự phân bố protein và photpholipit ở màng nguyên sinh chất khác nhau ở từng vùng. Sự phân bố đó tạo nên các lỗ hổng trên màng thuận lợi cho sự vận chuyển.

Protein của màng gồm có hai dạng: protein cấu trúc và enzyme.

Enzyme gồm có: permeaza vận chuyển các chất vào tế bào và các enzyme tổng hợp các chất murein, photpholipit, LPS,...

Hai lớp phosphor lipid (PL), chiếm khoảng 30-40% khối lượng và các protein nằm phía trong, phía ngoài hay xuyên qua màng chiếm 60-70% khối lượng. Mỗi phân tử PL chứa một đầu tích điện hay phân cực (đầu phosphate) và một đuôi không tích điện hay không phân cực (hydrat carbon). Đầu phosphate còn gọi là đầu háu nước, còn đầu hidratcarbon còn gọi là đầu kỵ nước. Hai lớp phân tử PL một lớp có gốc phosphat quay vào trong một lớp có gốc phosphat quay ra ngoài màng làm màng hóa lỏng và cho phép các protein di động tự do. Sự

hóa lỏng động học này cần thiết cho các chức năng của màng. Cách sắp xếp của PL như vậy gọi là mô hình khảm lỏng.

Hầu hết màng tế bào chất của vi khuẩn không chứa các sterol, như cholesterol, do đó không cứng như màng CM của các tế bào có nhân thật. *Mycoplasma* là nhóm vi khuẩn nhân thật không có thành tế bào. CM có chứa sterol do đó khá vững chắc.

CM là hàng rào đối với các phân tử tan trong nước và có tính chọn lọc hơn so với thành tế bào. Tuy vậy CM có chứa các protein đặc biệt gọi là permease, chúng có thể vận chuyển các phân tử nhỏ vào tế bào theo cơ chế thụ động không cần năng lượng hay chủ động, cần năng lượng.

CM ở tế bào vi khuẩn là vị trí làm nhiệm vụ hô hấp (tương tự như màng trong có dạng gấp khúc ở ty thể của các tế bào nhân thật). CM có chứa các protein của chuỗi hô hấp và các enzyme tổng hợp ATP. Các vi khuẩn lưu huỳnh màu tía còn chứa bộ máy quang hợp.

Ở CM ta gặp các enzyme tham gia tổng hợp lipid màng, PG, acid teicoic, LPS, và còn gặp các polysaccharit đơn giản.

CM còn chứa các vị trí gắn với nhiễm sắc thể và plasmid đóng vai trò quan trọng trong việc phân phối các yếu tố di truyền vào các tế bào con.

Ở nhiều vi khuẩn, nhất là vi khuẩn G⁺, CM xâm nhập vào tế bào chất và tạo thành các hệ thống ống gọi là Mesosom. Mesosom nằm gần CM hay đâm sâu vào trong tế bào chất.

Sự gấp khúc của CM vào bên trong chỉ gặp ở một số nhóm vi khuẩn quang hợp hay các vi khuẩn có hoạt tính hô hấp cao chẳng hạn như *Azotobacter*, vi khuẩn nitrate hoá. Do có gấp khúc mà diện tích CM tăng lên một cách đáng kể, thích ứng được hoạt động hô hấp quang hợp ở các nhóm vi khuẩn này.

Nhìn chung CM có các chức năng sau

- Duy trì áp suất thẩm thấu tế bào.
- Khống chế sự vận chuyển, trao đổi ra vào tế bào của các chất dinh dưỡng, các sản phẩm trao đổi chất.
- Duy trì một áp suất thẩm thấu bình thường bên trong tế bào.
- Là nơi sinh tổng hợp một số thành phần của tế bào như vách, giáp mô, do trong màng có chứa enzyme và ribosom.
- Là nơi tiến hành các quá trình photphoril oxy hoá và photphoril quang hợp.
- Là nơi tổng hợp nhiều loại enzyme.
- Cung cấp năng lượng cho hoạt động của tiên mao
- Có quan hệ đến sự phân chia tế bào.

3.3. Tế bào chất (Cytoplasm)

Tế bào chất toàn bộ phần nằm trong màng tế bào trừ nhân. Đây là vùng dịch thể dạng keo đồng nhất khi tế bào non và có cấu trúc lỏng lẻo khi tế bào già. Nguyên sinh chất có hai bộ phận chính:

Cơ chất tương bào: chủ yếu chứa các enzyme.

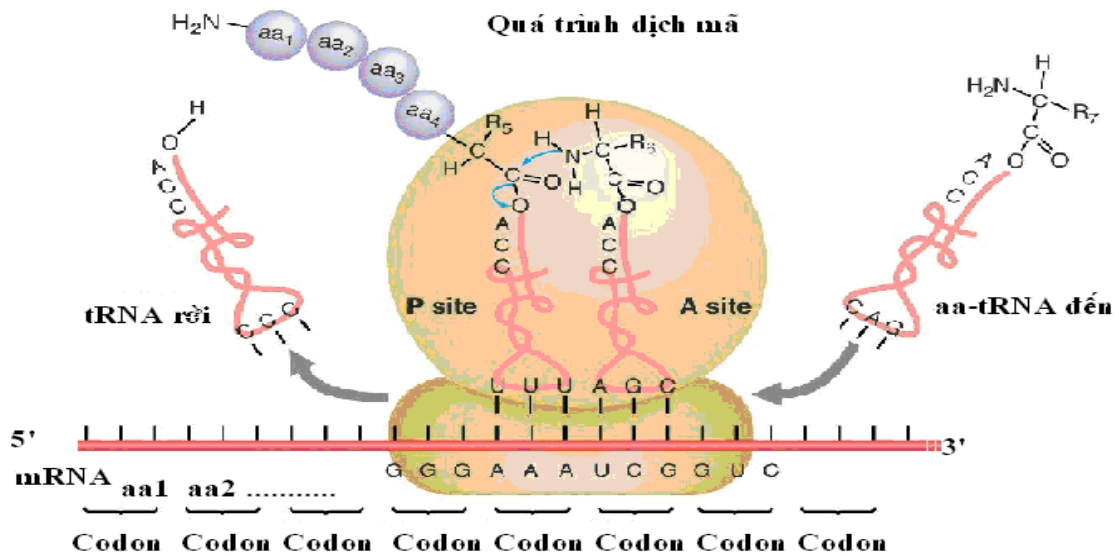
Các cơ quan con: mesosom, ribosom, không bào, hạt sắc tố, chất dự trữ.

3.3.1. Mesosom

Là thể hình cầu giống như cái bong bóng, mesosom có đường kính khoảng 250nm, gồm nhiều lớp bên chặt với nhau, nằm sát vách tế bào chỉ xuất hiện khi tế bào phân chia. Hình thành vách ngăn tế bào trong phân bào và là trung tâm hô hấp của tế bào vi khuẩn hiếu khí.

Trong mesosom có nhiều hệ thống men vận chuyển điện tử.

3.3.2. Ribosom



Ribosom có đường kính 15-20nm, hằng số lắng 70S (tiểu thể lớn 50S và tiểu thể nhỏ 30S). Ribosom chứa 40-60% ARN và 35-60% protein và một ít lipid, một số men như ribonucleaza,... và một ít chất khoáng. Mỗi tế bào chứa khoảng 10.000 ribosom chiếm 40% trọng lượng khô tế bào, khi đang phát triển mạnh có thể tăng đến 15.000 ribosom (*E. coli*).

Phần protein của ribosom làm thành một mạng lưới bao quanh phần ARN. Trong tế bào vi khuẩn phần lớn ribosom nằm tự do trong tế bào chất, phần ít bám trên màng nguyên sinh chất.

Ribosom là trung tâm tổng hợp protein của tế bào. Nhưng không phải mọi ribosom đều có khả năng tham gia vào quá trình này. Số ribosom tham gia vào quá trình này chiếm khoảng 5-10% và được liên kết với nhau gọi là polisom hay polyribosom. Sự liên kết này thực hiện được nhờ mRNA. Các ribosom tự do gắn vào một đầu của mRNA, được hoạt hóa và chuyển dịch dọc theo sợi mRNA này. Chuỗi polypeptid liên kết với ribosom được dài dần ra, do tuần tự được lắp thêm các acid amin mới. Khi đọc xong một sợi mRNA và giải phóng ra một chuỗi polypeptid mới thì ribosom lại tách khỏi đầu cuối của tập hợp, sau đó tham gia vào một mRNA khác.

3.3.3. Các hạt dự trữ

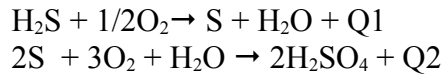
Trong nguyên sinh chất thấy xuất hiện các hạt có hình dạng, kích thước và thành phần hóa học khác nhau. Sự xuất hiện của các hạt này không thường xuyên, phụ thuộc vào điều kiện môi trường và giai đoạn phát triển của tế bào, đó là các hạt dự trữ hạt vùi không phải là các cơ quan con như ribosom, mesosom,... Chúng có hình dạng và kích thước khác nhau và sự có mặt của chúng không ổn định, phụ thuộc vào điều kiện ngoại cảnh. Nhiều loại hạt được vi sinh vật sử dụng như các chất dự trữ. Chúng thường được hình thành khi tế bào tổng hợp thừa các chất đó và được sử dụng khi thiếu thức ăn.

Các hạt hydrat carbon: các hạt này chứa tinh bột hoặc glycogen hoặc các chất tương tự nằm trong tế bào chất như những chất dự trữ. Khi thiếu thức ăn vi khuẩn sẽ lấy các hạt này làm nguồn năng lượng hoặc nguồn thức ăn carbon.

Hạt volutin: đây là các chất dị nhiễm sắc (bắt màu đỏ khi nhuộm xanh metylen trong khi tế bào chất bắt màu xanh). Trừ một số vi khuẩn (như *Corynebacterium*, *Mycobacterium*,...) thường xuyên chứa các hạt volutin ở giai đoạn sinh trưởng cuối, còn thông thường vi sinh vật chỉ chứa hạt volutin trong điều kiện dinh dưỡng bất thường (thiếu chất nào đó). Volutin là một phức chất, cấu tạo bởi polyphosphat, lipoprotein, ARN và Mg^{+2} . Trong số

các hạt volutin có thể có là giọt mỡ, xuất hiện nhiều khi nuôi cấy vi khuẩn trên môi trường chứa nhiều đường, glycerin hoặc các hợp chất carbon để đồng hóa khác.

Giọt lưu huỳnh: Một số vi khuẩn lưu huỳnh, có chứa thường xuyên các giọt lưu huỳnh trong tế bào, do kết quả oxy hóa H_2S sinh ra. Giọt lưu huỳnh được dùng làm nguồn năng lượng khi đã sử dụng hết H_2S của môi trường xung quanh.



Tinh thể diệt côn trùng: Trong một vài vi khuẩn có thể chứa thêm một tinh thể đặc biệt. Vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* hoặc *B. dendrolimus*,... Các tinh thể đặc biệt này có khả năng giết hại một số côn trùng phá hoại mùa màng. Hiện nay, người ta sử dụng các vi khuẩn này trong công tác bảo vệ thực vật để chống lại một số sâu trong nông nghiệp. Ví dụ sản phẩm BT tức là vi khuẩn *B. thuringiensis* có khả năng giết sâu tơ trên cải bắp.

Không bào khí: Các vi khuẩn quang hợp thủy sinh không có tiên mao, chứa các không bào khí trong tế bào chất. Chúng được bao bọc bởi một lớp màng protein dày khoảng 2 nm, không bào khí đóng vai trò điều tiết tỷ trọng để tế bào nổi lên những tầng nước thích hợp. Thường gặp ở các chi vi khuẩn như *Halobacterium*, *Penlodictyon*, *Rhodospseudomonas*, các chi vi khuẩn lam như: *Anabaena*.

3.4. Thể nhân (nuclear body)

Nhân là một cấu trúc ADN kép, xoắn lại khép kín thành hình cầu, hình que, hình quả tạ hay hình chữ V. Nhân tiếp xúc trực tiếp với nguyên sinh chất, liên kết với protein HU (tương tự histon) và gắn vào màng tế bào. Nhân phân chia đơn giản bằng cách thắt lại không có sự gián phân bởi vì nhân vi khuẩn là một nhiễm sắc thể duy nhất. Tế bào vi khuẩn ở thời kỳ ổn định chỉ có một nhân nhưng trong quá trình tiền phân bào thì có từ 2 - 4 nhân.

Thể nhân là nhân nguyên thủy chưa có màng nhân, đặc trưng cho các cơ thể thuộc giới Monera (hay Prokaryota). Thể nhân còn gọi là vùng nhân, thể giống nhân, khi nhuộm bằng thuốc thử Feulgen hoặc Schiff có thể quan sát thấy thể nhân có hình dạng bất định, bất màu tím. Thể nhân của vi khuẩn là một nhiễm sắc thể duy nhất cấu tạo bởi một sợi ADN xoắn kép, rất dài và cuộn lại thành hình vòng tròn. Nhân tế bào vi khuẩn không phân hóa thành khối rõ rệt còn gắn với màng tế bào chất. Như vậy, phần lớn các tế bào của các vi sinh vật có nhân nguyên thủy là tế bào đơn bội. NST của vi khuẩn có chiều dài thay đổi trong khoảng 0,25-3 μ m và chứa 6,6-13x10⁶ cặp base nitơ, số lượng hệ gen của vi khuẩn thay đổi tùy thuộc vào điều kiện nuôi cấy. Khi nuôi cấy tinh tế bào *E. coli* chứa 1-4 genom (bộ gen).

Trong NST vi khuẩn ngoài ADN còn có protein và ARN. Phần lớn protein để cấu tạo nên enzyme ARN-polymeraza. Phân tử ADN là những chuỗi xoắn kép, khép vòng dính với ARN ở giữa đầu mút của nhiều búi khác nhau.

Ngoài NST, nhiều vi khuẩn còn chứa ADN ngoài NST, đây cũng là những sợi ADN kép, dạng vòng kín, có khả năng sao chép độc lập gọi là plasmid.

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

Thuốc nhuộm Schiff (nhuộm ADN): Fucsin base 1g hòa vào 20ml nước cất sôi, lắc đun cho sôi trong 5 phút. Làm nguội 50⁰C lọc, cho thêm 20 ml HCl 1N và để nguội 20⁰C. Sau đó thêm 1g Metabisulfite Natri (hoặc Kali) cất vào chỗ tối. Sau 24 giờ cho vào 2g than hoạt tính, lắc đều, lọc cất chỗ tối 0-4⁰C. Trước khi dùng nên làm ấm, để nhiệt độ phòng. Thuốc nhuộm Schiff không màu hoặc vàng sáng. Để lâu thì đục, không dùng được.

3.5. Bao nhầy (capsula)

Một số loài vi khuẩn bên ngoài thành tế bào còn có chứa một lớp bao nhầy hay còn gọi là lớp giáp mô (vỏ nhầy). Đó là một lớp vật chất dạng keo, có độ dày bất định.

Vỏ nhầy có hai loại, vỏ nhầy lớn và vỏ nhầy nhỏ. Vỏ nhầy lớn có chiều dày lớn hơn 0,2 μm nên thấy được dưới kính hiển vi quang học. Còn vỏ nhầy nhỏ có chiều dày dưới 0,2 μm , chỉ quan sát được qua kính hiển vi điện tử.

Một số vi khuẩn không có vỏ nhầy nhưng được bao phủ bởi một lớp dịch nhầy không giới hạn xác định và không có cấu trúc rõ ràng. Ví dụ: Chi *Xanthomonas*.

Một số vi khuẩn vỏ là lớp chất nhầy liên kết yếu, lớp chất nhầy này có khi có kích thước rất lớn so với kích thước tế bào, ví dụ *Leucorostoc mesenteroides* trong hải sâm.

Một số khác lớp vỏ nhầy có liên kết vững chắc, dính sát vào vách tế bào, trong trường hợp này, vỏ nhầy được gọi là giáp mô, có kích thước mỏng (Microcapsula) hay dày (Macrocapsula). Trong điều kiện tự nhiên ở các tế bào ký sinh bắt buộc nhất thiết xuất hiện giáp mô trong cơ thể vật chủ. Giáp mô bảo vệ vi khuẩn khỏi các yếu tố chống vi khuẩn của cơ thể vật chủ. Khả năng bảo vệ vi khuẩn phụ thuộc chủ yếu vào thành phần hóa học chủ yếu của giáp mô và độ thấm thấu của nó.

Thành phần hóa học chủ yếu của vỏ là polyglycozit (chủ yếu ở cầu khuẩn) và polypeptit (chủ yếu ở *Bacillus*). Ở *Mycobacterium* màng ngoài cấu tạo từ lipid dạng sáp. Hơn nữa màng lipid này phủ tế bào từ ngoài ở *Mycobacterium ovis*, *M. tuberculosis*, *M. bovis* và như được thấm hút vào vách tế bào như *M. avium*

Công dụng của vỏ nhầy là để bảo vệ tế bào vi khuẩn và là nơi tích lũy chất dinh dưỡng của vi khuẩn. Ví dụ phế cầu khuẩn *Streptococcus pneumoniae* khi có vỏ nhầy sẽ không bị bạch cầu thực bào, còn nếu mất vỏ nhầy sẽ bị thực bào mau lẹ.

Nhuộm vỏ nhầy là phương pháp làm tiêu bản âm bằng cách trộn vi khuẩn với mực tàu.

Một số vi khuẩn, khi môi trường nuôi cấy cạn dần chất dinh dưỡng vi khuẩn tiêu thụ đến chất dinh dưỡng có trong vỏ nhầy, làm cho vỏ nhầy tiêu biến dần đi.

Phần lớn thành phần hóa học của vỏ nhầy là nước (98%) và polysaccarit.

Vi khuẩn có vỏ nhầy sẽ cho khuẩn lạc tròn ướt, láng trơn, còn vi khuẩn không có vỏ nhầy hoặc dịch nhầy sẽ tạo thành khuẩn lạc khô xù xì. Còn các lớp vi khuẩn có lớp dịch nhầy nhớt sẽ cho những khuẩn lạc nhầy nhớt.

3.6. Tiên mao (Flagella) và khuẩn mao (pilus hay fimbria)

Một số loại vi khuẩn có khả năng di động một cách chủ động nhờ những cơ quan đặc biệt gọi là tiên mao (flagella từ tiếng La Tinh có nghĩa là cái roi) hay còn gọi là tiên mao (tricha, trichos).

Vi khuẩn có thể có tiên mao hoặc không có tiên mao tùy từng chi. Tiên mao là những sợi nguyên sinh chất rất mảnh, rộng khoảng 0,01-0,05 μm , cấu tạo từ các sợi protein bện xoắn vào nhau. Các sợi protein này khác với protein màng và có tính kháng nguyên H. Trên bề mặt thành tế bào các sợi protein này liên kết với các protein khác của vách tế bào. Phần lõi của tiên mao gắn chặt với nền vách tế bào và màng nguyên sinh chất bởi một (ở vi khuẩn Gram dương) hoặc hai (ở vi khuẩn Gram âm) đôi vòng nhẫn. Nhờ vòng nhẫn này xoay, tiên mao quay quanh trục của nó và làm cho vi khuẩn di động. Nguồn năng lượng này nhờ ATP hoặc thế năng điện hóa học trong và ngoài màng. Nhiệm vụ chính của tiên mao là giúp cho vi khuẩn di động một cách chủ động.

Tùy theo số lượng của tiên mao người ta chia vi khuẩn thành các loại sau: - Không có tiên mao (vô mao khuẩn), không di động một cách chủ động được.

- Tiên mao mọc ở đỉnh: một tiên mao mọc ở một đỉnh (đơn mao khuẩn). Ví dụ: vi khuẩn *Xanthomonas campestris*.

- Có thể là một chùm tiên mao mọc ở đỉnh (chùm mao khuẩn). Ví dụ: *Pseudomonas solanacearum*.

- Mỗi đỉnh có một chùm tiên mao. Ví dụ: *Spirillum volutans*.

- Tiên mao mọc xung quanh (chu mao khuẩn): Ví dụ: *Escherichiae*,...

Cấu tạo của tiên mao

Nhờ kính hiển vi điện tử, chúng ta có thể quan sát được cấu tạo các tiên mao của vi khuẩn. Tiên mao xuất phát từ lớp ngoại nguyên sinh chất, phía bên trong màng nguyên sinh chất.

Gốc tiên mao có hai hạt: gốc có đường kính 40 nm, kế đó là các móc để tiên mao đính vào tế bào vi khuẩn, đường kính của móc lớn hơn đường kính của tiên mao. Quan sát một số tế bào vi khuẩn. Ví dụ: như xoắn thể (*Spirillum*), tiên mao do nhiều sợi nhỏ xoắn lại với nhau.

Muốn quan sát rõ tiên mao dưới kính hiển vi thông thường chúng ta phải nhuộm màu, bằng cách dùng alcaloid (tannin) để đắp lên tiên mao làm cho tiên mao to ra, có thể thấy được dưới kính hiển vi.

Tốc độ và kiểu di động của vi khuẩn không giống nhau tùy loài và tùy vị trí của tiên mao. Các loại vi khuẩn có tiên mao mọc ở một đầu có tốc độ di chuyển mạnh mẽ nhất (60 -120 μm /giây). Nhìn chung các loài vi khuẩn khác di chuyển chậm hơn khoảng 2 - 10 μm /giây. Vi khuẩn có tiên mao ở một đầu di chuyển theo một hướng rõ rệt, nhưng vi khuẩn tiên mao chu mao thì lại di chuyển theo một kiểu quay lung tung.

Sự có mặt hay không và số lượng, vị trí tiên mao là một yếu tố để định tên của vi khuẩn. Có nhiều vi khuẩn giống hệt nhau về hình thái nhưng khác nhau về khả năng di động hoặc về vị trí sắp xếp của tiên mao.

Tuy nhiên, điều kiện môi trường và thời gian nuôi cấy có thể ảnh hưởng rất nhiều đến khả năng di động của các loài vi khuẩn có tiên mao. Nhiệt độ cao quá hoặc thấp quá, pH môi trường, nồng độ muối, nồng độ đường, sự có mặt của chất độc, các sản phẩm trao đổi chất của bản thân vi khuẩn, tác động của năng lượng bức xạ,... không những ảnh hưởng đến tốc độ di chuyển mà còn làm đình chỉ hẳn sự di chuyển của vi khuẩn.

Đối với vi khuẩn không có tiên mao, trong môi trường lỏng chúng vẫn có thể chuyển động hỗn loạn do hiện tượng va chạm không ngừng của các phân tử vật chất trong chất lỏng (chuyển động Brown).

Ngoài tiên mao, một số vi khuẩn còn có sợi pili, đó là những sợi tiên mao rất ngắn và mảnh khoảng 0,3-1 μm , đường kính khoảng 0,01 μm và thường có khoảng 100-400 sợi trên một tế bào. Pili không phải là cơ quan di động mà là phương tiện giúp cho vi khuẩn bám được tốt trên bề mặt của cơ chất. Pili còn có thể tham gia vào quá trình dinh dưỡng của vi khuẩn, giúp cho bề mặt tế bào hấp thu chất dinh dưỡng lên rất nhiều lần.

Ngoài ra ở một số vi khuẩn có một số sợi pili (nhưng mao) sinh dục có nhiệm vụ tiếp nhận các đoạn ADN từ bên ngoài vào, trong trường hợp có trao đổi tín hiệu di truyền, nhất là trong lúc hai vi khuẩn tiếp hợp nhau. Nhưng mao còn là chỗ bám cho thực khuẩn thể. Số lượng nhưng mao thông thường có hàng trăm nhưng nhưng mao sinh dục thì chỉ có 1-5 mà thôi.

3.7. Nha bào và sự hình thành nha bào (spore)

Nha bào là một một kết cấu do sự biến đổi của tế bào sinh dưỡng trong một giai đoạn nào đó của quá trình sinh trưởng của vi khuẩn. Mỗi tế bào chỉ có thể tạo ra một nha bào. Thường gặp nha bào ở hai chi trực khuẩn Gram dương là *Bacillus* và *Clostridium*. Một số loài trong phẩy khuẩn (*Deessulft-vibrio desulfuricans*), cầu khuẩn (*Sarcina ureae*), xoắn khuẩn (*Spirillum volutans*) cũng có khả năng sinh nha bào.

Nha bào của *Bacillus* không vượt quá chiều ngang của tế bào vi khuẩn, do đó khi vi khuẩn mang nha bào vẫn không thay đổi hình dạng. Ví dụ: Trục khuẩn gây bệnh nhiệt thán *Bacillus anthracis*, trục khuẩn sinh chất kháng sinh *Bacillus subtilis*.

Nha bào *Clostridium* chiều ngang của nha bào thường lớn hơn chiều ngang của tế bào vi khuẩn, nên khi mang nha bào vi khuẩn bị biến đổi hình dạng như hình thoi, hình vọt, hình dùi trống. *Clostridium* là loại vi khuẩn kỵ khí bắt buộc.

Dưới kính hiển vi điện tử, nha bào có nhiều lớp màng bao bọc, lớp ngoài cùng gọi là lớp màng ngoài của nha bào. Kế đó là lớp vỏ của nha bào gồm nhiều lớp, có tác dụng ngăn chặn sự thẩm thấu của nước và các chất hòa tan trong nước. Dưới đó là lớp màng trong và trong cùng là lớp khối tế bào chất có cấu tạo đồng nhất.

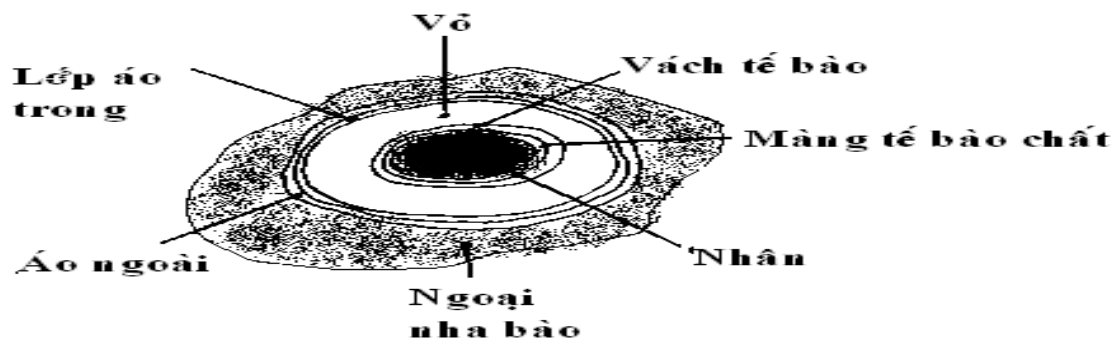
Nha bào không giữ nhiệm vụ sinh sản như ở các ngành vi sinh vật khác mà chỉ giữ chức năng lưu tồn mà thôi. Nha bào có khả năng lưu tồn tốt trong những điều kiện khó khăn của môi trường sống, nha bào có khả năng sống rất lâu. Người ta phát hiện có nha bào vi khuẩn trong xác sinh vật cổ đại (1000 năm) hoặc dưới đáy băng hà (3000 năm) hoặc trong quặng mỏ (250 triệu năm) đến nay vẫn còn sống.

Nhiệt độ 100°C, nha bào của một số loài của *Bacillus* có thể chịu được từ 2,5-20 giờ. Nha bào của vi khuẩn có thể chịu được 100°C trong 5 ngày liền.

Muốn tiêu diệt nha bào của vi khuẩn phải thanh trùng ở 121°C trong 15-30 phút với nhiệt độ ướt hoặc 165-170 °C trong 2 giờ với nhiệt độ khô.

Ngoài việc chịu được nhiệt độ khô cao, nha bào có thể chịu được khô hạn cũng như tác động của nhiều loại hóa chất, cũng như các loại tia sáng.

Trong HgCl₂ tế bào vi khuẩn chết ngay nhưng nha bào sống được đến hai giờ.



Cấu tạo nha bào (Spore)

Quá trình hình thành nha bào: Các tế bào sinh nha bào khi gặp điều kiện thiếu thức ăn, hoặc có tích lũy các sản phẩm trao đổi chất có hại sẽ bắt đầu thực hiện quá trình hình thành nha bào. Về mặt hình thái học, có thể chia quá trình hình thành nha bào ra làm các giai đoạn:

- Hình thành những búi chất nhiễm sắc.
- Tế bào bắt đầu phân cắt không đối xứng, tạo ra một vùng nhỏ gọi là tiền bào tử.
- Tiền bào tử hình thành hai lớp màng, tăng cao tính kháng bức xạ.
- Lớp vỏ sơ khai hình thành giữa hai lớp màng của bào tử sau khi đã tích lũy nhiều PG và tổng hợp ADP, tích lũy canci, tính chiết quang cao.
- Kết thúc việc hình thành áo nha bào.
- Kết thúc việc hình thành vỏ nha bào. Nha bào thành thực, bắt đầu có tính kháng nhiệt.
- Bào nang vỡ ra, bào tử thoát ra ngoài.

Nha bào được bao bọc bởi nhiều lớp màng. Ngoài cùng là màng ngoài. Dưới đó là lớp vỏ, vỏ bào tử gồm nhiều lớp, không thấm nước. Dưới lớp vỏ là lớp màng trong của bào tử. Trong cùng là khối tế bào chất có cấu tạo đồng nhất, thành phần hóa học của nha bào: nước chiếm 40% ở dạng liên kết, nhiều ion Ca^{+2} , acid dipicolinic (acid này chỉ có ở nha bào).

Nha bào vi khuẩn khi chín rất khó bắt màu. Nếu nhuộm bằng các phương pháp nhuộm thông thường ta không thấy rõ bào tử. Để quan sát được nha bào ta phải dùng phương pháp nhuộm màu đặc biệt. Trước tiên dùng acid để xử lý, sau đó mới nhuộm màu. Màu của nha bào khi đó rất khó tẩy. Dùng cồn hay acid để tẩy phần còn lại của tế bào rồi nhuộm bổ sung bằng thuốc nhuộm thứ hai.

Nha bào của vi khuẩn không chứa chức năng của cơ quan sinh sản như bào tử của sinh vật khác. Đây là hình thức sống tiềm sinh của vi khuẩn. Bào tử giúp cho vi khuẩn vượt qua những điều kiện bất lợi của ngoại cảnh. Bào tử thường được sinh ra trong điều kiện khó khăn như thiếu thức ăn, nhiệt độ và pH không thích hợp, môi trường tích lũy nhiều sản phẩm trao đổi chất có hại,... Tuy nhiên, vi khuẩn nhiệt thán, hình thành nha bào trong điều kiện có lợi nhất định: sự có mặt của oxy khí quyển, nhiệt độ thích hợp (vì vậy nấm mốc xác súc vật chết do bệnh nhiệt thán). Chính vì vậy người ta coi nha bào là hình thức tổ chức lại tế bào chất để nâng cao sức sống của vi khuẩn.

Một số nha bào đóng vai trò truyền bệnh (như than, uốn ván, hoại thư sinh hơi, ngộ độc thức ăn,...). Làm vô hoạt nha bào của một số vi khuẩn loại này là nguyên tắc để chế ra một số vaccin.

Sự nảy mầm của nha bào: Quá trình chuyển từ trạng thái nghỉ sang tế bào sinh dưỡng của vi khuẩn được gọi là quá trình nảy mầm của nha bào. Quá trình này gồm 3 giai đoạn: hoạt hóa, nảy mầm và sinh trưởng.

IV. PHÂN LOẠI VI KHUẨN [7]

Như tất cả các động vật, thực vật và vi sinh vật khác, vi khuẩn được sắp xếp vào trong những hệ thống phân loại xác định. Sự sắp xếp này hết sức cần thiết. Khi biết vị trí của một vi khuẩn nào đó mới tìm được ở trong một bảng phân loại xác định nào đó chúng ta sẽ biết được vi khuẩn đó có những tính chất sinh vật học xác định nào đó. Đồng thời nhờ hệ thống phân loại, chúng ta xác định được mối liên hệ giữa các vi khuẩn trong quá trình tiến hóa.

Để phân loại vi khuẩn người ta dựa vào hai nguyên tắc: theo genotype và theo phenotype.

4.1. Phân loại học hệ thống vi khuẩn (*Bacterial systematics*)

Phân loại học hệ thống gồm 4 nội dung:

- Mô tả (Description)
- Xếp lớp (Classification)
- Đặt tên (Nomenclature)
- Đồng định (Identification)

Mô tả: trình bày tất cả đặc điểm các mẫu thu thập được, chọn chủng quy chuẩn đại diện cho một đơn vị phân loại (taxon). Có hai bước mô tả: mô tả kiểu hình và mô tả kiểu gen.

+Mô tả kiểu hình (phenotypic)

Mô tả hình thái: trình bày tất cả các đặc tính hình thái, kích thước, bắt màu thuốc nhuộm Gram, hình thành tiên mao roi (tiên mao), nha bào, giáp mô,...

Đặc tính sinh hóa: lên men đường và các loại chất liệu khác nhau, năng lực sử dụng môi trường khác nhau.

Đề kháng với các chất khác nhau (kháng sinh, thuốc nhuộm,...)

Phân tích kiểu dạng thành phần protein tế bào.

Phân tích kiểu dạng thành phần lipid màng tế bào.

+**Mô tả kiểu gen (genotypic description)**

Thành phần các bazo amin (tức là tỷ lệ:) của ADN nhiễm sắc thể.

Mô tả kiểu dạng phân cắt ADN nhiễm sắc thể bằng các enzyme hạn chế (Chromosomal ADN restriction pattern)

Mô tả trình tự sắp xếp nucleotid của một gen nào đó có tính chức năng cao:

+Thông thường gen ARN 16S ribosom

+Gen tham gia vận chuyển điện tử,...

4.2. Xếp lớp (classification)

Các cá thể có đặc tính gần gũi nhau được xếp thành nhóm

Các nhóm có đặc tính gần gũi nhau được xếp thành nhóm lớn hơn

Đơn vị cơ bản trong phân loại học là loài (*Species*)

Trên loài có chi (tên loài và chi được in nghiêng, ngoài ra, tên họ (family) cũng được in nghiêng ở một số nước).

Đơn vị cơ bản trong phân loại là loài (*Species, Bug*), các đơn vị trên loài gồm có:

- Chi (trước đây gọi là giống) (gennus)

- Tộc: thường có tên tận cùng là *-eae*

- Họ: thường có tên tận cùng là *-aceae*

- Bộ phụ: thường có tên tận cùng bằng *-ales*

Các đơn vị dưới loài gồm có Thứ, Dạng, Nòi.

-Thứ (Variety) dùng để chỉ một nhóm nhất định trong một loài nào đó. Ví dụ: *Mycobacterium tuberculosis var. hominis* (lao người)

Mycobacterium tuberculosis var. bovis (lao bò)

Mycobacterium tuberculosis var. avium (lao gia cầm).

-Dạng: (Fosma, type) chỉ một nhóm nhỏ hơn thứ, căn cứ vào đặc tính phản ứng huyết thanh học. Dạng được ký hiệu bằng chữ số La Mã (I, II,...)

-Nòi hay chủng (Strain): là thuật ngữ riêng để chỉ một loài vi sinh vật mới phân lập thuần khiết từ một cơ chất nào đó, ở một nơi nhất định nào đó.

4.3. Đặt tên (Nomenclature)

Có hai hình thức đặt tên đó là tên tạm thời và tên khoa học

4.3.1. Tên tạm thời

Đây là tên bất kỳ do nhà nghiên cứu có thể quy định để tiện bảo quản, mô tả,...

Tên này thường chỉ chủng thu thập được của riêng nhà nghiên cứu hay PTN. Nó cũng có thể trở thành tên được công nhận quốc tế nếu quy định bởi một PTN tàng cứu (reference lab), như ATCC (Mỹ),...

4.3.2. Tên khoa học

Tên khoa học được đặt bởi nhà nghiên cứu tùy ý nhưng tuân thủ những nguyên tắc của Hội Vi sinh vật học:

Tên phải ở dạng Latin hoặc Latin hóa

Tên loài gồm hai thành phần: tên chi (trước đây gọi là giống) và từ xác định loài.

Hai thành phần trên phải được in nghiêng hay gạch chân để phân biệt là tên khoa học. Sau tên viết thường có thể được viết thêm tên các nhà khoa học đã phân lập và năm phân lập.

Tên khoa học của một vi khuẩn chỉ được công nhận sau khi được đăng trên tạp chí "Intern. J. of Systematic and Evolutionary Microbiology" hoặc đăng trên một tạp chí chuyên môn rồi đăng ký trên tạp chí trên. Thời điểm công nhận tên khoa học mới, là thời điểm đăng trên tạp chí nêu trên.

Tên khoa học chỉ được chấp nhận chính thức nếu chủng quy chuẩn (type strain) đã được lưu trữ tại một trong những phòng thí nghiệm tàng trữ (Reference lab) được hội Vi sinh vật quốc tế công nhận, nhằm: lưu giữ và có sẵn đối tượng cho các nhà nghiên cứu khác kiểm chứng.

Khái niệm "phân loại học (Taxonomy)"

Ba nội dung trên (mô tả, xếp lớp, đặt tên) được gọi là phân loại học (Taxonomy)

Một bậc phân loại được gọi là một đơn vị phân loại (taxon).

Loài (species) là taxon cơ bản trong các hệ thống phân loại.

Taxonomy được thực hiện bởi các PTN quy mô lớn.

4.4. Đồng định (Identification)

Đồng định được thực hiện ở các phòng thí nghiệm có quy mô bất kỳ. Đồng định hay còn gọi là chẩn đoán phòng thí nghiệm (Laboratory diagnosis). Thực chất đây là mô tả đối tượng ta đang có, để *quy thuộc* vào nhóm các đối tượng đã **được mô tả, xếp lớp và đặt tên trong quá khứ** và đã biết là có liên quan đến bệnh hay hiện tượng nào đó (lên men,...)

Quá trình quy thuộc được vào nhóm càng nhỏ càng tốt (loài, type huyết thanh học, type phage, type sinh học,...)

Giới thiệu tóm tắt hệ thống phân loại vi khuẩn.

Phân loại vi khuẩn (Phạm Hồng Sơn, 2002)[7]

Trực khuẩn Gram âm yếm khí tùy tiện

Họ	Chi (giống)	Loài	Loài phụ (subsp)
<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>E. coli</i> , <i>E. fergusonii</i> , <i>E. hermannii</i> , <i>E. vulneris</i>	
	<i>Salmonella</i>	<i>S. choleraesuis</i> (Typhimurium, Dublin, Paratyphi A, Abortusequi, Abortusovis, Choleraesuis, Typhi, Sendai, Gallinarum, Pullorum),...	Ariz onae, diarizonae, salamae, houtenae, indica,
	<i>Shigella</i>	<i>S. dysenteriae</i> , <i>S. flexneri</i> , <i>S. boydii</i> , <i>S. sonnei</i>	
	<i>Edwardsiella</i>	<i>E. tarda</i> 1, <i>E. tarda</i> 2, <i>E. hoshinae</i> , <i>E. ictaluri</i>	
	<i>Yersinia</i>	<i>Y. pestis</i> , <i>Y. pseudotuberculosis</i> , <i>Y. intermedia</i> , <i>Y. frederiksenii</i> , <i>Y. kristensenii</i> , <i>Y. ruckeri</i>	<i>Y. enterocolica</i> biovar 1, 2, 3, 4, 5
	<i>Klebsiella</i>	<i>K. pneumoniae</i> , <i>K. oxytoca</i> , <i>K. terrigena</i> , <i>K. planticola</i>	<i>p pneumoniae</i> , <i>Ozaenae</i> , <i>thinoscleromatis</i>
	<i>Enterobacter</i>	<i>E. cloacae</i> , <i>E. aerogenes</i> , <i>E. gergoviae</i> , <i>E. sakazakii</i>	
	<i>Proteus</i>	<i>P. vulgaris</i> , <i>P. mirabilis</i> , <i>P. penneri</i> , <i>P. alcalifaciens</i> , <i>P. stuartii</i> , <i>P. rettgeri</i> ,	
	<i>Citrobacter</i>	<i>C. freundii</i> , <i>C. diversus</i> , <i>C. amalonaticus</i>	
	<i>Hafnia</i>	<i>Hafnia</i>	
	<i>Serratia</i>	<i>S. marcescens</i> , <i>S. liquifaciens</i> , <i>S. plymuthica</i> , <i>S. adorifera</i>	
<i>Providencia</i>			

Trực khuẩn Gram âm hiếu khí	<i>Pseudomonadaceae</i>	<i>Pseudomonas</i> <i>Burkholderia</i> , Ba chi khác	<i>P. aeruginosa</i> , <i>P. fluorescens</i> , <i>P. putida</i> , <i>P. anguilliseptica</i> , <i>B.(P). mallei</i> , <i>B.(P). pseudomallei</i> , 86 loài khác
		<i>Bordetella</i>	<i>B. pertussis</i> , <i>B. parapertussis</i> , <i>B. bronchiseptica</i> , <i>B. avium</i>
		<i>Brucella</i>	<i>B. melitensis</i> , <i>B. suis</i> , <i>B. abortus</i> , <i>B. cannis</i> , <i>B. ovis</i> , <i>B. neotomae</i>
		<i>Fraserisella</i>	<i>F. tularensis</i> (biovar <i>Tularensis</i> , biovar <i>Palacearctica</i>) <i>F. novicida</i> .
		<i>Taylorella</i>	<i>T. equigenitalis</i>
		<i>Riemerella</i>	<i>Riemerella anatisestifer</i> , <i>Chryseobacterium</i>
		<i>Ornithobacterium</i>	<i>Ornithobacterium rhinotrachae</i> , <i>Chryseobacterium</i>
Cầu khuẩn và cầu trực khuẩn G âm hiếu khí	<i>Neisseriaceae</i>	<i>Neisseria</i>	<i>N. meningitidis</i> , <i>N. gonorrhoeae</i>
		<i>Moraxella</i>	<i>M. bovis</i> , 5 L
		<i>Branhamella</i>	<i>B. ovis</i>
		<i>Acinetobacter</i>	<i>Acinetobacter</i>
		<i>Kingella</i>	3 L

Cầu trực khuẩn khuẩn G âm yếm khí	<i>Bacteroidaceae</i>	<i>Bacteroides</i>	44 L	
		<i>Fusobacterium</i>	10 L	
	<i>Veillonellaceae</i>	<i>Veillonella</i>	7 L (cư trú khoang miệng)	
Xoắn thể G âm hiếu khí hoặc vi hiếu khí		<i>Campylobacter</i>	<i>C. jejuni, C. coli, C. lari, C. hyointestinalis, C. sputorum, subtorum, C. suptorum, subsp bubulus, C. mucosalis, C. mucosalis, C. concisus,</i>	<i>C. fetus</i> subsp. <i>fetus, C. fetus</i> subsp. <i>venereales</i>
		<i>Helicobacter</i>	<i>Helicobacter pylori</i>	
		<i>Spirillum</i>		
Xoắn khuẩn	<i>Spirochaetaceae</i>	<i>Treponema</i>	<i>T. paraluisuniculi</i>	
		<i>Serpulina</i>		
		<i>Borrelia</i>	<i>B. anserina, B. theileri, B. burgdorferi</i>	
		<i>Spirochaeta</i>		
		<i>Cristispira</i>		
	<i>Leptospiraceae</i>	<i>Leptospira</i>	<i>L. interrogans, SG*Hebdomadis, Autunalis, L. interrogans SG* Autunalis, Canicola, Hebdo, adis, Icterohaemorrhagiae, Pomona. L. interrogans SG*Canicola, Icterohaemorrhagiae.</i> (SG*=serogroup, nhóm huyết thanh)	

Cầu khuẩn G dương	Micrococaceae	<i>Staphylococcus</i>	<i>S. aureus</i> , <i>S. epidermidis</i> , <i>S. felis</i> , <i>S. hyicus</i> , <i>S. intermedius</i> , 24 loài	
		<i>Micrococcus</i>	9 loài	
		<i>Graffkya</i>	<i>G. tetragena</i>	
		<i>Sarcina</i>	<i>S. lutea</i>	
	Cầu khuẩn G dương ngoài họ Micrococaceae	<i>Streptococcus</i>	<i>S. pyogenes</i> (A), <i>S. agalactiae</i> (B), <i>S. sui</i> (D), <i>S. dysgalactiae</i> , <i>S. zooepidermicus</i> (C, L), <i>S. porcinus</i> (C), <i>S. cannis</i> (G), <i>S. bovis</i> (D,E,N), <i>S. mutans</i> (một số E), <i>S. uberis</i> , <i>S. pneumoniae</i> (type huyết thanh)	<i>S. equi</i> subsp. <i>zooepidemicus</i> , <i>S. equi</i> subsp. <i>zooepidemicus</i> ; và 31 loài khác
		<i>Enterococcus</i>	<i>E. faecalis</i> 16 loài khác	
		<i>Lactococcus</i>	<i>L. lactis</i> , 6 loài khác	
		<i>Peptococcus</i>	<i>P. indolicus</i> , 9 loài khác	
		<i>Melissococcus</i>	<i>M. pluton</i>	
	Trực khuẩn G dương sinh nha bào	<i>Bacillus</i>	<i>B. anthracis</i> , <i>B. cereus</i> , <i>B. thuringiensis</i> , <i>B. megaterium</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>B. larvae</i>	
<i>Clostridium</i>		<i>C. chauvoei</i> , <i>C. septicum</i> , <i>C. pefringens</i> , <i>C. novyi</i> typA, <i>C. novyi</i> typ B, <i>C. novyi</i> typ C, <i>C. haemolyticum</i> , <i>C. sodeli</i> , <i>C. sporogens</i> , (các type sinh độc tố <i>C. botulinum</i> ABF, <i>C. botulinum</i> BEF, <i>C. botulinum</i> CD, <i>C. botulinum</i> G), <i>C. difficile</i> , <i>C. colinum</i> , <i>C. tetani</i>		

Trực khuẩn G dương không sinh nha bào	<i>Listeria</i>	<i>L. monocytogenes,</i>	
	<i>Erysipelothrix</i>	<i>E. rhusiopathiae, E. tonsillarum</i> <i>Erysipelothrix,</i> <i>Renibacterium, Lactobacillus</i>	
	<i>Renibacillus</i>	<i>R. salmoninarum</i>	
	<i>Lactobacillus</i>	40 loài	
Liên xạ khuẩn gây bệnh (trực khuẩn có xu hướng sinh nhánh)	<i>Corynebacterium</i>	<i>C. renale, C. pilosum, C. cystitidis,</i> <i>pseudotuberculosis,</i> <i>kutscheri, C. diphtheriae</i>	
	<i>Mycobacterium</i>	<i>M. tuberculosis, M. bovis, B. microti, M. kansasii, M. marinum, M. scrofulaceum, M. goldonae, M. avium sp, M. intracellulare, M. ulcerance, M. xenopi, M. gastri, M. phlei, M. fortuitum, M. smegmatis, M. avium sp paratuberculosis, M. lepraemurium, M. leprae</i>	
	<i>Actinomyces</i>	<i>A. bovis, A. israelii, A. pyogenes</i>	
		<i>Dermatophilus,</i> <i>Rhodococcus, Nocardia</i>	

Liên xạ khuẩn không gây bệnh	<i>Propionibacterium</i> , <i>Bifidobacterium</i> , <i>Streptomyces</i>		
Các <i>Mycoplasma</i>	<i>Mycoplasmataceae</i>	<i>M. bovis</i> , <i>M. bovis genitalium</i> , <i>M. canadense</i> , <i>M. dispar</i> , <i>M. diversum</i> , <i>M. agalactiae</i> , <i>M. capricolum</i> , <i>M. conjunctivae</i> , <i>M. ovipneumoniae</i> , <i>M. hyopneumoniae</i> , <i>M. hyosynoviae</i> , <i>M. hyorhinitis</i> , <i>M. flocculare</i> , <i>M. gallisepticum</i> , <i>M. synoviae</i> , <i>M. meleagridis</i> , <i>M. lowae</i> , <i>M. lipofaciens</i> , <i>M. glycyphilum</i> , <i>M. pulmonis</i> , <i>M. arthritidis</i> , <i>M. neurolyticum</i> , <i>M. cynos</i> , <i>M. canis</i> , <i>M. felis</i> , <i>M. pneumoniae</i> , <i>M. hominis</i> , <i>M. urealyticum</i> , <i>M.</i>	<i>M. mycoides</i> subsp. <i>mycoides</i> , <i>M. mycoides</i> subsp. <i>capri</i>
	<i>Acholeplasmataceae</i>	<i>A. laidlawii</i> , <i>A. axanthum</i> .	
	<i>Spiroplasmataceae</i>		
Bộ Rickettsiales	<i>Rickettsiaceae</i>	<i>Rickettsia</i> , <i>Rochalimaea</i> , <i>Coxiella</i> , <i>Ehrlichia</i> , <i>Cowdria</i> , <i>Wolbachia</i> , <i>Rickettsiella</i> ,	
	<i>Bartonellaceae</i>	<i>Bartonella</i> , <i>Grahamella</i> ,	
	<i>Anaplasmataceae</i>	<i>Anaplasma</i> , <i>Aegyptianella</i> , <i>Haemobartonella</i> , <i>Eperythrozoon</i>	

Chlamydiales	<i>Chlamydiales</i>	<i>C. trachomatis, C. pneumoniae, C. psittaci, C. pecorum</i>
---------------------	---------------------	---

-Câu hỏi ôn tập:

1. Trình bày phương pháp làm tiêu bản (soi tươi, nhuộm màu) soi kính hiển vi.
2. Kể tên một số loại môi trường nuôi cấy vi sinh vật và tác dụng của chúng.
3. Các dạng hình thái chính của vi khuẩn.
4. Cấu trúc cơ bản của tế bào vi khuẩn.

-Tài liệu tham khảo:

1. Nguyễn Lâm Dũng, Nguyễn Đình Quyến, Phạm Văn Ty (2000). Nhà xuất bản giáo dục Hà Nội.
2. Vũ Thị Minh Đức (2001). Thực tập vi sinh vật học. Nhà xuất bản Đại Học Quốc Gia Hà
3. Biền Văn Minh, Phạm Văn Ty, Kiều Hữu ảnh, Phạm Hồng Sơn, Phạm Ngọc Lan, Nguyễn Thị Thu Thủy (2006). Giáo trình vi sinh vật học. Nhà xuất bản Đại học Huế.
4. Hoàng Thủy Nguyên, Đặng Đức Trạch, Ninh Đức Dự, Nguyễn Hồng Diệt, Nguyễn Thị Kê, Nguyễn Thị Oanh (1974). Vi sinh y học tập I. Nhà xuất bản Y học Hà Nội.
5. Nguyễn Vĩnh Phước(1976). Vi sinh vật học Thú y tập III. Nhà xuất bản đại học và trung học chuyên nghiệp Hà Nội.
6. Nguyễn Khắc Tuấn(1999). Vi sinh vật học, nhà xuất bản nông nghiệp Hà Nội.
7. Phạm Hồng Sơn (2002). Giáo trình vi sinh vật thú y. Nhà xuất bản Nông nghiệp Hà Nội.

-Giải thích thuật ngữ:

1. Nucleus: nhân
2. Genom: bộ gen
3. Gram: Christian Gram nhà khoa học người Đan Mạch phát hiện ra phương pháp nhuộm màu tế bào vi khuẩn. Thông qua nhuộm Gram vi khuẩn được phân làm hai nhóm: Gram dương (bắt **màu tím** khi được nhuộm màu kép tím sinh thể và fuschin) Gram âm (không bắt màu tím nhưng bắt màu đỏ hồng khi nhuộm kép tím sinh thể và fuschin)
4. *Mycoplasma*: là nhóm vi khuẩn có kích thước nhỏ nhất, đặc biệt không có vách tế bào. Chúng sống ký sinh ở động vật và côn trùng.

CHƯƠNG III- SINH LÝ HỌC VI KHUẨN (10 tiết)

-Giảng viên: BSTY. Nguyễn Xuân Hòa – PGS.TS. Phạm Hồng Sơn

-Tóm tắt: Chương này thời lượng 10 tiết giảng với 32 trang lý thuyết xen kẽ hình ảnh minh họa. Nội dung chính của chương là nghiên cứu thành phần hóa học của tế bào vi khuẩn, các chất dinh dưỡng cần thiết cho tế bào vi khuẩn sinh trưởng và phát triển. Hiểu biết về chất dinh dưỡng chúng ta mới có thể thúc đẩy sự phát triển của những vi khuẩn có lợi đồng thời tìm cách ức chế sự phát triển của các vi sinh vật có hại. Tìm hiểu quá trình vận chuyển các chất vào ra tế bào vi khuẩn và giới thiệu các phương pháp xác định số lượng vi khuẩn.

- Mục tiêu: Sinh viên cần nắm được thành phần hóa học của tế bào vi khuẩn, một số quá trình lên men, các phản ứng sinh hóa xảy ra trong tế bào, phương thức vận chuyển chất dinh dưỡng và các phương pháp định lượng chính.

I. DINH DƯỠNG Ở VI KHUẨN [1]

1.1. Thành phần hóa học tế bào vi khuẩn

Chất dinh dưỡng đối với vi sinh vật, là bất kỳ chất nào được vi sinh vật hấp thụ từ môi trường xung quanh và được chúng sử dụng làm nguyên liệu cho quá trình sinh tổng hợp và tạo ra các thành phần của tế bào hoặc để cung cấp cho các quá trình trao đổi năng lượng.

Quá trình hấp thụ các chất dinh dưỡng để thỏa mãn mọi nhu cầu sinh trưởng và phát triển được gọi là quá trình dinh dưỡng.

Hiểu biết về quá trình dinh dưỡng là cơ sở tất yếu để có thể nghiên cứu, ứng dụng hoặc ức chế vi sinh vật.

Không phải mọi thành phần của môi trường nuôi cấy vi sinh vật đều được xem là chất dinh dưỡng. Một số chất rất cần thiết cho vi sinh vật nhưng chỉ làm nhiệm vụ bảo đảm các điều kiện về thế oxi hóa khử, pH, áp suất thẩm thấu, cân bằng ion,... Chất dinh dưỡng phải là các chất có tham gia vào các quá trình trao đổi chất nội bào.

Thành phần hóa học của tế bào vi sinh vật quyết định nhu cầu dinh dưỡng của chúng.

Thành phần hóa học của tế bào vi sinh vật gồm có nước (nước tự do và nước liên kết) và vật chất khô (muối khoáng và hợp chất hữu cơ). Lượng chứa của các nguyên tố trong vi sinh vật khác nhau là không giống nhau. Các điều kiện nuôi cấy vi sinh vật khác nhau, các giai đoạn khác nhau, lượng chứa các nguyên tố trong cùng một loài vi sinh vật cũng không giống nhau.

1.1.1. Nước

Nước là thành phần không thể thiếu được đối với cơ thể sống. Nước chiếm khoảng 70-90% khối lượng cơ thể vi sinh vật. Tất cả các phản ứng xảy ra trong tế bào vi sinh vật đều đòi hỏi có sự tồn tại của nước. Trong vi khuẩn lượng chứa nước thường là 70-85%, nấm sợi 85-90%.

Từ thời cổ xưa người ta đã biết sấy khô các loại thực phẩm để đình chỉ sự phát triển của vi sinh vật. Việc dùng muối hoặc đường để bảo quản thực phẩm chẳng qua cũng tạo ra sự khô cạn về sinh lý không thích hợp cho sự phát triển của vi sinh vật.

Nước trong tế bào thường tồn tại ở hai trạng thái khác nhau: nước tự do và nước liên kết. Nước tự do là nước không tham gia vào cấu trúc các hợp chất hóa học của tế bào nên nó dễ bay hơi khi sấy khô. Nước liên kết là nước tham gia vào cấu tạo các hợp chất hữu cơ trong tế bào, nước liên kết khó tách ra khi sấy.

Yêu cầu của vi sinh vật đối với nước được biểu thị một cách định lượng bằng độ hoạt động của nước trong môi trường ký hiệu a_w . Độ hoạt động của nước hay độ hoạt động của thủy phân môi trường được xác định: $a_w =$

Ở đây P là áp lực hơi nước của dung dịch, còn P_0 là áp lực hơi của nước nguyên chất, dung dịch có nồng độ càng cao thì P càng nhỏ. Nước nguyên chất có $a_w=1$, nước biển có $a_w=0,98$, máu người $a_w=0,995$, cá muối có $a_w=0,75$.

Mỗi vi sinh vật thường có một a_w tối thích và một a_w tối thiểu, một số vi sinh vật có thể phát triển được trong môi trường có áp suất thẩm thấu cao người ta gọi chúng là các vi sinh vật chịu áp lực cao. Chẳng hạn a_w có thể chấp nhận được của *Saccharococcus rouxii* là 0,85, *Halococcus* là 0,75. Khả năng chịu khô hạn của nấm cao hơn so với các vi sinh vật khác.

Phần nước có thể tham gia vào các quá trình trao đổi chất của vi sinh vật được gọi là nước tự do. Phần lớn nước trong vi sinh vật tồn tại dưới dạng nước tự do. Nước kết hợp là nước liên kết với các hợp chất hữu cơ cao phân tử trong tế bào (L, P, hydrate carbon,...), nước liên kết mất khả năng hòa tan và lưu động.

1.1.2. Vật chất khô

- Muối khoáng

Muối khoáng là phần còn lại khi đốt cháy hoàn toàn chất hữu cơ chúng chiếm khoảng 2-5 % khối lượng khô của tế bào. Chúng thường tồn tại dưới dạng các muối sulphate, phosphate, carbonate, clorua,... trong tế bào chúng thường ở dạng các ion. Dạng cation như : Mg^{2+} , Ca^{2+} , K^+ , Na^+ ,... Dạng anion như HPO_4^- , SO_4^{2-} , Cl^- ,... Các ion trong tế bào vi sinh vật luôn tồn tại ở những tỷ lệ nhất định nhằm duy trì pH và áp suất thẩm thấu cho từng loài vi sinh vật.

Thành phần hoá học của một tế bào vi khuẩn

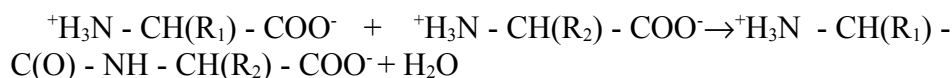
Phân tử	% khối lượng khô
Protein	55
Polysaccharide	5
Lipid	9,1
ADN	3,1
ARN	20,5
Tổng các đơn phân tử	3,5
Acid amine và tiền thể	0,5
Đường và tiền thể	2
Nucleotit và tiền thể	0,5
Các ion vô cơ	1

-Chất hữu cơ

Chất hữu cơ trong tế bào vi sinh vật chủ yếu cấu tạo từ các nguyên tố C, H, O, N, P, S,... Riêng 4 nguyên tố C, H, O, N chiếm tới 90-97% toàn bộ chất khô của tế bào. Đó là các nguyên tố chủ chốt cấu tạo nên protein, nucleic acid, lipid, hydrate carbon. Trong tế bào vi khuẩn các hợp chất đại phân tử thường chiếm tới 96% khối lượng khô, các chất đơn phân tử chiếm 3,5%, còn các ion vô cơ chỉ có 1%.

+Protein: Cấu tạo chủ yếu từ các nguyên tố: C, O, N, H, S ngoài ra còn có thể có một lượng rất nhỏ các nguyên tố khác nhau như P, Fe, Zn, Mn, Ca,...

Đơn phân cấu tạo nên các protein là các acid amine. Các acid amine trong phân tử protein được liên kết với nhau bằng liên kết peptide (liên kết cộng hoá trị -CO-NH-). Liên kết này được tạo thành do phản ứng kết hợp giữa nhóm carboxil (COO⁻) của acid amine này và nhóm amine (NH⁺₃) của một acid amine khác và loại đi một phân tử nước.



Tùy theo số lượng các acid amine liên kết với nhau mà ta có dipeptide, tripeptide, tetrapeptide,... phân tử có 15 liên kết peptide trở lên được gọi là polypeptide, protein được hình thành từ một vài chuỗi polypeptide.

Có 20 loại acid amine tham gia vào cấu trúc của protein, số acid amine rất lớn nên có thể tạo ra được nhiều loại protein khác nhau. Các protein có thể được xếp loại theo hình dạng, theo cấu trúc hoặc theo chức năng:

+Xếp loại theo hình dạng: Protein hình sợi, Protein hình cầu.

+ Xếp loại theo cấu trúc: Protein đơn giản, protein phức tạp (protein kết hợp)

Nucleoprotein (Protein + acid nucleic)

Glycoprotein (Protein +hydrate carbon)

Lipoprotein (Protein +lipid)

Mucoprotein (Protein + mucopolysaccharide)

Phosphorprotein (Protein + acidphosphoric)

+Xếp loại theo chức năng:

Protein phi hoạt tính (kiến tạo, dự trữ,...)

Protein hoạt tính (xúc tác, vận tải, chuyển động, truyền xung thần kinh, bảo vệ,...)

Trong tế bào vi sinh vật ngoài những acid amine tham gia cấu trúc protein còn có những acid amine ở trạng thái tự do.

+Acid nucleic: Cấu tạo chủ yếu bởi các nguyên tố, C, H, O, N, P, căn cứ vào phân tử đường pentose trong phân tử mà acid nucleic chia làm hai loại: ADN (acid deoxiribonucleic, chứa deoxiribose) và ARN (acid ribonucleic, chứa ribose).

Các sản phẩm thủy phân của 2 loại acid nucleic này như sau:

+ARN → Polynucleotit → Nucleotit (acid phosphoric, nucleozit (D-Ribose, bazơ nitơ))

Bazơ nitơ (Adenin-A, Guanin-G, Uraxin-U, Cytozin-C)

+ADN → Polynucleotit → Nucleotit (Ax. phosphoric, nucleozit)

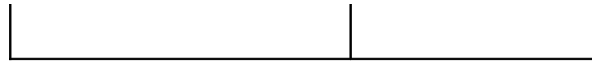
Nucleozit: (D-2-Deoxibose, bazơ nitơ)

Bazơ nitơ (Adenin-A, Guanin-G, Thymin-T, Cytozin-C)

Tỷ lệ G + C ở các vi sinh vật khác nhau là có thể không giống nhau. Đây là một chỉ tiêu quan trọng trong phân loại hiện nay.

Ví dụ:

Chi	G+C mol %
<i>Clostridium</i>	26-34
<i>Proteus</i>	38-42
<i>Staphylococcus</i>	30-40



+**Lipid:** gồm có hai loại, lipid phân cực và lipid trung tính

Lipid phân cực: nó ở trạng thái hoạt động, tham gia vào cấu trúc màng (lypoprotein, phosphorlipid, glycolipid)

Lipid trung tính nó ở dạng dự trữ (các hạt lipid dự trữ trong tế bào chất)

Mesosom là nơi chuyển hóa phosphor lipid từ dạng trung tính dự trữ sang dạng hoạt động, nó như mạng lưới nội chất ở vi sinh vật. Tế bào phát triển thì màng tế bào rộng ra khi đó lipid từ dạng dự trữ nó chuyển sang dạng hoạt động để tham gia cấu trúc.

+**Glucide:** (gluxit)

Tế bào vi khuẩn thường chứa một lượng glucide, khoảng 12-18 % trọng lượng chất khô. Các glucide thường gặp gồm các dạng đường đơn (ose), đường kép (osie) đường đa. Các loại đường đa thường gặp ở vi sinh vật là: glucan (glucarl), dextran (dextrane), amylose, chitin, cellulose ,...

Glucide tham gia cấu tạo acid nucleic, vào cấu trúc của thành tế bào, vỏ nhầy,... của vi sinh vật. Vỏ nhầy và việc hình thành vỏ nhầy liên quan đến độ lực và quá trình bảo vệ vi khuẩn. Một số polysaccharide có thể phối hợp với protein để hình thành gluco-protein. Gluco-protein là kháng nguyên của cơ thể vi sinh vật, polysaccharide đóng vai trò bán kháng nguyên. Một số polysaccharide vi sinh vật cũng có khả năng kích thích cơ thể sản sinh kháng thể.

Glucide còn là nguồn dự trữ năng lượng và là sản phẩm trung gian của các quá trình trao đổi năng lượng trong tế bào vi sinh vật.

+**Vitamine:** đây là nhóm chất hữu cơ vi sinh vật cần nhưng không tự tổng hợp được và chỉ cần với lượng rất ít.

Nhu cầu về vitamine của các loại vi khuẩn khác nhau không giống nhau. Có những loại vi sinh vật tự dưỡng chất sinh trưởng, chúng có thể tự tổng hợp được các vitamine cần thiết. Nhưng cũng có những loại vi sinh vật dị dưỡng chất sinh trưởng, chúng đòi hỏi phải được cung cấp ít hay nhiều các loại vitamine khác nhau. vitamine có vai trò rất quan trọng trong quá trình phát triển của vi sinh vật. Với lượng rất nhỏ vitamine sẽ giúp cho vi sinh vật phát triển bình thường. vitamine có thể xem là những chất xúc tác sinh học và phần lớn các vitamine là nguyên liệu để cấu tạo men. Nhiều vitamine có vai trò quan trọng trong các quá trình chuyển hóa vật chất (như trong chu trình Crebs, trong các quá trình quang hợp,...). Trong tự nhiên có một số vi sinh vật muốn phát triển bình thường phải cần cung cấp một hoặc nhiều loại vitamine khác nhau. Có một số nòi có mức độ phát triển tỷ lệ thuận với nồng độ của những vitamine nhất định trong môi trường. Người ta sử dụng chúng để kiểm tra và định lượng các vitamine này.

Vitamine	Dạng coenzyme	Chức năng
B ₁ (Tiamine)	Tiamine pirophosphate (TPP)	Oxi hoá và khử carboxil các ketoacid, chuyển nhóm aldehyd
B ₂ (Riboflavin)	Flavinmononucleotit (FMN), flavin adenin dinucleotit (FAD)	Chuyển hydro

B ₃ (Acid pantotenic)	Coenzyme A	Oxi hoá ketoacid và tham gia vào trao đổi chất của acid béo
B ₅ (Niacin)	Nicotin adenin dinucleotit (NAD) và NADP	Khử và chuyển hydro
B ₆ (Pyridoxin)	Pyridoxin phosphate	Chuyển amine, khử amine
B ₇ (Biotin)	Biotin	Chuyển CO ₂ và nhóm cacboxylic
D ₂ Vitamine	1,25-dihydroxicole - canxiferol	Trao đổi canxi và photpho

Dưới đây là lượng chứa vitamine trong một vài loại vi sinh vật (µg trọng lượng khô)

Vitamine	<i>Enterobacter acrogenes</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Clostridium butyricum</i>	<i>Torulopin utilis</i>
Acid nicotinic	249	210	250	500
Riboflavin	44	67	55	49
Thiamine	11	26	9	6.2
Piridoxin	7	6	6	-
Acid pantotenic	140	91	93	130
Acid folic	14	9	3	2.8
Biotin	4	7	-	1.8

+Enzyme: Như những sinh vật khác ở vi sinh vật luôn luôn xảy ra quá trình trao đổi vật chất. Nói cách khác, quá trình sống, quá trình sinh trưởng và phát triển của vi sinh vật bao gồm rất nhiều phản ứng của các quá trình phân giải và tổng hợp. Các phản ứng này tiến hành được trong điều kiện bình thường là do trong cơ thể của vi sinh vật có nhiều loại men. Men có nguồn gốc protein hay nói cách khác nó có bản chất protein.

Dựa vào bản chất hóa học có thể chia men ra làm hai loại

-Men đơn giản: tương ứng với lớp protein đơn giản, gồm những loại có thành phần thuần túy là acid amine và tính xúc tác sinh học của chúng được quy định bởi cấu trúc phân tử của protein.

- Men phức tạp: ngoài thành phần được gọi là protein (apoenzyme hay apofecment) còn có phần không phải protein (gọi là nhóm thêm hay coenzyme hay cofecment) như vitamine hay khoáng.

Men phải có phân tử lượng lớn mới có quá trình chuyển hóa cấu hình không gian từ đó mới có thể xúc tác phản ứng hóa học. Mỗi men đều có trung tâm hoạt động. Trung tâm hoạt động là nơi cơ chất tham gia phản ứng gắn kết vào dưới tác động của men.

Dựa vào vị trí tác dụng của men đối với cơ thể vi sinh vật người ta chia men làm hai loại

Men nội bào và men ngoại bào. Men nội bào (endoenzyme) ở trong tế bào vi khuẩn và phát huy tác dụng xúc tác chuyển hóa trong tế bào. Men ngoại bào (exoenzyme) phát huy tác dụng ở cả trong và ngoài cơ thể vi sinh vật.

Trong cơ thể vi khuẩn chúng có hàng trăm loại men và chúng hoạt động rất nhịp nhàng. Kết quả hoạt động của chúng giúp cho hoạt động sống của sinh vật diễn ra bình thường. Ngược lại vì một lý do nào đó men không hoạt động xúc tác bình thường thì cơ thể sẽ bị ảnh hưởng, quá trình sống của vi sinh vật sẽ bị trì trệ hoặc đảo lộn, vi khuẩn có thể bị tê liệt hay bị chết.

+ **Sắc tố:** Khuẩn lạc của nhiều vi sinh vật có màu sắc rõ rệt. Màu sắc có khi chỉ xuất hiện trong khuẩn lạc, có khi hòa tan vào trong nước và khuếch tán ra môi trường xung quanh. Việc tạo thành các màu sắc này là một trong những đặc điểm thường được sử dụng khi phân loại vi sinh vật (nhất là nấm mốc và xạ khuẩn). Ngoài sắc tố quang hợp (được sinh ra từ các vi sinh vật dinh dưỡng quang năng) còn có nhiều sắc tố khác. Sắc tố của vi sinh vật thuộc nhiều nhóm các hợp chất rất khác nhau: carotenoit, phenazim, piaron, araquinon, antoxiamine,...

Khi có mặt của sắc tố carotenoit khuẩn lạc có màu đỏ da cam (*Sarcina*, *Micrococcus*, *Mycobacterium*, *Corynebacterium*,...). Các sắc tố carotenoit phân bố trong màng nguyên sinh chất của tế bào. Loại sắc tố này giúp cho vi khuẩn tránh khỏi ảnh hưởng có hại của ánh sáng mặt trời và ánh sáng tử ngoại. Các sắc tố này cùng với bacteriochlorophyll có hoạt tính quang hợp.

Sắc tố puncherimin được tạo thành trong nấm men *Candida puncherima*. Sắc tố này nếu trên môi trường có chứa Fe nó sẽ tạo nên màu đỏ tối.

Sắc tố prodigiosin làm cho khuẩn lạc *Serratia marcescens* (*Bacterium prodigiosum*) có màu đỏ sáng.

Sắc tố indigoidin ở *Pseudomonas indigofera* và nhiều vi khuẩn khác làm cho vi khuẩn có màu lam.

Vi khuẩn mũ xanh *Pseudomonas aeruginosa* tạo thành sắc tố piocianin và một số sắc tố khác.

Một số sắc tố có tính chất kháng sinh. Chính vì vậy nhiều vi sinh vật có màu sắc có khả năng sinh ra chất kháng sinh.

II. CÁC KIỂU DINH DƯỠNG Ở VI KHUẨN [2]

Khi nuôi cấy vi sinh vật người ta phải pha chế môi trường có thể ở dạng lỏng hoặc đặc. Trong môi trường có thể có loại chất hữu cơ có loại là chất vô cơ vô cơ. Không phải mọi thành phần của môi trường đều có thể gọi là chất dinh dưỡng. Một số thành phần của môi trường chỉ có nhiệm vụ đảm bảo các điều kiện thích hợp về thế oxi hóa, về pH, áp suất thẩm thấu, cân bằng ion,... Chất dinh dưỡng phải là những chất có tham gia vào trao đổi chất của tế bào. Quá trình hấp thu các chất dinh dưỡng từ môi trường xung quanh vào cơ thể sinh vật được gọi là quá trình dinh dưỡng.

2.1. Nhu cầu về thức ăn của vi sinh vật

Các chất dinh dưỡng sau khi vào tế bào sẽ được chế biến lại để tạo thành các chất riêng của cơ thể. quá trình này được gọi là quá trình đồng hóa, quá trình này cần năng lượng. Ngược lại với quá trình đồng hóa là quá trình dị hóa. Các sản phẩm của quá trình dị hóa sẽ được thải ra môi trường xung quanh hoặc một phần được sử dụng lại cho quá trình đồng hóa.

Căn cứ vào nhu cầu của vi sinh vật người ta chia thức ăn làm ba loại:

-Thức ăn năng lượng: thức ăn sau khi hấp thụ sẽ cung cấp cho vi sinh vật một số năng lượng cần thiết cho hoạt động sống của tế bào. Các loại protein, glucid, lipid,...là những thức ăn năng lượng thường gặp.

-Thức ăn kiến tạo: thức ăn loại này sau khi hấp thụ sẽ tham gia xây dựng các cấu trúc của vi sinh vật. Trong thực tế thì một loại thức ăn nó vừa là nguồn năng lượng vừa là nguyên liệu để xây dựng các cấu trúc.

-Chất sinh trưởng: là những chất cần thiết cho hoạt động sống của một loại vi sinh vật nào đó mà nó không tự tổng hợp được.

Căn cứ vào, nguồn các bon, nguồn năng lượng, chất nhận điện tử cuối cùng, người ta phân chia vi sinh vật thành các kiểu dinh dưỡng sau.

Căn cứ vào nguồn carbon: người ta chia vi sinh vật ra làm hai nhóm, dị dưỡng carbon và tự dưỡng carbon.

+ Dị dưỡng carbon: vi sinh vật dị dưỡng carbon là loại vi sinh vật sử dụng nguồn carbon trong tự nhiên từ các hợp chất hữu cơ. Từ hợp chất hữu cơ này ngoài nguồn carbon vi sinh vật còn thu được nguồn năng lượng cần thiết cho hoạt động sống của mình. Số năng lượng trong quá trình chuyển hóa và hấp thụ sẽ khác nhau tùy loại vi sinh vật.

+Tự dưỡng carbon: là nhóm vi sinh vật sử dụng nguồn các bon từ các chất vô cơ như CO_2 hoặc các muối carbonate. Quá trình này cần năng lượng, vi sinh vật có thể sử dụng hai nguồn năng lượng như: 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.

Căn cứ vào nguồn năng lượng: chia vi sinh vật thành dinh dưỡng quang năng và dinh dưỡng hóa năng.

+Dinh dưỡng quang năng: là những vi sinh vật nhờ có sắc tố quang hợp mà có khả năng hấp thụ năng lượng từ ánh sáng mặt trời và chuyển hóa thành năng lượng hóa học (tích lũy dưới dạng ATP)

+Dinh dưỡng hóa năng: là những vi sinh vật sử dụng năng lượng chứa trong các hợp chất hóa học.

Căn cứ vào nguồn carbon và nguồn năng lượng: người ta chia vi khuẩn thành các kiểu dinh dưỡng sau:

a- Tự dưỡng:

-Tự dưỡng quang năng: Nguồn C là CO_2 , nguồn năng lượng là ánh sáng.

-Tự dưỡng hoá năng: Nguồn C là CO_2 , nguồn năng lượng là một số hợp chất vô cơ đơn giản.

b- Dị dưỡng:

Vi khuẩn đòi hỏi một phần hoặc toàn bộ nguồn dinh dưỡng phải là chất hữu cơ có sẵn: hydrate carbon (đường, tinh bột, cellulose ...). Còn nguồn N là các acid amine, yếu tố phát triển hoặc sinh trưởng là các vitamine, hoặc các chất chuyển hóa.

-Dị dưỡng quang năng: Nguồn C là chất hữu cơ, nguồn năng lượng là ánh sáng. Ví dụ: ở vi khuẩn không lưu huỳnh màu tía.

-Dị dưỡng hoá năng: Nguồn C là chất hữu cơ, nguồn năng lượng là từ sự chuyển hoá trao đổi chất của chất nguyên sinh của một cơ thể khác.

-Dị dưỡng hoại sinh: Nguồn C là chất hữu cơ, nguồn năng lượng là từ sự trao đổi chất của chất nguyên sinh các xác hữu cơ.

-Dị dưỡng kí sinh: Nguồn C là chất hữu cơ, nguồn năng lượng là lấy từ các tổ chức hoặc dịch thể của một cơ thể sống. Ví dụ vi sinh vật gây bệnh cho con người, thực vật, động vật. Loại này chỉ phát triển được trên cơ thể sống.

Như vậy là tùy từng nhóm vi sinh vật mà nguồn carbon được cung cấp có thể là chất hữu cơ hoặc chất vô cơ. Giá trị dinh dưỡng và khả năng hấp thụ các nguồn thức ăn carbon khác nhau phụ thuộc vào hai yếu tố: một là thành phần hoá học và tính chất sinh lý của nguồn thức ăn này, hai là đặc điểm sinh lý của từng loại vi sinh vật. Trên trái đất này không có một hợp chất hữu cơ nào mà không bị vi sinh vật này hay vi sinh vật khác phân giải, hay nói cách khác không có hợp chất hữu cơ nào bền vững tuyệt đối với vi sinh vật. Có những loại vi sinh vật có thể đồng hoá được các hợp chất rất bền như cao su, chất dẻo, dầu mỡ, parafin, khí thiên nhiên. Ngay focmon là chất diệt khuẩn cực mạnh nhưng có nhóm nấm sợi sử dụng chúng làm thức ăn.

Nhiều chất hữu cơ vì không tan được trong nước hoặc vì có khối lượng phân tử quá lớn cho nên trước khi hấp thụ vi sinh vật phải tiết ra enzyme thủy phân (amylase, cellulose, proteinase,...) để chuyển chúng thành các hợp chất dễ hấp thụ (đường, acid amine, acid béo,...).

Người ta thường sử dụng đường để làm thức ăn carbon cho vi sinh vật dị dưỡng. Chú ý rằng đường đơn khi ở nhiệt độ cao có thể chuyển hoá thành những hợp chất có màu tối gọi là đường cháy, khó hấp thụ. Trong môi trường kiềm, sau khi khử trùng đường còn dễ bị acid hoá làm thay đổi pH môi trường. Để tránh hiện tượng này khi hấp khử trùng môi trường đường người ta thường hấp ở áp lực 0,5atm (112,5°C) và duy trì trong 30 phút. Với các loại đường đơn, tốt nhất là nên sử dụng phương pháp hấp gián đoạn, hoặc dùng các nệm lọc hay màng lọc vi khuẩn.

Khi chế tạo môi trường chứa tinh bột, trước hết phải hồ hoá tinh bột ở 60-70°C, sau đó đun sôi rồi mới đưa đi hấp cao áp.

cellulose được đưa vào các môi trường nuôi cấy vi sinh vật phân giải cellulose dưới dạng giấy lọc, bông hoặc các bột cellulose.

Khi sử dụng lipid, parafin, dầu mỡ,... để làm nguồn carbon nuôi cấy một số loại vi sinh vật, phải thông khí mạnh để cho từng giọt nhỏ có thể tiếp xúc được với thành tế bào vi sinh vật.

Nồng độ đường để nuôi cấy các loại vi sinh vật khác nhau là không giống nhau, với vi khuẩn, xạ khuẩn thì dùng 0,05-0,2 % đường còn với nấm men thì dùng 3-10% đường.

Hầu hết vi sinh vật chỉ đồng hoá được đường ở dạng đồng phân D, và phần lớn đồng phân của đường đơn trong tự nhiên là dạng D chứ không phải dạng L.

Các hợp chất hữu cơ chứa cả C và N cũng có thể sử dụng làm vừa làm nguồn C vừa làm nguồn N cho vi sinh vật (pepton, nước thịt, nước chiết nấm men, nước chiết giá đậu, nước chiết ngô,...).

Phạm vi đồng hoá các nguồn thức ăn carbon của từng loài vi sinh vật cụ thể rất khác nhau. Có thực nghiệm cho thấy vi khuẩn *Pseudomonas cepacia* có thể đồng hoá trên 90% loại nguồn thức ăn carbon, trong khi đó các loại vi khuẩn sinh metan chỉ có thể đồng hoá được CO₂ và vài hợp chất chứa 1 hoặc hai carbon mà thôi.

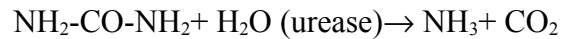
Với các vi sinh vật dị dưỡng nguồn thức ăn carbon làm cả hai chức năng: nguồn dinh dưỡng và nguồn năng lượng.

Một số vi khuẩn dị dưỡng, nhất là các vi khuẩn gây bệnh, sống trong máu, trong các tổ chức hoặc trong ruột người và động vật muốn sinh trưởng được, ngoài carbon hữu cơ cần phải được cung cấp một lượng nhỏ CO₂ thì mới phát triển được.

Trong công nghiệp lên men, nguồn ri đường là nguồn carbon rẻ tiền và rất thích hợp sử dụng đối với nhiều loại vi sinh vật khác nhau.

2.2. Nguồn thức ăn nitơ của vi khuẩn

Nitơ có ý nghĩa rất quan trọng đối với sự phát triển của vi sinh vật, nguồn Nitơ dễ hấp thụ nhất đối với vi sinh vật là NH_3 và NH_4^+ , chúng xâm nhập vào tế bào dễ dàng và ở đó tạo nên các nhóm amine. Trước đây có một số quan điểm cho rằng, một số vi khuẩn không sử dụng muối amon để đồng hoá được. Quan điểm này không đúng, ngày nay người ta cho rằng tất cả các loại vi sinh vật đều có khả năng sử dụng muối amon. Urea là nguồn thức ăn nitơ trung tính về mặt sinh lý, khi bị phân giải bởi enzyme urease nó sẽ giải phóng thành NH_3 và CO_2 . NH_3 được vi sinh vật sử dụng mà không làm chua môi trường như các muối amon.



Nhiều khi để nuôi cấy vi sinh vật bằng nguồn nitơ từ urê, người ta phải bổ sung thêm muối amon là vì phải có thức ăn nitơ dễ hấp thụ cho vi sinh vật phát triển đã khi đó mới có men urease để thủy phân urea.

Nguồn nitơ có trữ lượng nhiều nhất trong tự nhiên đó là nguồn khí nitơ tự do (N_2) trong khí quyển. Chúng chiếm tỷ lệ cao trong không khí (75,5% về khối lượng hoặc 78,16% theo thể tích). Số lượng nitơ trong khí quyển trên mỗi ha đất là 85000 tấn, trên trái đất có khoảng 4×10^{15} tấn. Trong phân tử khí nitơ hai nguyên tử N liên kết với nhau bằng ba liên kết rất bền vững vì vậy nó khó tách ra để liên kết với các chất khác và nitơ tuy có nhiều chung quanh ta mà cả người, động vật lẫn cây trồng đều thiếu thức ăn nitơ.

Đa số vi sinh vật không có khả năng đồng hoá N_2 trong không khí, tuy nhiên có những vi sinh vật có thể chuyển hoá N_2 thành NH_3 nhờ hoạt động xúc tác của một hệ thống enzyme có tên gọi là nitrogenase. Người ta gọi các vi sinh vật này là vi sinh vật cố định nitơ còn quá trình này được gọi là quá trình cố định nitơ (vi khuẩn cố định ở nốt sần cây họ đậu).

Nguồn nitơ hữu cơ thường được sử dụng để nuôi cấy vi sinh vật là pepton loại chế phẩm thủy phân không triệt để của một loại protein nào đó.

Về acid amine

Người ta nhận thấy có thể có 3 mối quan hệ khác nhau đối với từng loại vi sinh vật. Có những loại vi sinh vật không cần đòi hỏi cung cấp bất kỳ một loại acid amine nào. Chúng có khả năng tổng hợp ra toàn bộ những acid amine mà chúng cần từ những nguồn nitơ vô cơ hay hữu cơ chuyển thành dạng NH_3 để xây dựng cơ thể. Người ta gọi nhóm vi sinh vật này là tự dưỡng amine. Có những vi sinh vật bắt buộc phải cung cấp thêm một số acid amine trong quá trình sống mà chúng không có khả năng tổng hợp được gọi chúng là vi sinh vật dị dưỡng acid amine, loại này chúng tổng hợp protein và nguyên sinh chất của mình từ những acid amine có sẵn, acid amine được sử dụng làm nguyên liệu trực tiếp không bị phân giải thành NH_3 . Protein là hợp chất cao phân tử chúng không thể xâm nhập vào tế bào vi sinh vật. Vì vậy chỉ có những vi sinh vật tiết vào môi trường men protease thủy phân protein thành peptid và acid amine thì nó mới có khả năng đồng hóa được protein. Rất nhiều vi sinh vật có được khả năng này, đặc biệt là các vi sinh vật gây thối yếm khí. Loại thứ ba là vi sinh vật không có các acid amine trong môi trường vẫn phát triển được, nhưng nếu có mặt của một số acid amine thì chúng phát triển tốt hơn.

Nhu cầu về các loại acid amine ở các loài vi sinh vật khác nhau là không giống nhau.

Để tìm hiểu mối quan hệ giữa acid amine của một chủng vi khuẩn nào đó, trước hết người ta cấy chúng lên môi trường dinh dưỡng có nguồn nitơ duy nhất là muối amon. Nếu chúng phát triển được, chúng tỏ chúng thuộc nhóm tự dưỡng amine. Nếu chúng không phát triển được và sau khi bổ sung dịch acid amine (thủy phân casein có trộn thêm tryptophan) lại phát triển tốt thì chúng thuộc nhóm dị dưỡng acid amine, nếu sau khi bổ sung acid amine mà vẫn không phát triển được thì phải xem xét đến các yếu tố, nguồn carbon, vitamine, pH,...

Muốn biết quan hệ của một chủng vi khuẩn nào đó với từng loại acid amine riêng biệt, người ta sử dụng môi trường có chứa đầy đủ nguồn thức ăn carbon, khoáng, vitamine (dạng

hoá chất tinh khiết nhưng không chứa acid amine), lần lượt bổ sung từng loại acid amine vào môi trường và theo dõi sự phát triển của chúng đối với chúng vi sinh vật này. Cũng có thể đưa vào môi trường một hỗn dịch chứa đầy đủ các acid amine và các hỗn dịch đã loại bỏ một cách phân biệt từng acid amine một. Theo dõi sự phát triển của vi sinh vật, sẽ xác định được nhu cầu của chúng đối với từng loại acid amine.

Nhiều vi sinh vật có khả năng dùng một loại acid amine nào đó làm nguồn thức ăn nitơ duy nhất. Chúng sẽ phân giải amine này thành NH_3 rồi sau đó tự tổng hợp nên các acid amine khác.

Có những chủng vi sinh vật biểu hiện mối quan hệ mật thiết giữa nồng độ một acid amine nào đó trong môi trường và sự phát triển của chúng. Người ta gọi chúng là những vi sinh vật chỉ thị, dùng trong việc định lượng acid amine.

Có thể dùng phương pháp gây đột biến để tạo ra các chủng vi sinh vật "khuyết dưỡng", tức là những chủng mất đi khả năng tự tổng hợp một chất nào đó, chúng trở nên mẫn cảm với sự có mặt với nồng độ của chất mà chúng cần (một acid amine, một vitamin,...). Phương pháp phân tích acid amine nhờ vi sinh vật ngày càng được sử dụng rộng rãi trên thế giới. Nó cho phép phát hiện những nồng độ acid amine rất thấp.

2.3. Nguồn thức ăn khoáng đối với vi sinh vật

Khi sử dụng các môi trường tự nhiên để nuôi cấy vi sinh vật, người ta không cần bổ sung thêm khoáng vì trong thức ăn đã có sẵn khoáng cần thiết (khoai tây, nước thịt, sữa, huyết thanh, sữa, pepton, nước chiết giá đậu,...). Ngược lại khi làm môi trường tổng hợp (nguyên liệu là hoá chất), phải bổ sung đầy đủ các nguyên tố khoáng cần thiết. Những nguyên tố khoáng mà vi sinh vật cần nhiều cho quá trình sống gọi là nguyên tố khoáng đa lượng (P, K, Na, S, Mg,...) còn những nguyên tố khoáng mà vi sinh vật chỉ cần ít trong quá trình sống gọi là nguyên tố khoáng vi lượng (Mn, Cu, Co,...). Nhu cầu về khoáng của các loài vi sinh vật khác nhau là không giống nhau, từng thời điểm khác nhau cũng khác nhau. Các nguyên tố khoáng thường được sử dụng trong nuôi cấy vi sinh vật: P, S, Mg, Ca, Zn, Mn, Na, K.

Nguyên tố P chiếm tỷ lệ cao nhất trong tất cả các nguyên tố khoáng của tế bào (thường chiếm 50% tổng số khoáng). P tham gia cấu tạo nhiều thành phần quan trọng của tế bào (acid nucleic, phosphorprotein, phosphorlipid,...). Sự có mặt của các muối phosphate (nhất là K_2HPO_4 , KH_2PO_4) tạo ra tính đệm cho môi trường, đảm bảo pH từ 4,5-8,0.

Nguyên tố S cũng là một chất khoáng quan trọng trong tế bào vi sinh vật. Nó tham gia vào thành phần một số acid amine (cystin, cystein, methionin), một số vitamine (B_1 , B_7) và một số coenzyme có vai trò quan trọng trong quá trình oxi hóa khử.

Nguyên tố K chất khoáng chiếm tỷ lệ khá lớn trong thành phần khoáng tế bào vi sinh vật. Nhưng cho đến nay người ta chưa tìm thấy K tham gia vào thành phần nào trong nguyên sinh chất, cũng như không có enzyme nào chứa K. người ta nhận thấy K^+ thường tồn tại ở trạng thái tự do ở mặt ngoài tế bào. Nhiều nghiên cứu K^{40} cho biết một phần đáng kể K tồn tại ở trạng thái liên kết lý hóa với protein và các thành phần khác của nguyên sinh chất. K có thể tác dụng như các ion kim loại khác thông qua việc ảnh hưởng đến tính chất hóa keo và hoạt động xúc tác của enzyme. Nhưng nhiều thí nghiệm cho biết việc thay thế K bằng các ion kim loại hóa trị I (Na, Li, Rb, Cs,...) đều không có kết quả. Có những tài liệu cho biết K tham gia vào việc hoạt hóa một số enzyme amylase, invertase, phosphotrans acetylase, acetyl CoA-cynthetase, pyruvate phosphatekinase, ATP-ase. K làm tăng độ ngậm nước của hệ thống keo do đó ảnh hưởng đến quá trình trao đổi chất, nhất là các quá trình tổng hợp, K có những ảnh hưởng đáng kể đến quá trình hô hấp của các tế bào vi sinh vật.

Na và Cl là những nguyên tố mà tế bào đòi hỏi với lượng không nhỏ nhưng cho đến nay người ta vẫn còn hiểu biết rất ít về vai trò sinh lý của chúng.

Mg có vai trò quan trọng trong việc hoạt hóa nhiều loại men khác nhau và có vai trò trong việc liên kết cũng như tách rời các tiểu phần ribosome.

Fe là thành phần có trong các loại men như cytochrome, cytochrome oxidase, peroxidase, catalase,...

Bình thường khi nuôi cấy vi sinh vật người ta không cần bổ sung các nguyên tố vi lượng. Những nguyên tố này có sẵn trong nước máy, trong hóa chất, dung môi làm môi trường. Trong một số trường hợp cụ thể người ta phải bổ sung một số nguyên tố vi lượng như: bổ sung Zn khi nuôi cấy nấm mốc, bổ sung Co vào môi trường nuôi cấy vi sinh vật tổng hợp vitamine B₁₂.

2.4. Nhu cầu về chất sinh trưởng của vi sinh vật

Vấn đề về chất sinh trưởng của vi sinh vật đã được L. Pasteur phát hiện từ khoảng 1859-1864, khi ông nuôi cấy vi sinh vật trên môi trường chứa carbon, muối amon và một số thức ăn khác. Ông nhận thấy vi sinh vật phát triển yếu. Nhưng nếu bổ sung thêm một ít nước chiết các nguyên liệu thiên nhiên vào môi trường nói trên thì sự phát triển của vi sinh vật tăng lên rất nhiều.

Năm 1912 K. Funk, nhà sinh hoá học người Ba Lan nhận thấy trong cám gạo có một chất hữu cơ có thể điều trị được bệnh tê phù ở gà. Ông cho rằng chất này thuộc acid amine không thay thế và đặt tên cho chúng là vitamine (có nghĩa là acid amine cần thiết cho sự sống). Thuật ngữ này được sử dụng rộng rãi tới ngày nay, mặc dù người ta biết rằng vitamine không phải là acid amine, nhiều loại vitamine không có chứa gốc amine nào trong cấu trúc của chúng. Người ta định nghĩa vitamine là những chất hữu cơ ngoại sinh hoàn toàn, cần thiết đối với hoạt động sinh sống bình thường của cơ thể người và động vật mặc dù chỉ cần với lượng rất là nhỏ. Thiếu bất kỳ một vitamine nào ở cơ thể người và động vật đều có thể bị những rối loạn nhất định trong trao đổi chất.

Về bản chất thì ngày nay người ta đã xác định được phần lớn các vitamine là những thành phần của coenzyme. Những hợp chất hữu cơ có bản chất phi protein tham gia vào những biến đổi do enzyme xúc tác với tính chất là những yếu tố phù hợp không thể thiếu được.

Tuy nhiên khái niệm chất sinh trưởng của vi sinh vật không hoàn toàn giống với khái niệm "vitamine" đối với cơ thể người và động vật. Đối với vi sinh vật thì khái niệm chất sinh trưởng là một khái niệm rất linh động. Nó chỉ có ý nghĩa là những chất hữu cơ cần thiết đối với hoạt động sống mà một loại vi sinh vật nào đó không tự tổng hợp được ra chúng từ những chất khác.

Như vậy cùng một chất nhưng nó có thể là chất cần thiết (nếu vi khuẩn không tự tổng hợp được) nhưng nó lại không cần thiết (nếu vi khuẩn tự tổng hợp được) hoặc nó có thể là có tác dụng kích thích sinh trưởng (nếu như vi sinh vật nào đó tự tổng hợp được nhưng nhanh chóng tiêu thụ hết). Như vậy những chất có thể coi là chất kích thích sinh trưởng của loại vi sinh vật này hoàn toàn có thể không phải là chất sinh trưởng đối với một loại vi sinh vật khác. Hầu như không có chất nào là chất sinh trưởng chung cho tất cả các loại vi sinh vật.

Thông thường các chất được coi là chất sinh trưởng đối với một loại nào đó có thể thuộc về một trong các loại sau đây: các gốc kiềm purin, pirimidin và các dẫn xuất của chúng, các acid béo và thành phần của màng tế bào, các vitamine thông thường.

Một số gốc kiềm không chỉ có mặt trong acid nucleic mà còn có mặt trong nhiều coenzyme, chẳng hạn như sự có mặt của adenin trong coenzyme A, FAD, FMN, ATP, NAD, NADP,...

III. CƠ CHẾ VẬN CHUYỂN CÁC CHẤT DINH DƯỠNG VÀO TẾ BÀO VI KHUẨN [4]

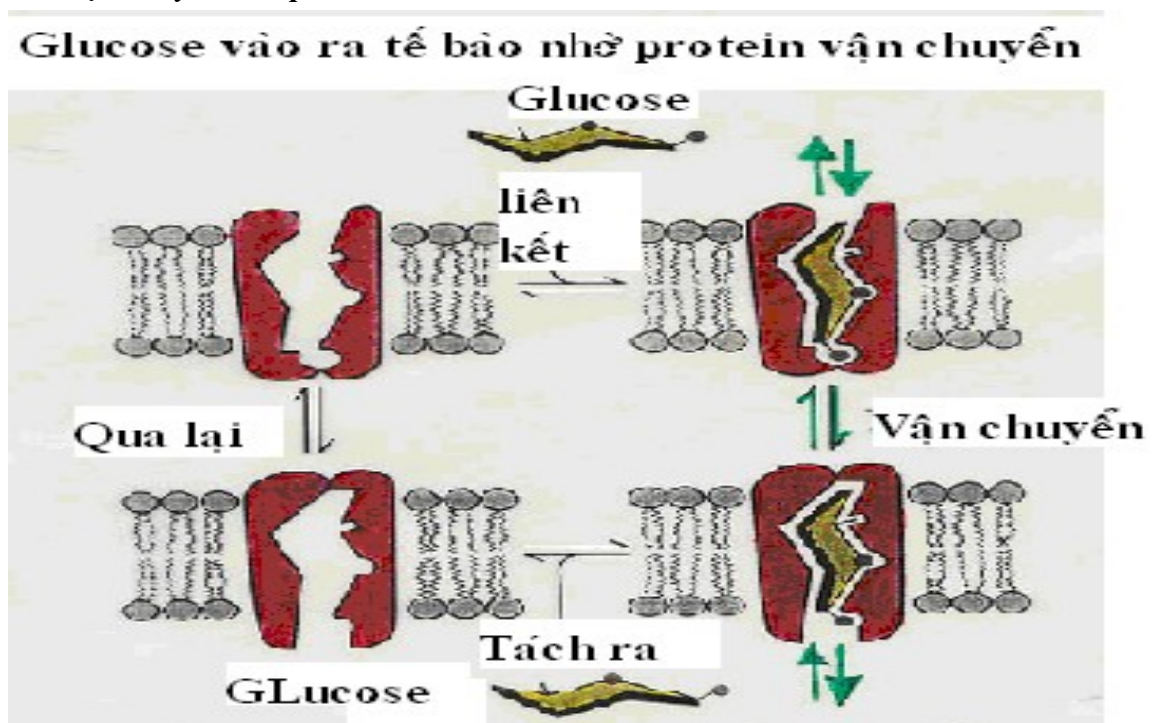
Để tồn tại và phát triển, tế bào vi sinh vật thường xuyên phải trao đổi chất và năng lượng với môi trường bên ngoài. Một mặt chúng nhận các chất dinh dưỡng cần thiết từ môi trường ngoài, mặt khác thải ra ngoài các sản phẩm trao đổi chất. Như vậy, giữa môi trường xung quanh và môi trường bên trong tế bào tồn tại một hàng rào thẩm thấu, hàng rào này chính là màng tế bào chất lipoprotein. Những dẫn chứng sau đây có thể chứng minh kết luận trên: Các hợp chất ưa lipid thường xâm nhập vào tế bào nhanh hơn các hợp chất kỵ lipid. Hơn nữa nếu xử lý vi sinh vật bằng các dung môi của lipid như butanol (gây nên việc tách các hợp chất phân tử thấp khỏi tế bào) thì hàng rào thẩm thấu của vi sinh vật có thể bị hủy hoại. Rõ ràng là màng tế bào chất phải có khả năng tinh vi, điều chỉnh sự ra vào các chất khác nhau, tế bào nhận và thải các chất một cách chọn lọc. Vận chuyển của các chất qua thành tế bào tương đối đơn giản. Sự xâm nhập của nước và các chất hòa tan qua màng tế bào chất là quá trình động học; tế bào vi sinh vật đang sống không bao giờ ở trạng thái cân bằng với môi trường xung quanh. Các chất được vận chuyển qua màng tế bào chất thông qua một trong hai cơ chế: **khuếch tán đơn giản** hay còn gọi là vận chuyển bị động và **vận chuyển chủ động** phân tử protein đặc biệt có trên bề mặt tế bào.

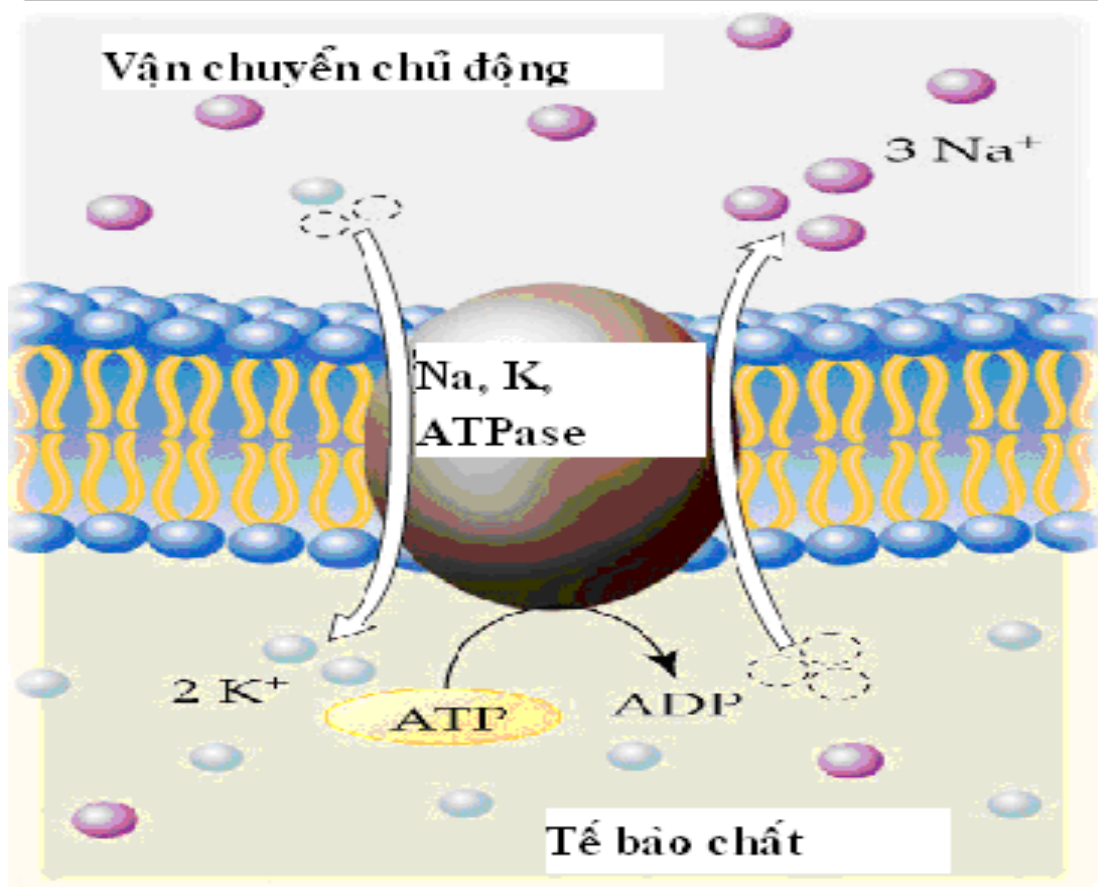
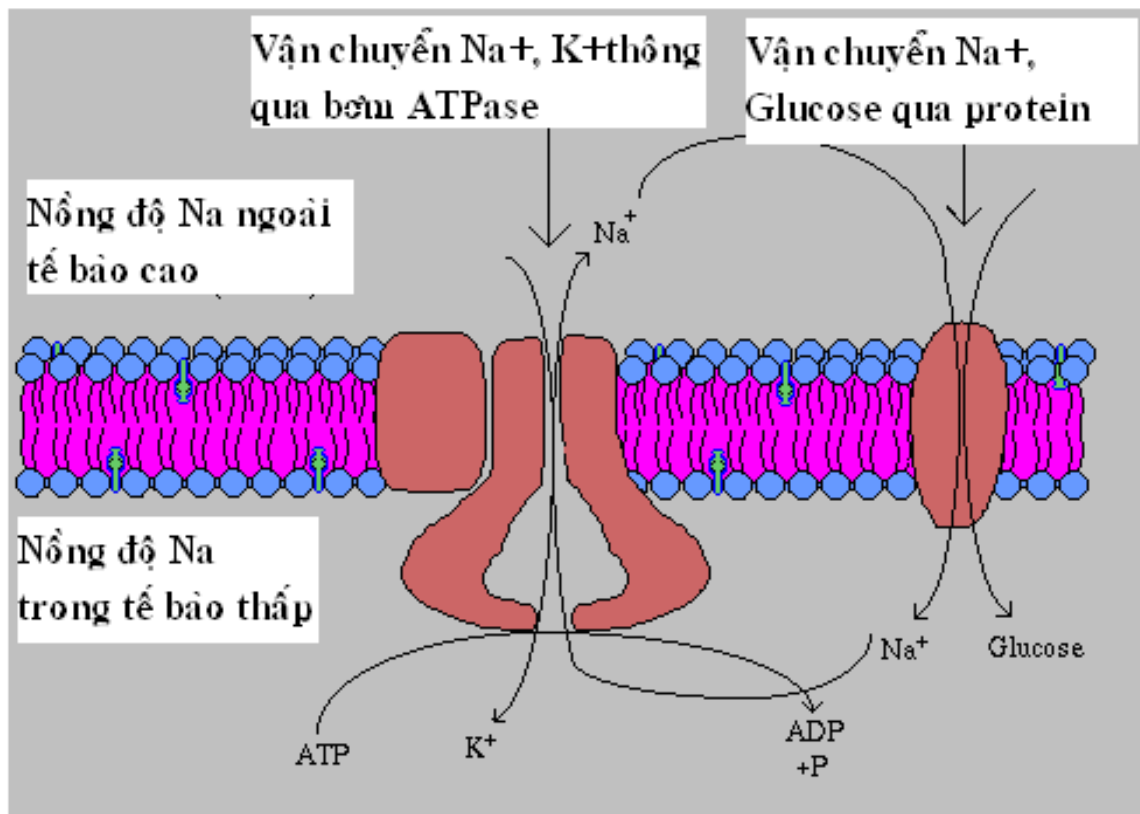
3.1. Khuếch tán thụ động

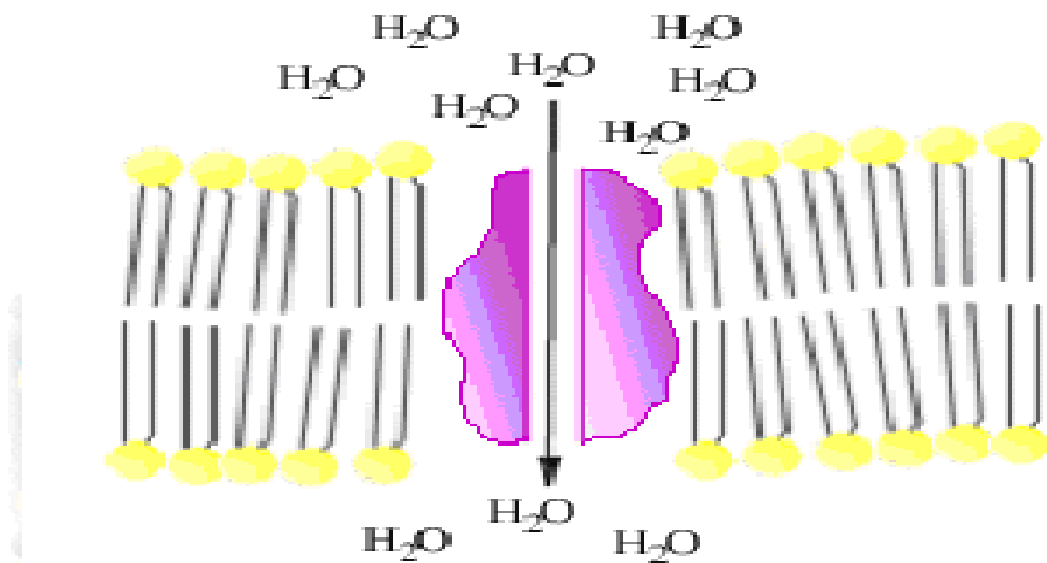
Các phân tử đi qua màng nhờ sự chênh lệch nồng độ (trong trường hợp các chất không điện phân) hay chênh lệch điện thế (trường hợp các ion) ở hai phía của màng. Sự vận chuyển kiểu này không đòi hỏi bất kỳ một chi phí năng lượng nào của tế bào vi sinh vật.

Hàng loạt các nghiên cứu đã khẳng định, trừ nước ra, rất ít các hợp chất có thể qua được màng tế bào theo cơ chế trên. Đa số các chất hòa tan qua màng do tác dụng của các chất vận chuyển đặc biệt:

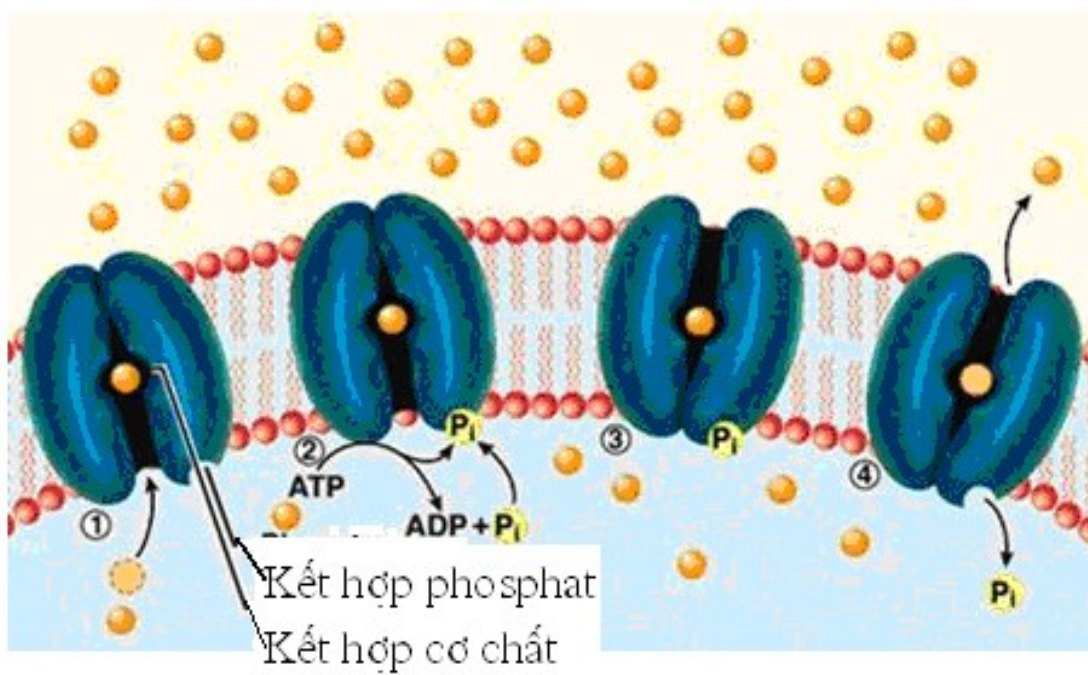
3.2. Vận chuyển nhờ permease



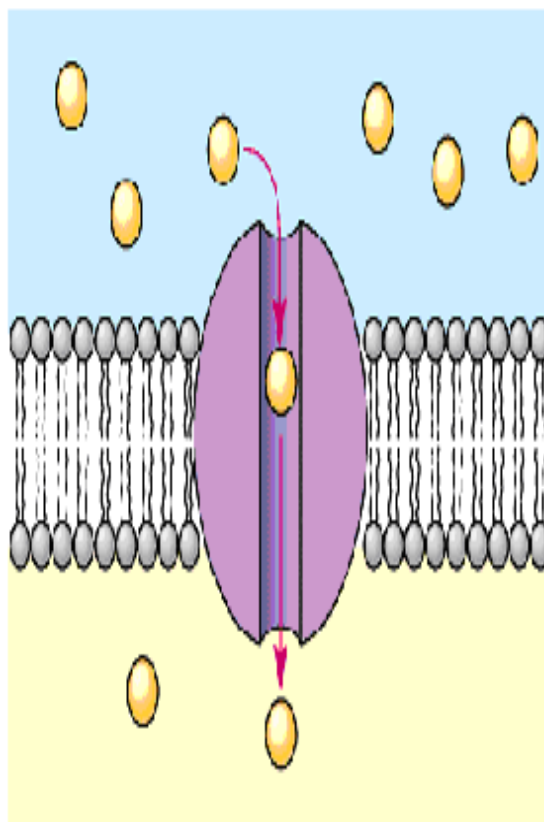
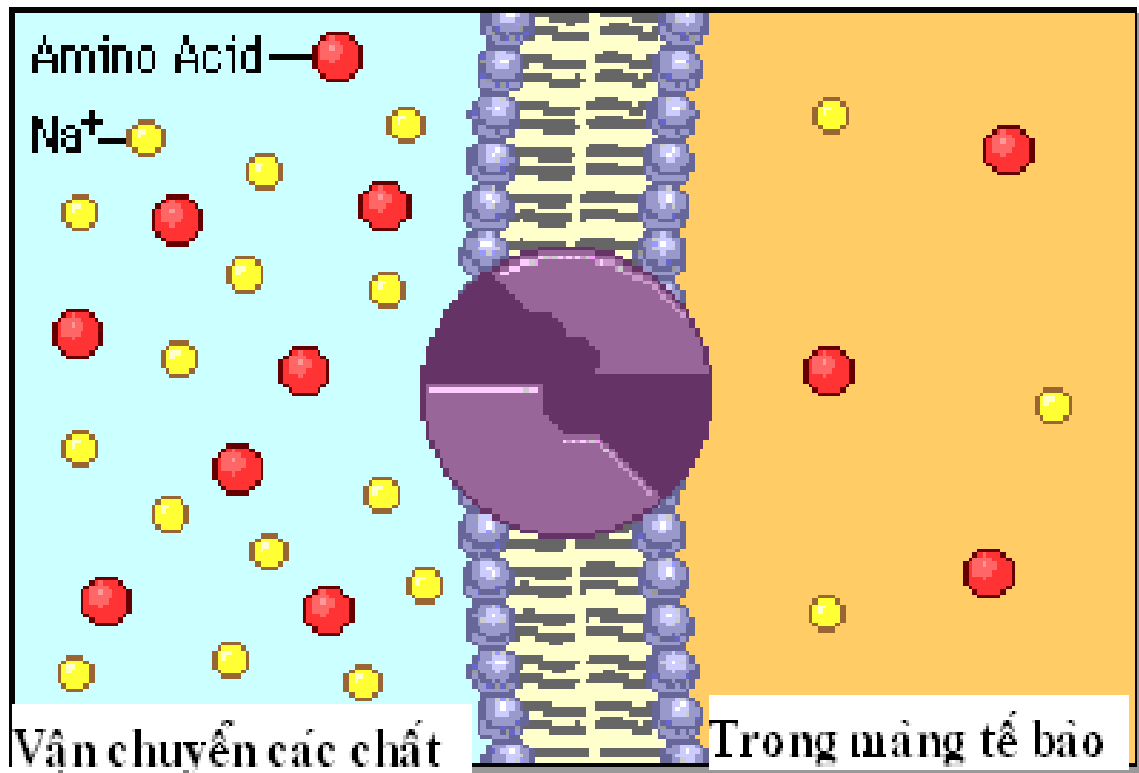




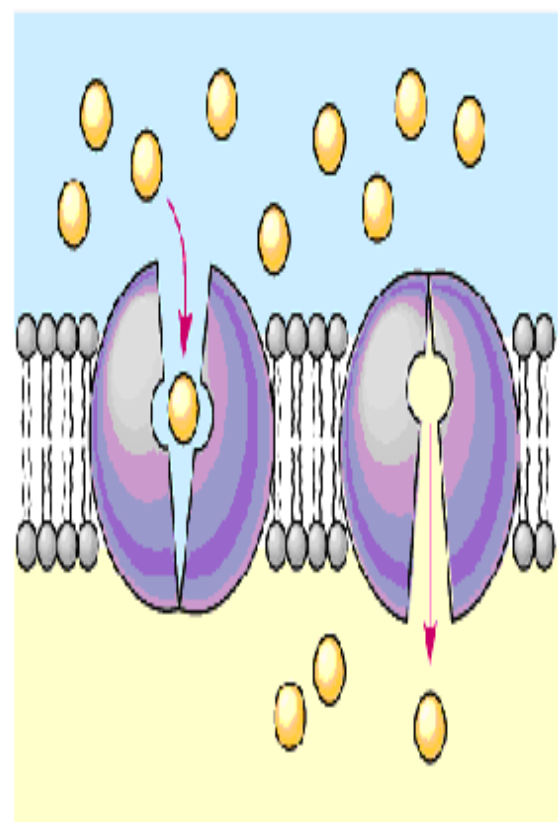
Sự khuếch tán thông qua các rãnh protein



Kết hợp phosphat
Kết hợp cơ chất



(a) Khuyếch tán



(b) Vận chuyển chủ động

Những phân tử protein vận chuyển sắp xếp trong màng liên kết với các phân tử chất hòa tan rồi chuyển chúng vào bề mặt bên trong của màng: từ đây các phân tử hòa tan được chuyển vào trong tế bào chất. Kiểu khuếch tán này được gọi là **kiểu khuếch tán xúc tiến**. Các phân tử protein vận chuyển nói trên được gọi là **protein thấm-permease**. Bản chất protein của permease được khẳng định bởi các dẫn chứng sau:[4]

Việc tổng hợp permease thường được cảm ứng hoặc được kiểm chế như tổng hợp một số enzyme.

Chloramphenicol ức chế việc tổng hợp protein cũng ức chế quá trình tổng hợp permease.

Hàng loạt các protein màng mang tính chất của permease đã được tách ra.

Tế bào vi sinh vật có khả năng tổng hợp một lượng lớn các permease, các acid amine và hydrate carbon. Tuy nhiên nếu hệ thống vận chuyển này đều được tổng hợp thường xuyên theo kiểu cấu trúc thì tế bào sẽ phí phạm về vật chất và năng lượng. Do đó, chúng ta không lấy làm lạ là, nhiều permease được tổng hợp theo kiểu cảm ứng hoặc kiểm chế. Ngoài ra protein thấm còn có enzyme vận chuyển.

Sự vận chuyển các chất dinh dưỡng nhờ permease có thể theo cơ chế **thụ động** (không cần năng lượng) hoặc **chủ động** (cần năng lượng tế bào).

Theo cơ chế vận chuyển **thụ động** thì chất hòa tan liên kết thuận nghịch vào một vị trí trên phân tử permease nằm ở bên trong màng (có thể ở các lỗ của màng). Phức hợp chất hòa tan được vận chuyển theo cả hai phía của màng nhờ sự chênh lệch nồng độ của một chất nào đó, nghĩa là sự vận chuyển diễn ra theo kiểu "xuôi dòng". Sự vận chuyển thụ động đã được chứng minh ở một số vi sinh vật.

Tuy nhiên vi sinh vật có khả năng tích lũy một số chất với nồng độ cao hơn nhiều so với bên ngoài. Chẳng hạn nồng độ của K^+ bên trong tế bào có thể cao gấp hàng ngàn lần so với bên ngoài. Để đảm bảo trung hòa điện tử, tế bào cũng phải thải ra ngoài các ion H^+ , hay Na^+ . Thêm vào đó người ta còn thấy ở các màng tế bào vi khuẩn có hoạt tính của ATP - ase là men có liên quan đến việc vận chuyển các chất. Như vậy trong tế bào vi sinh vật ngoài cơ chế vận chuyển thụ động còn tồn tại cơ chế vận chuyển **chủ động nhờ permease**. Sự vận chuyển này được tiến hành bất chấp gradien nồng độ nghĩa là theo kiểu "ngược dòng" năng lượng tiêu thụ có lẽ do ATP (hình thành trong mesosom hoặc màng tế bào chất) cung cấp.

Trong mô hình vận chuyển trên thì cùng một phân tử permease có thể đảm nhận cả chức vận chuyển chủ động lẫn chức vận chuyển thụ động (tùy theo sự có mặt hay vắng mặt của ATP).

Ngày nay, người ta đã phân lập được hàng loạt protein vận chuyển trong các loài vi sinh vật. Giống như enzyme, chúng có tính đặc hiệu cơ chất khác nhau. Một số có tính đặc hiệu hầu như tuyệt đối. Chẳng hạn như permease của galactose ở *E. coli* chỉ vận chuyển galactose. Các permease của đường và acid amine khác thể hiện tính đặc hiệu yếu hơn đối với các chất hòa tan. Điều đáng chú ý là, trong vi khuẩn sự vận chuyển chủ động của đường, phụ thuộc vào các quá trình phosphoryl hóa. Năm 1964 Kundig phân lập được một hệ thống phosphotransferase bao gồm hai men (E1 và E2) và một protein vận chuyển bền nhiệt (HPr) có khối lượng phân tử thấp. Các thành phần protein của hệ thống này đã được thuần khiết và phản ứng diễn ra hai bước:

Trước hết E1 chuyển phosphate từ phosphoenolpiruvat (PEP) đến HPr:



Sau đó E2 chuyển phosphate từ HPr-P đến C6 của đường đơn.

E1 là chung cho nhiều loại đường nhưng E2 lại đặc hiệu cho từng loại đường. Nghĩa là một đột biến nào đó ảnh hưởng đến việc tổng hợp E1 sẽ dẫn đến mất khả năng vận chuyển nhiều loại đường. Trái lại với đột biến như thế với E2 chỉ ảnh hưởng đến sự vận chuyển một loại đường.

IV. TRAO ĐỔI CHẤT VÀ NĂNG LƯỢNG

Khái niệm trao đổi chất

Trao đổi chất là chỉ các chuyển hoá có liên quan đến quá trình tổng hợp và phân huỷ trong tế bào. Trao đổi chất gồm có hai quá trình đồng hoá và dị hoá.

Quá trình đồng hoá: là quá trình chế biến lại các chất dinh dưỡng được hấp thụ thành chất riêng của tế bào từng loại vi sinh vật. Quá trình này còn gọi là sự trao đổi kiến tạo hay sự sinh tổng hợp, đây là quá trình thu nhiệt.

Quá trình dị hoá: quá trình phân huỷ các thành phần bên trong tế bào. Sản phẩm của sự phân huỷ được thải ra ngoài môi trường hay được tế bào sử dụng.

Quá trình trao đổi năng lượng: là quá trình phân huỷ có kèm giải phóng năng lượng.

Ở sinh vật bậc cao quá trình dị hoá và trao đổi năng lượng chỉ là một, đó là sự oxi hoá các chất hữu cơ trong cơ thể để giải phóng năng lượng Q.

Ở vi sinh vật quá trình trao đổi năng lượng không chỉ là quá trình dị hoá (phân huỷ các thành phần trong cơ thể) mà chủ yếu còn là quá trình phân huỷ với các chất được hấp thụ từ bên ngoài.

Như vậy có thể nhận thấy quá trình TĐC ở vi sinh vật chính là sự tổng hợp các phản ứng hoá học diễn ra trong tế bào, gồm hai loại:

-Các phản ứng giải phóng năng lượng-trao đổi năng lượng

-Các phản ứng sử dụng năng lượng-trao đổi kiến tạo, (tổng hợp)

Hai quá trình này tương tác và diễn ra đồng thời. Năng lượng sinh ra được dùng trong quá trình tổng hợp các thành phần cấu trúc tế bào (vách, màng). Tổng hợp các enzyme, acid nucleic, lipid, polysaccharid và năng lượng còn lại dùng cho các hoạt động sống khác của tế bào như sinh trưởng sinh sản, vận chuyển chất dinh dưỡng, di động.

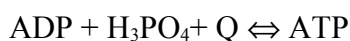
4.1. Quá trình trao đổi năng lượng

Quá trình TĐNL nhằm cung cấp năng lượng cho hoạt động sống của cơ thể là một mặt hoạt động sinh lý quan trọng của sinh vật nói chung và vi sinh vật nói riêng. Hoạt động sinh lý này như đã quen gọi là sự hô hấp.

4.1.1. Bản chất của sự hô hấp vi sinh vật

Cũng như các sinh vật khác bản chất của hô hấp VSV là quá trình oxi hoá khử được thực hiện bằng sự khử hydro của cơ chất và chuyển H này cho chất nhận, hoàn thành giai đoạn oxi hoá khử giải phóng ra năng lượng. Sự hô hấp khác nhau của VSV phụ thuộc vào chất nhận H cuối cùng của quá trình oxi hoá khử: có thể là oxi phân tử (O_2), là chất hữu cơ hay chất vô cơ.

Năng lượng giải phóng sẽ được giữ lại trong các hợp chất giàu năng lượng trong tế bào (ATP, axetyl photphat, axetyl CoA) trong số này quan trọng nhất là ATP. Năng lượng của ATP được dùng trong hầu hết các phản ứng cần năng lượng; AMP, ADP, ATP rất dễ chuyển hoá tương hỗ lẫn nhau, do đó sử dụng rất tốt trong quá trình trao đổi năng lượng.



So với động vật, hô hấp ở VSV có những điểm chung giống nhau nhưng cũng có những điểm khác nhau, đó là:

Quá trình cung cấp năng lượng cho hoạt động sống

Không có bộ máy hô hấp chuyên trách, sự hô hấp xảy ra trên toàn bộ tế bào.
Hô hấp có thể cần oxi như động vật nhưng cũng có thể không cần oxi (hô hấp yếm khí).

Cơ chất để oxi hoá có thể là chất hữu cơ và cũng có thể là chất vô cơ.

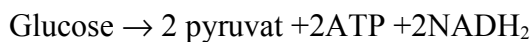
Một phần năng lượng của quá trình oxi hoá được chuyển thành nhiệt năng làm nóng môi trường.

4.1.2. Các loại hô hấp

Vi sinh vật có thể oxi hoá khử các chất hữu cơ và vô cơ để cho năng lượng nhưng hầu như đại đa số VSV sử dụng chất hữu cơ mà chủ yếu là đường Glucose. Bất kể loại VSV nào dù hô hấp hiếu khí hay yếm khí thì chúng đều thực hiện giai đoạn đầu phân giải glucose giống nhau, theo 3 con đường chính sau đây:

-Con đường E.M.P (Empden-Meyehof-pasnas)

Glucose chuyển thành Pyruvat qua 10 phản ứng tạo ra các chất trung gian đều ở dạng photphoryl hóa:



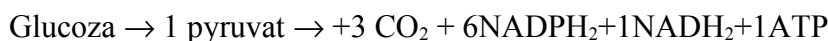
Ở đây ATP (chất cao năng dùng phổ biến ở mọi tế bào) được tạo thành do photphoryl hóa cơ chất.

Con đường EMP đã cung cấp 6 tiền chất dùng để tổng hợp các đơn vị cấu trúc là Glc-6-P, Fruct-6P, 3-P glyceraldehyd, 3-P-glyxerat, P-enol pyruvat và pyruvat.

-Con đường PP (Pentozo-phostphat)

Nhiều vi khuẩn bị đột biến lớn hơn một enzyme của con đường EMP nhưng vẫn chuyển hóa được glucose đến pyruvat nhờ con đường PP.

Con đường này cung cấp cho tế bào hai tiền chất khác nhau trong tổng hợp các đơn vị cấu trúc là ribozo-5P (dùng để tổng hợp acid nucleic, ADP,...), erytroza -4-P- (tổng hợp các acid amin thơm) cùng các NADPH₂



-Con đường Enter-Doudoroff (KDPG)

Chỉ gặp ở vi khuẩn chuyển hóa gluconat: *Pseudomonas*, *saccharofhila* và *Alcaligenes* phân giải 100% glucose theo con đường này

Giữa 3 con đường chuyển hóa chuyển hóa trên có mối quan hệ qua lại với nhau và tùy thuộc vào loại hình vi sinh vật khác nhau tỷ lệ % đường được phân giải theo từng con đường là không giống nhau.

4.1.2.1. Hô hấp hiếu khí

Là quá trình oxy hóa khử cơ chất có sự tham gia của O₂. Oxi là chất nhận điện tử cuối cùng. Thực hiện loại hô hấp này thuộc về nhóm vi sinh vật hiếu khí, nhưng căn cứ vào cơ chất bị oxi hóa để cho năng lượng mà phân thành hai loại hô hấp là: hô hấp hiếu khí dị dưỡng và hô hấp hiếu khí tự dưỡng.

Hô hấp hiếu khí dị dưỡng: là loại hình hô hấp của các vi sinh vật dị dưỡng hóa năng.

Quá trình hô hấp được diễn ra như sau

Trước hết glucose được phân giải thành pyruvat theo một trong ba con đường phân giải khác nhau đó là con đường EMP, PP, KDPG, sau đó pyruvat đi vào chu trình ací tricacboxylic (ATC) hay còn gọi là chu trình Krebs.

Trước hết phần lớn pyruvat trong điều kiện có oxi được chuyển hóa thành axetyl -CoA nhờ phức hệ pyruvat-drhydrogenaza (PDH)



Các H^+ và electron (e) tách ra từ cơ chất tham gia vào chu trình hô hấp và e được chuyển đến O_2 . Năng lượng thoát ra được tổng hợp thành ATP một cách mạnh mẽ nhờ chuỗi hô hấp.

4.1. Năng lượng hóa học

Trong quá trình sống, như những sinh vật khác, vi sinh vật cũng cần có năng lượng. Các quá trình oxi hoá - phân hủy kèm với quá trình giải phóng năng lượng gọi là quá trình trao đổi năng lượng (năng lượng hóa học). Ở sinh vật bậc cao thì hai khái niệm trao đổi năng lượng và dị hoá gắn liền với nhau nhưng ở vi sinh vật thì hai khái niệm này có thể phân biệt với nhau. Có thể do lượng vật chất trong cơ thể vi sinh vật quá ít, nên trong quá trình sống chúng phải sử dụng cả các hợp chất thu được từ môi trường.

Chuyển hóa năng lượng: năng lượng cần thiết cho quá trình sống của vi khuẩn có được là nhờ quá trình oxi hóa các cơ chất năng lượng.

Sự chuyển hóa năng lượng (trao đổi năng lượng) của động vật bậc cao trùng hợp với quá trình trao đổi chất (đồng hóa và dị hóa). Nhưng đối với vi khuẩn không nhất thiết có sự trùng hợp này. Vi khuẩn có khả năng hấp thu năng lượng cơ chất năng lượng qua màng của tế bào.

Đối với nhóm vi sinh vật kỵ khí quá trình oxi hóa sinh năng lượng không kèm theo việc liên kết với oxi không khí. Ngày nay người ta hiểu rằng oxi hóa không chỉ có nghĩa là liên kết với oxi mà bao gồm cả quá trình mất hydro như quá trình tách hydro hoặc quá trình mất electron tăng thêm hóa trị dương.

Phụ thuộc vào sự có mặt của oxi trong quá trình chuyển hóa của vi khuẩn, người ta chia chúng ra làm các nhóm sau:

+Vi khuẩn hiếu khí: cần oxi cho quá trình phát triển

+Vi khuẩn kỵ khí: hô hấp kỵ khí thuần túy và lên men

Hô hấp hiếu khí: ở vi khuẩn hô hấp là quá trình chuyển hóa năng lượng diễn ra trong chuỗi dài cytochrom có sự tham gia của men vàng Obiquinon, nhưng chất nhận e cuối cùng là O_2 của khí trời.

Hô hấp kỵ khí: chất nhận điện tử cuối cùng không phải là oxi mà là các chất vô cơ khác. Các vi khuẩn nhóm này không có hệ thống Cytocrom và các men peroxidase, deoxidase để phân hủy O_2 cho nên O_2 độc với chúng.

Lên men: là quá trình hô hấp kỵ khí, trong đó chất nhận điện tử cuối cùng là một phần chất hữu cơ sinh năng lượng.

Ví dụ : $C_6H_{12}O_6$ (lên men rượu) $\rightarrow 2CH_3CH_2OH + 2CO_2$

Tóm lại quá trình đồng hóa năng lượng là quá trình tăng ATP trong tế bào còn quá trình dị hóa là giảm ATP trong tế bào.

***Phân loại vi khuẩn theo chuyển hóa năng lượng:** chia vi khuẩn làm ba nhóm:

Vi khuẩn hiếu khí: chỉ phát triển trong điều kiện có O_2 , tuy nhiên nhu cầu oxi không nhất định. Nhóm cần nhiều oxi (vi khuẩn lao), nhóm cần ít oxi (vi hiếu khí) đối với loại này lượng oxi cần rất nhỏ (vi khuẩn sẩy thai truyền nhiễm)

Vi khuẩn yếm khí (còn gọi là kỵ khí) là những vi khuẩn có phương thức trao đổi kỵ khí và lên men. Những vi khuẩn gây bệnh thuộc nhóm này rất nguy hiểm như vi khuẩn uốn ván,...

Vi khuẩn yếm khí tùy tiện: phát triển được trong cả điều kiện yếm khí và hiếu khí.

4.2. Sự phân giải các hợp chất hữu cơ

4.2.1. Phân giải các hợp chất không chứa Nito

+Phân giải cellulose

Hàng năm có khoảng 30 tỷ 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 cellulose, người ta nhận thấy cellulose chiếm 90% trong bông và 40-50% trong gỗ.

Các sợi cellulose tự nhiên chứa khoảng 10000-12000 gốc gluco, các sợi này liên kết thành bó nhỏ gọi là các microfibrin. Trọng lượng phân tử của từng loại cellulose thay đổi tùy từng loại thực vật.

Cellulose là loại hợp chất bền vững, không tan trong nước, nó không được tiêu hoá trong đường tiêu hoá của con người, sở dĩ động vật nhai lại và con người tiêu hoá được cellulose là nhờ hoạt động phân giải cellulose của rất nhiều loại vi sinh vật (sống trong dạ cỏ và trong đường tiêu hoá của người)

Các loại vi sinh vật phân giải cellulose

Vi sinh vật (vsv) hiếu khí				Vsv yếm khí	Vsv yếm khí sống tự do	Vsv ưa nóng
<i>Cytophaga, Sporicytophaga, cenlulomonas</i>	Niêm vi khuẩn:	<i>Bacillus</i>	Vi khuẩn	Nấm mốc <i>Aspergillus, Penicilium, Fusarium</i>	Vi khuẩn dạ cỏ loài <i>Ruminococcus</i>	<i>Bacillus cellulose methanicus</i> <i>Bacillus cellulose hydrogenicus</i>
						<i>Bacillus cellulose thermophilicus</i>

Cơ chế của quá trình phân giải cellulose : Muốn phân giải được cellulose các vi sinh vật phải tiết ra men cellulase, sau đó men mới tác động trực tiếp lên cellulose.

Cellulose → disaccharit → monosaccharit (glucose)

+ Sự phân giải tinh bột

Tinh bột là chất dự trữ chủ yếu của thực vật, nó phản ứng với iod tạo thành 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 hình dạng và kích thước thay đổi tùy theo loại thực vật. Tinh bột gồm hai thành phần khác nhau amylose và amylosepectin.

Vi sinh vật phân giải tinh bột

Nhiều loại vi sinh vật có khả năng sản sinh ra men amylase ngoại bào làm phân giải tinh bột thành các thành phần đơn giản hơn có thể phân biệt một số loại amylase sau:

α -amylase: tác động đồng thời lên nhiều dây nối, kể cả bên trong đại phân tử, sản phẩm phân giải này ngoài mantose còn có oligomer chứa 3-4 gốc glucose.

β -amylase: men này chỉ tác động bên ngoài đại phân tử, phân cắt liên kết 1-6 ở các vị trí phân nhánh.

Glucosyl amylase: phân giải tinh bột thành glucose và các oligosaccarit.

Một số loại vi sinh vật có hoạt tính amylase

Loại amylase	Vi sinh vật
α -amylase	<i>Aspegyllus candidus</i> , <i>Asp. niger</i> , <i>Asp. orysee</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>B. maccarans</i> , <i>B. mesintericus</i> , <i>Clostridium acetobutylicum</i> ,...
β -amylase	<i>Asp. awamori</i> , <i>Asp. orysee</i> ..
Glucosyl amylase	<i>Asp. niger</i> , <i>Asp. awamori</i> , <i>Asp. orysee</i> ..

Các quá trình lên men

+Quá trình lên men Etilic

Dưới tác dụng của một số loài vi sinh vật, đường glucosa có thể được chuyển hoá thành rượu etylic và CO₂ đồng thời làm sản sinh một số năng lượng xác định. Quá trình này được gọi là quá trình lên men etilic hay còn gọi là quá trình lên men rượu.

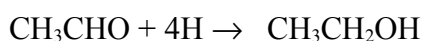
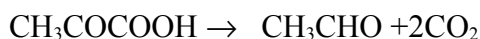
Vi sinh vật tham gia vào quá trình lên men rượu:

Loài nấm men có khả năng lên men rượu mạnh mẽ nhất và có nhiều ý nghĩa kinh tế nhất là *Saccharomyces cerevisiae*.

Loại nấm men này có khả năng lên men đường glucose, galactose, maltose, lactose, tinh bột.

Trong công nghiệp bia, người ta sử dụng các loại *Sac. carsbergensis*. Rượu rum thường lên men *Schizosacchrarmyces*, chúng phân biệt dễ dàng với *Saccharomyces* ở chỗ có khả năng phân chia tế bào nhờ vách ngăn ngang (không nảy chồi).

Tóm tắt quá trình:



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

Quá trình này được ứng dụng:

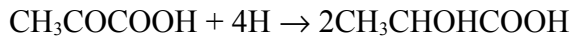
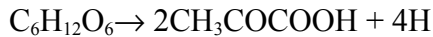
Sản xuất rượu bia, các loại nước giải khát, sử dụng nấm men làm nở bột mỳ, ủ thức ăn cho gia súc.

+Lên men lactic

Đường glucose dưới tác dụng của một số vi sinh vật yếm khí đặc biệt sẽ cho chúng ta acid lactic gọi là quá trình lên men lactic.

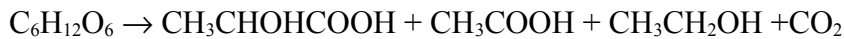
Cơ chế quá trình: Có hai quá trình lên men lactic khác nhau đó là lên men lactic đồng hình và lên men lactic dị hình.

Trong chu trình lên men lactic đồng hình glucose sẽ được chuyển hoá theo chu trình Embden-Meyerhoff để cuối cùng tạo thành acid pyruvic và NAD-H⁺. Acid pyruvic sẽ tiếp tục khử thành acid lactic:



Quá trình lên men lactic đồng hình được thực hiện bởi nhóm vi khuẩn *lactose bacterium* (*Thermobacterium*, *Streptobacterium*) và *Streptococcus*.

Trong quá trình lên men lactic dị hình, ngoài acid lactic còn tạo thành các sản phẩm khác như acid acetic, CO₂, ethanol, glyceril.



Vi khuẩn lên men lactic dị hình, ngoài việc tạo thành các acid lactic còn có nhiều sản phẩm khác. Vi khuẩn lên men lactic dị hình không có men chủ yếu của chu trình Embden - Meyerhoff.

Vi khuẩn lactic thuộc *Streptococcaceae* và *Lactobacillaceae*, vi khuẩn lactic không sinh bào tử, Gram dương (trừ *Lactobacillus inulinus*), thường không di động, chúng thuộc loại vi khuẩn kỵ khí hoặc hiếu khí.

Vi khuẩn lactic thường đòi hỏi nhiều chất sinh trưởng (acid amine, thiamin, riboflavin,...) chúng thường không thể phát triển được trên môi trường tổng hợp, người ta thường nuôi cấy vi khuẩn lactic trên các môi trường chứa chất hữu cơ phức tạp như nấm men, nước cà chua, sữa, máu,...

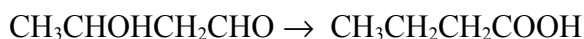
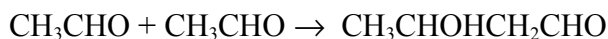
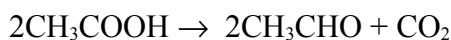
Nhiệt độ thích hợp cho vi khuẩn lactic phát triển đó là 22-45⁰C, vi khuẩn lactic thường ít gặp trong đất, nước, chúng thường phát triển ở những nơi có chứa nhiều chất hữu cơ phức tạp như trên xác thực vật, sữa,...

Ứng dụng: sản xuất acid lactic, chế biến sữa chua, ủ chua thức ăn cho gia súc.

Lên men butyric

Trong tự nhiên, đường glucose dưới tác dụng của một số vi sinh vật yếm khí đặc biệt, được chuyển hoá để cho ra acid butyric gọi là quá trình lên men butyric.

Cơ chế:



Qua cơ chế trên chúng ta thấy có sự trùng hợp giữa hai phân tử CH₃CHO. Quá trình trùng hợp này phụ thuộc rất nhiều vào điều kiện ngoại cảnh, khi ngoại cảnh thay đổi thì sản phẩm cũng thay đổi, ngoài acid butyric ra, người ta còn thu được nhiều sản phẩm khác như acid acetic, acetone, rượu butanol,...

Vi sinh vật lên men butyric

Vi sinh vật lên men chủ yếu là *Clostridium*, là một loại vi khuẩn Gram dương, chu mao, di động sinh nha bào, kích thước nha bào lớn hơn kích thước tế bào vi khuẩn nên khi mang nha bào vi khuẩn có dạng hình vệt, dài trống, chúng thích hợp trong phát triển kỵ khí.

Ứng dụng: vi khuẩn lên men butyric tham gia tích cực vào quá trình phân giải các hợp chất hữu cơ trong tự nhiên. Nhưng nếu quá trình này xảy ra mạnh thì lượng acid butyric sinh

ra nhiều gây ảnh hưởng đối với sự phát triển của cây trồng. Quá trình lên men butyric gây ảnh hưởng xấu trong quá trình bảo quản hoa quả, muối dưa, ủ chua thức ăn chăn nuôi.

4.2.2. Phân giải các hợp chất hữu cơ chứa Nitơ

+Quá trình amon hóa protein

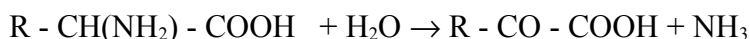
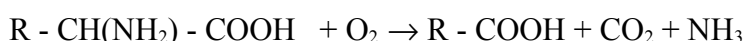
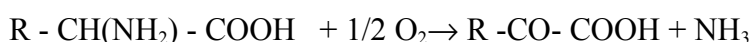
Dưới tác dụng của vi sinh vật, protein được phân giải để cho ra NH₃ gọi là quá trình amon hóa protein.

Trong tự nhiên có rất nhiều loại vi sinh vật có khả năng sản sinh vào môi trường men protease (proteinase và peptidase), chúng xúc tác quá trình thủy phân liên kết peptid và một số liên kết khác làm cho phân tử protein được phân giải. Khác với các loại protease của thực vật và động vật protein của vi sinh vật thường là men ngoại bào, có tính chuyển hóa rộng, căn cứ vào pH hoạt động của protease, người ta có thể chia làm ba loại, loại acid trung tính và kiềm.

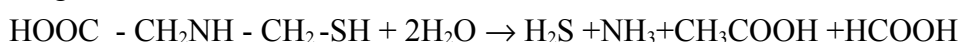
Vi sinh vật phân giải: có nhiều loại vi sinh vật có khả năng phân giải protein: vi khuẩn hiếu khí, yếm khí, xạ khuẩn, nấm.

Cơ chế

Dưới tác dụng của protease, protein được phân giải thành các hợp chất đơn giản (polypeptid và olipeptid). Các chất này tiếp tục phân giải thành acid amine nhờ tác dụng của men peptidase ngoại bào. Các acid amine này sẽ được sử dụng một phần vào quá trình sinh tổng hợp protein của vi sinh vật, một phần tiếp tục phân giải để tạo ra NH₃, CO₂ và nhiều sản phẩm trung gian khác. Quá trình phân giải từ một protein đến các acid amine là một quá trình phức tạp có thể diễn ra như sau:



Khi phân giải các acid amine chứa lưu huỳnh (cistin, cistein, methionin) vi sinh vật giải phóng ra khí H₂S



Khi phân giải triptophan một số vi sinh vật có thể sinh ra indol và scatone có mùi thối.

+Quá trình amon hóa urea

Vi khuẩn amon hóa urea thường thuộc loại hiếu khí hay kỵ khí không bắt buộc (*Micrococcus ureae*, *Planosarcina ureae*, *Bacillus*, *Pasteurella*,...). Chúng phát triển tốt trong môi trường trung tính hay hơi kiềm, chúng có men urease xúc tác phân giải urea thành NH₃, CO₂, và H₂O



+Quá trình amon hóa uric

Uric là một chất hữu cơ chứa trong nước tiểu. Chúng phân giải thành urea và acid. Sau đó ure được tiếp tục phân giải như trên.

4.3. Tổng hợp các hợp chất hữu cơ

4.3.1. Tổng hợp các hợp chất hữu cơ có Nitơ

+Sinh tổng hợp acid amine

Nhiều vi sinh vật có khả năng sinh tổng hợp được nhiều loại acid amine, hiện nay hai acid amine chính được tổng hợp bằng vi sinh vật là acid glutamic và Lysin, các vi sinh vật thường dùng là *Brevibacterium*, *Micrococcus*, *Microbacterium*,...

+Quá trình cố định N₂

Quá trình cố định N₂ có ý nghĩa rất quan trọng đối với sản xuất nông nghiệp, trong không khí mỗi ha đất có khoảng 80000 tấn N₂, nhưng người, gia súc và cây trồng đều không có khả năng sử dụng nguồn N₂ này do liên kết trong phân tử quá chặt chẽ bởi ba liên kết, để chế tạo ra các phân bón hữu cơ cần có điều kiện kỹ thuật phức tạp (t⁰ cao, áp suất lớn, chất xúc tác đắt tiền) trong khi đó một số vi sinh vật có khả năng đồng hóa rất dễ dàng và thường xuyên người ta gọi chúng là những vi sinh vật cố định N₂.

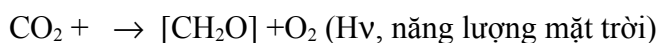
Các vi khuẩn có khả năng cố định N₂ như: *Azotobacter* (tổng 1g đường thì vi khuẩn có khả năng cố định 518 g N). *Clostridium* sống trong đất ẩm có khả năng cố định N₂ không khí, vi khuẩn lam sống cộng sinh cố định N₂, vi khuẩn nốt sần cây họ đậu (*Rhizobium*)

4.3.2. Tổng hợp các hợp chất hữu cơ không chứa Nitơ

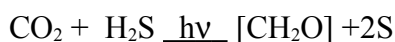
Ngoài quá trình phân giải các hợp chất hữu cơ phức tạp thành các hợp chất đơn giản, trong tự nhiên còn có nhiều loại vi sinh vật có thể nhờ năng lượng mặt trời tiến hành tổng hợp các hợp chất hữu cơ không có Nitơ từ H₂S và CO₂ trong không khí. Chúng thuộc loại vi sinh vật tự dưỡng quang năng.

Một số vi sinh vật có chứa sắc tố quang hợp. Chúng có khả năng chuyển hoá năng lượng của ánh sáng mặt trời thành năng lượng hoá học tích lũy trong dây nối cao năng của ATP.

Quá trình quang hợp của cây xanh có thể tóm tắt như sau:



Tảo lam quang hợp gần giống cây xanh, vi khuẩn lưu huỳnh màu lục hoặc vi khuẩn lưu huỳnh màu tía quá trình quang hợp khác với cây xanh. Nếu ở cây xanh nguồn H là từ H₂O thì ở vi khuẩn nguồn H là từ H₂S có thể tóm tắt quá trình quang hợp của vi khuẩn như sau:



Bacterio chlorophile

IV. SỰ PHÁT TRIỂN CỦA VI KHUẨN

4.1. Sinh trưởng, sinh sản và phát triển của vi khuẩn

Sinh trưởng và phát triển là thuộc tính cơ bản của mọi sinh vật, cũng như động vật và thực vật, vi sinh vật cũng sinh trưởng và phát triển. Sinh trưởng là sự tăng kích thước và khối lượng của tế bào, còn sự phát triển (hoặc sinh sản) là sự tăng sinh số lượng tế bào.

Tuy nhiên sự tăng số lượng tế bào không phải bao giờ cũng diễn ra song song với sự tăng sinh khối. Chẳng hạn khi chất dinh dưỡng trong môi trường đã cạn, vi khuẩn tuy còn phân chia 1-2 lần nhưng cho 2-4 tế bào nhỏ hơn tế bào bình thường, trong pha mở đầu sinh khối tế bào vi khuẩn tăng lên nhưng số lượng tế bào không thay đổi, ngược lại pha logarit kích thước tế bào giảm đi nhưng số tế bào lại tăng lên.

Ở vi sinh vật khi nói đến sinh trưởng là nói đến sự sinh trưởng của cả quần thể.

4.2. Phương pháp nghiên cứu sự phát triển của vi khuẩn

4.2.1. Nuôi cấy vi khuẩn

a, Phân loại môi trường nuôi cấy vi khuẩn

Căn cứ vào nguồn gốc, tính chất mà có nhiều cách phân loại môi trường nuôi cấy vi khuẩn khác nhau.

1. **Căn cứ vào nguồn gốc của môi trường:** người ta chia môi trường nuôi cấy vi khuẩn ra làm 2 loại:

1.1. Môi trường nuôi cấy có nguồn gốc tự nhiên

Môi trường thuộc nhóm này được phân lập dựa trên kinh nghiệm hơn là dựa vào sự hiểu biết về thành phần dinh dưỡng đối với vi khuẩn nuôi cấy. Các môi trường tự nhiên được dùng phổ biến là: nước báng, nước trích thịt bò, nước trích các loại rau, củ,... Các loại môi trường này thường chứa nhiều chất hữu cơ và vô cơ tan trong nước, có thể đáp ứng nhu cầu về sự phát triển của vi khuẩn. Môi trường tự nhiên dễ chuẩn bị, vừa rẻ tiền lại có thể sử dụng cho nhiều mục đích nghiên cứu vi khuẩn.

Khuyết điểm của loại môi trường này là, không biết chính xác thành phần dinh dưỡng, cũng như thành phần dinh dưỡng của những lần chuẩn bị khác nhau sẽ không hoàn toàn giống nhau. Do đó khi nuôi cấy vi khuẩn của những lần chuẩn bị môi trường khác nhau có thể không giống nhau.

1.2. Môi trường nuôi cấy có nguồn gốc tổng hợp

Để bổ sung khuyết điểm của môi trường nuôi cấy tự nhiên, người ta đã thiết lập các môi trường nuôi cấy tổng hợp, trong đó các thành phần dinh dưỡng của môi trường được kiểm soát chặt chẽ về số lượng và chất lượng. Tùy theo nhu cầu dinh dưỡng của mỗi loại vi khuẩn mà người ta thiết lập thành phần dinh dưỡng khác nhau trong mỗi loại môi trường. Ví dụ: môi trường, MacConkey, Vinson Blai, SS (*Salmonella-Shigella*), KAI (Kligler -Iron -Agar),...

Ưu điểm của các loại môi trường nuôi cấy tổng hợp là ta có thể biết rõ ràng thành phần dinh dưỡng của môi trường, để phù hợp với mục đích nuôi cấy từng loại vi khuẩn, khi biết rõ nhu cầu dinh dưỡng của chúng.

Nhược điểm: đắt tiền, chuẩn bị phức tạp, chỉ sử dụng cho từng loài vi khuẩn thích hợp, trường hợp vi khuẩn chưa xác định, không thể nuôi cấy trên môi trường này một cách bảo đảm.

2. Căn cứ vào tính chất vật lý

Chia môi trường ra làm các loại sau: môi trường rắn (thạch Agar hoặc môi trường các chất dinh dưỡng có bổ sung thêm thạch cho dễ nuôi cấy vi khuẩn, môi trường loại này dùng kiểm tra hình thái, màu sắc, kích thước khuẩn lạc), môi trường lỏng (nước thịt pepton, để xác định tính chất làm đục, cặn, khả năng sinh màng), môi trường bán cố thể (nửa rắn, nửa lỏng) (Manitol motility-xác định tính chất di động và khả năng lên men đường mannitol).

3. Phân loại theo mục đích sử dụng: môi trường thông thường và môi trường đặc biệt.

3.1. Môi trường thông thường: là môi trường mà thành phần môi trường đơn giản và được dùng phổ biến như: nước thịt - pepton, thạch thường.

3.2. Môi trường đặc biệt: là môi trường có các chất quyết định đến quá trình phát triển của vi khuẩn, nếu có mặt hay vắng mặt các thành phần này vi khuẩn không thể phát triển được.

-Môi trường tăng sinh: có các chất kích thích sự phát triển của vi khuẩn, như máu, huyết thanh, acid amine,...

-Môi trường sinh hóa: là môi trường để kiểm tra một số tính chất của vi khuẩn, như khả năng lên men đường glucose, lactose, mannitol,... khả năng sinh H₂S, sinh urea, indol, thủy phân gelatin, dung huyết,...

-Môi trường ưu tiên hay tuyển lựa: là môi trường ức chế sự phát triển của một số loại vi khuẩn, nhưng lại kích thích vi khuẩn khác phát triển. Chẳng hạn môi trường SS (*Salmonella-Shigella*) ức chế sự phát triển của vi khuẩn *E. coli*. Môi trường Wilson, Blaire ngăn cản sự phát triển của vi khuẩn Gram dương. Môi trường pepton có chứa acid phenic 5% và nuôi cấy ở 42⁰C chỉ ưu tiên cho vi khuẩn *E. coli* phát triển.

- Môi trường phân biệt: sử dụng tổng hợp cả ba loại môi trường trên để phân biệt tính chất của các loại vi khuẩn trong quá trình phân lập.

Yêu cầu của môi trường nuôi cấy vi khuẩn: Môi trường phải đảm bảo những yêu cầu vật lý (màu, trạng thái rắn, lỏng, bán lỏng), hoá học (thành phần dinh dưỡng), vi sinh vật học (đảm bảo vô trùng).

Vô trùng môi trường bằng cách hấp ở 121°C/15-20 phút. Đối với thạch sau khi hấp vô trùng để nhiệt độ 45-50°C đổ ra các đĩa Petri, môi trường lỏng sau khi hấp cho vào các ống nghiệm và bảo quản vô trùng. Đối với các loại đường dễ bị phân hủy ở nhiệt độ cao cho nên có thể sử dụng màng lọc vi khuẩn để lọc vô trùng.

b, Nuôi cấy vi khuẩn

Tùy từng loại vi khuẩn cần nuôi cấy mà yêu cầu thành phần dinh dưỡng, môi trường nuôi cấy khác nhau. Sau đây chỉ trình bày phương pháp nuôi cấy đơn giản.

Cấy vào môi trường nước thịt: dùng que cấy lấy mẫu khuấy vào môi trường ở 37°C/24 giờ quan sát màu sắc độ đục, cặn vẩn của ống nước thịt.

Phương pháp vạch trên mặt đĩa Petri:

Môi trường dinh dưỡng thích hợp cho vi sinh vật muốn nuôi cấy, thêm 2-3% thạch cho cứng dễ vạch hơn. Hấp 121°C/15 phút để nguội 45°C đổ ra đĩa Petri một lớp mỏng (khoảng 20ml/đĩa có $\phi = 8\text{cm}$).

Cách vạch để có khuẩn lạc mọc ra từ một tế bào, dùng que cấy lấy vi khuẩn sau đó vạch lên mặt thạch theo đường zig zắc theo đường cây 3 pha hay 4 pha để mô tả, phân lập thuần khiết khuẩn lạc.

Sử dụng màng lọc vi khuẩn

Dùng môi trường nuôi cấy như trên, pha loãng huyền phù vi khuẩn ra nhiều lần sao cho có khoảng 1-5 tế bào /1ml, cho qua màng lọc khoảng 5-10ml huyền phù đã pha loãng. Lấy màng lọc ra đặt lên trên mặt của đĩa thạch Petri ủ vào tủ ấm. Sau khi ủ tủ ấm 24 giờ kiểm tra hình dạng và màu sắc, số lượng của khuẩn lạc.

4.2.2. Các phương pháp định lượng vi khuẩn

Có rất nhiều phương pháp đếm số lượng vi khuẩn, tùy theo mục đích, phương tiện, tùy loài vi khuẩn mà có thể sử dụng các phương pháp khác nhau. Sau đây là một số phương pháp phổ biến.

1. Đếm trực tiếp dưới kính hiển vi

***Sử dụng buồng đếm hồng cầu (Neubauer, Thomas) để đếm tế bào vi khuẩn.**

Nguyên tắc chung: Đếm số lượng tế bào vi khuẩn có trong một đơn vị thể tích của phòng đếm, từ đó suy ra số lượng tế bào có trong 1ml dung dịch, nhân với độ pha loãng để biết số tế bào có trong dung dịch ban đầu.

Buồng đếm Neubauer: Là một phiến kính đặc biệt, trên bề mặt chia thành các ô vuông nhỏ, cạnh ô vuông nhỏ là 1/20mm, khoảng cách giữa phiến kính và lá kính 0,1 mm.

Ta nhỏ lên buồng để đếm một giọt huyền phù chứa vi khuẩn muốn đếm, đặt lá kính lại khi đó ta có thể tích mỗi ô nhỏ là: $1/10 \times 1/20 \times 1/20\text{mm}^3 = 1/4000\text{mm}^3 = \text{cm}^3$.

Gọi độ pha loãng của dung dịch vi khuẩn cần đếm là K, trung bình số vi khuẩn trên mỗi ô nhỏ là A (ta đếm vài ô lớn, sau đó lấy trung bình số vi khuẩn trên mỗi ô nhỏ), khi đó số vi khuẩn có trong 1ml dung dịch là N:

$$N = A \times 4 \times 10^6 \times (\text{số tế bào}/1\text{ml})$$

Phương pháp này cho kết quả nhanh, tuy nhiên không thể phân biệt được tế bào vi khuẩn sống và tế bào vi khuẩn chết. Hơn nữa tế bào vi khuẩn rất bé nên việc đếm dưới kính

hiển vi là không dễ dàng. (Phương pháp này chủ yếu áp dụng cho những tế bào không cần nhuộm màu).

Đếm vi khuẩn đã nhuộm: Nhỏ một thể tích nhất định của huyền phù muốn đếm lên một diện tích nhất định trên phiến kính, cố định và nhuộm màu, thường là với xanh mtylen hoặc với màu phù hợp với vi khuẩn ấy. Sau đó, đếm số lượng tế bào trên một đơn vị diện tích.

***Đếm trực tiếp theo Breed**

Lấy một phiến kính sạch đặt lên tờ giấy kẻ ô vuông, thông thường ô vuông có cạnh 1cm (diện tích mỗi ô là $S=1\text{cm}^2$). Dùng micropipet hút 0,01ml mẫu rồi quệt kín diện tích một ô ($0,01\text{ml}/1\text{cm}^2$, nếu quệt bị lem ra ngoài ô phải làm lại). Lặp lại với 4-5 ô cách rời nhau, cố định vết bôi, nhuộm màu tiêu bản (Gram, Newman-Lampert cải tiến), sau đó đếm số lượng vi khuẩn có trên một diện tích vi trường, lặp lại khoảng vài chục lần ở các vi trường khác nhau. Tính trung bình số lượng vi khuẩn có trong một vi trường hiển vi.

Cách tính: tính diện tích vi trường, dùng thước đo vật kính, thước này có chiều dài 1mm, được chia 100 phần mỗi khoảng cách tương ứng 0,01 hay $10\mu\text{m}$. Đặt thước đo lên bàn kính, điều chỉnh khoảng cách để nhìn thấy các vạch trên thước đo. Đo đường kính của vi trường hiển vi, tính diện tích vi trường theo công thức $s = \pi.r^2$.

Số lượng tế bào có trong 1ml là : $=x \cdot A \cdot x$

K là độ pha loãng, A trung bình số vi khuẩn có trong một vi trường, S là diện tích dung dịch dàn mỏng (1cm^2) s_{vt} diện tích vi trường.

2. Đếm số tế bào sống (khuẩn lạc trên đĩa thạch)

***Phương pháp pha loãng**

Dùng dung dịch cần đếm vi khuẩn pha loãng ở các độ liên tiếp nhau, theo cơ số 10, thông thường lấy vi khuẩn đã pha loãng ở ba nồng độ liên tiếp thích hợp với từng loại vi khuẩn. Đảm bảo có thể đếm được khuẩn lạc, ít nhất là có hai ống có thể nhìn thấy khuẩn lạc. Ví dụ: 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , mỗi nồng độ pha loãng lấy 0,1 ml cấy lên 2 đĩa thạch thích hợp (có thể dùng que gạt thủy tinh hay bi thủy tinh để dàn mỏng) sau đó ủ $37^\circ\text{C}/24$ giờ.

Đếm số khuẩn lạc mọc trên đĩa thạch. Sau khi có số khuẩn lạc ta tính toán như sau:

Số lượng tế bào/ml = $a \cdot x \cdot x$

a: số khuẩn lạc trung bình trên mỗi đĩa thạch có cùng độ pha loãng

V: Thể tích dịch cấy trên mỗi đĩa thạch (ml)

K: độ pha loãng tương ứng của dịch được cấy.

Phương pháp này nó cho phép đếm được số tế bào sống có trong 1ml dung dịch.

***Sử dụng màng lọc vi khuẩn**

Trường hợp dung dịch cần đếm có mật độ vi khuẩn thấp như kiểm tra vi khuẩn có trong bia, các loại nước uống. Cho một lượng lớn dung dịch cần kiểm tra qua màng lọc sau đó đặt màng lọc lên nuôi cấy trên đĩa thạch, căn cứ vào lượng dung dịch đem lọc và số khuẩn lạc trên mỗi màng lọc ta suy ra số lượng vi khuẩn có trong một đơn vị thể tích.

Phương pháp này cho chúng ta kết quả gần đúng, chứ không cho số chính xác. Phương pháp này cho phép đếm số tế bào sống, không đếm được tế bào chết sai số thường lớn, do đó phải thực hiện hai ba lần và lấy trị số trung bình, để giảm bớt sai số.

3. Phương pháp đo độ đục của huyền phù vi khuẩn

***Đo bằng quang phổ kế**

Nguyên tắc: Dùng chùm tia sáng đơn sắc chiếu xuyên qua huyền phù chứa vi sinh vật muốn đo, vi sinh vật làm phân tán bớt chùm tia sáng nhiều hoặc ít tùy thuộc vào số lượng của chúng trong huyền phù. Số tia sáng còn lại khi xuyên qua huyền phù sẽ kích thích một tế bào quang điện. Tùy theo cường độ còn lại của chùm tia sáng mà tế bào quang điện nhận được,

một cây kim di động và chỉ số phần trăm tia sáng bị phân tán trên bảng chỉ thị (phương pháp này cho ta biết số lượng vi khuẩn chết và sống).

Nếu dịch đem đếm không chứa vi sinh vật nào cả thì tất cả ánh sáng xuyên qua và kích thích tế bào quang điện tối đa, ta điều chỉnh cho kim chỉ ở số 100. Đưa huyền phù cần đo vào. Vì có một số vi sinh vật trong huyền phù nên một số tia sáng bị phân tán đi. Chỉ còn lại một số ít xuyên qua được, so sánh với bảng chuẩn sẽ biết được mật số trong huyền phù. Chỉ tiến hành đo độ đục các mẫu mà ở đó vi sinh vật sinh trưởng làm đục đồng đều môi trường nuôi cấy, không tạo thành váng, khối. Chúng ta có thể áp dụng phương pháp này đối chiếu với phương pháp đếm trực tiếp để lập một bảng chuẩn cho từng loại vi sinh vật. Ngày nay trên cơ sở nguyên lý này người ta chế tạo ra các loại máy quang phổ kế khác nhau.

***Dùng máy đếm điện tử:** với máy đếm loại này có thể đếm hàng ngàn tế bào trong vòng vài giây. Nguyên tắc là vi sinh vật được đưa qua tia sáng của mắt điện tử, vi sinh vật cản tia sáng và ghi dấu hiệu trên bộ đếm của máy.

***Sử dụng ống nghiệm có độ đục khác nhau (dãy ống Macfaland)**

Nguyên tắc: dãy ống nghiệm chứa BaSO₄ ở các độ pha loãng khác nhau tương ứng với độ pha loãng có bảng đối chiếu nồng độ vi khuẩn tương ứng. Đối chiếu độ đục ống nghiệm với dãy ống MacFaland sau đó đối chiếu bảng ta sẽ biết được nồng độ vi khuẩn tương ứng.

Cách làm: dùng 10 ống nghiệm sạch, trong, có kích thước bằng nhau. Cho BaCl₂ 1% vào từng ống theo thứ tự từ một đến 10 (ống 1: 0,1ml ống 2: 0,2ml và cứ như thế ống 10: 1ml, mỗi ống hơn nhau 0,1 ml).

Sau đó cho vào mỗi ống vừa đủ 10ml dung dịch H₂SO₄ 1% hàn miệng ống nghiệm lại.

Lấy ống nghiệm chứa vi khuẩn cần so màu cho vào máy li tâm, gạn rửa, sau đó cho nước sinh lý vào tiếp tục li tâm, gạn rửa 2-3 lần. Cuối cùng cho nước sinh lý vào một lượng ngang với lượng dung dịch nuôi cấy. Đặt ống nghiệm chứa vi khuẩn đã gạn rửa, vào giữa hai ống MacFacland áng chừng có màu tương tự. Số lượng vi khuẩn có trong một ml dung dịch sẽ nằm trong khoảng 2 mức chuẩn của ống Macfaclan.

Bảng so màu đánh giá số lượng vi khuẩn theo MacFaland

Số TT	Số vi khuẩn/ml (triệu)	Số TT	Số vi khuẩn/ml (triệu)
1	300	6	1800
2	600	7	2100
3	900	8	2400
4	1200	9	2700
5	1500	10	3000

4.3. Lý thuyết về sự phát triển của vi khuẩn:

Tế bào vi khuẩn khi được nuôi cấy vào môi trường dinh dưỡng thích hợp, vi khuẩn sẽ sinh trưởng, tăng khối lượng và thể tích, tổng hợp các thành phần tế bào cho đến khi kích thước lớn gấp đôi. Vi khuẩn phân chia cho hai tế bào. Hai tế bào này, lại tiếp tục sinh trưởng và phân chia thành 4, rồi 8, 16 tế bào.

Nếu số tế bào ban đầu không phải là 1 mà là N₀ thì sau n lần phân chia ta sẽ có số tế bào tổng cộng là N:

$$N = N_0 \times 2^n(1)$$

Các giá trị N và N₀ có thể xác định nhờ phòng đếm hoặc tính số khuẩn lạc mọc trên môi trường đặc. Còn giá trị n (số thế hệ) có thể tính nhờ logarit thập phân:

$$\log N = \log N_0 + n \cdot \log 2. \text{ Từ đó rút ra: } n = \frac{\log N - \log N_0}{\log 2} \quad (2)$$

Ví dụ: vi khuẩn phân chia n lần sau thời gian t, khoảng thời gian giữa hai lần phân chia liên tiếp (hay thời gian cần thiết để vi khuẩn tăng đôi tế bào) gọi là thời gian thế hệ và biểu thị bằng g:

$$g = \frac{t}{n} \quad (3)$$

Ở đây t₂-t₁ biểu thị sự sai khác giữa thời gian đầu và thời gian cuối tính bằng giờ trong đó số tế bào được xác định. Giá trị đảo nghịch của thời gian thế hệ hay là số lần phân chia sau một đơn vị thời gian (giờ) gọi là hằng số tốc độ phân chia C.

$$C = \frac{1}{g} \quad (4)$$

Rõ ràng thời gian thế hệ càng ngắn, vi khuẩn sinh trưởng và sinh sản càng nhanh vì: C=n/t nên n=C.t. Thay giá trị của n vào phương trình (1) ta có:

$$N = N_0 \times 2^{Ct}$$

Hằng số tốc độ phân chia phụ thuộc vào loài vi khuẩn, nhiệt độ nuôi cấy và môi trường nuôi cấy.

-Loài vi khuẩn: ví dụ ở 37 °C đối với *E. coli* C = 3 và *Mycobacterium tuberculosis* C=0.07.

-Ảnh hưởng nhiệt độ: ví dụ nuôi cấy vi khuẩn *E. coli* trong môi trường nước thịt.

Tuy nhiên đối với một cơ chất đã cho hằng số tốc độ phân chia không phụ thuộc vào nồng độ trong một giới hạn rộng. Chẳng hạn khi nuôi cấy *Bacillus subtilis* trong môi trường chứa glucose dù cho nồng độ 0.3g/lit hay 50g/l ta vẫn có C= 0.8.

-Ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy.

Vi khuẩn	Môi trường	Tốc độ phân chia (C)
<i>Bacillus subtilis</i>	Nước thịt	2
	Khoáng -gluco	0.8
	Khoáng -citrat	0.3
	Khoáng-gluco-citrat	1,2

Nhiệt độ (O°)	Thời gian thế hệ (phút)	Hằng số tốc độ phân chia
18	120	0.5
22	60	1
30	30	2
37	20	3
43	-	-

4.4. Biểu đồ phát triển của vi khuẩn

4.4.1. Sinh trưởng và phát triển của vi khuẩn trong điều kiện nuôi cấy tĩnh[5]

Nếu theo dõi sinh trưởng và phát triển của vi khuẩn trong điều kiện phòng thí nghiệm, người ta nhận thấy số lượng của chúng tăng lên nhanh chóng. Điều này dễ hiểu vì với điều kiện thích hợp thời gian thế hệ của nhiều loài vi khuẩn chỉ khoảng 30 phút. Rõ ràng các quá trình sinh tổng hợp cũng như quá trình dị hoá, nhằm cung cấp năng lượng, nguyên liệu cho các phản ứng tổng hợp diễn ra trong tế bào với tốc độ rất nhanh, hoàn toàn không thấy ở các sinh vật khác.

Phương pháp nuôi cấy mà trong suốt thời gian đó ta không thêm vào đó chất dinh dưỡng cũng không loại bỏ đi các sản phẩm trao đổi chất cuối cùng gọi là nuôi cấy tĩnh, sự phát triển của vi khuẩn khi nuôi cấy tĩnh diễn ra qua 4 pha:

***Pha lag:** pha này tính từ lúc bắt đầu nuôi cấy cho đến khi vi khuẩn đạt được tốc độ sinh trưởng cực đại. Trong pha lag vi khuẩn chưa phân chia (nghĩa là chưa có khả năng sinh sản), có thể đây là giai đoạn vi sinh vật làm quen với môi trường nuôi cấy mới và chuẩn bị cho sự tăng trưởng vượt bậc sau đó. Thể tích và khối lượng tế bào tăng lên rõ rệt do quá trình tổng hợp các chất, trước hết là các cao phân tử (protein, enzyme, acid nucleic,...) diễn ra mạnh mẽ. Chẳng hạn một số enzyme cần cho quá trình tổng hợp thuộc các endoenzyme loại proteinase, amylase, và các enzyme nằm trong quá trình chuyển hóa glucide, đều được hình thành trong pha này. Độ dài của pha này phụ thuộc vào tuổi của ống giống và thành phần của môi trường. Chẳng hạn pha lag sẽ không có nếu chúng ta dùng ống giống gồm các tế bào ở pha sinh trưởng logarit và cấy chúng vào cùng một môi trường dưới những điều kiện nuôi cấy như nhau. Trái lại nếu ta cấy các tế bào ở pha ổn định vào một môi trường và điều kiện nuôi cấy như nhau thì vẫn có pha lag. Thường tế bào giống càng già thì pha lag càng dài. Như vậy pha lag phụ thuộc vào những yếu tố sau: tuổi giống, lượng cây giống và thành phần của môi trường.

***Pha logarit:** Trong pha này vi khuẩn sinh trưởng và phát triển theo lũy thừa, nghĩa là sinh khối và số lượng tế bào tăng theo phương trình: $N = N_0 \times 2^{ct}$, kích thước tế bào thành phần dinh dưỡng, hoạt tính sinh lý, nói chung không thay đổi theo thời gian. Tế bào ở trạng thái động học và được coi như là những tế bào tiêu chuẩn.

***Pha ổn định:** trong pha này quần thể vi khuẩn ở trạng thái cân bằng động học, đa số tế bào mới sinh ra bằng số tế bào cũ chết đi. Kết quả cả tế bào và cả sinh khối không tăng cũng không giảm. Tốc độ sinh trưởng bây giờ phụ thuộc vào nồng độ cơ chất. Cho nên khi giảm nồng độ cơ chất (trước khi cơ chất bị cạn hoàn toàn) tốc độ sinh trưởng của vi khuẩn cũng giảm. Nguyên nhân tồn tại của pha ổn định là do sự tích lũy các sản phẩm độc của trao đổi chất (rượu acid hữu cơ) và việc cạn chất dinh dưỡng.

***Pha tử vong:** trong pha này số lượng tế bào có khả năng sống giảm theo lũy thừa (mặc dù số lượng tế bào tổng cộng có thể không giảm). Đôi khi các tế bào tự phân nhờ các enzyme của bản thân. ở các vi khuẩn sinh bào tử thì giai đoạn này phức tạp hơn do quá trình hình thành bào tử.

Ứng dụng biểu đồ phát triển của vi khuẩn vào quá trình bảo quản vi sinh vật.

+Cấy chuyển thường xuyên trên thạch nghiêng hay cấy trích sâu vào thạch, sau khi đã sinh trưởng vi khuẩn được giữ trong tủ lạnh +4°C, phương pháp này thường dùng nhưng kém hiệu quả.

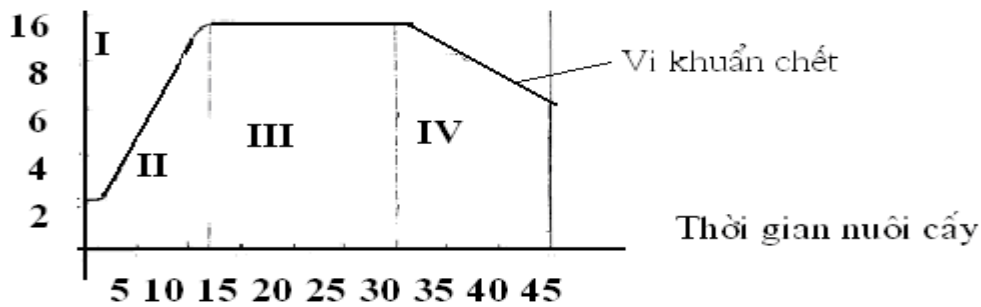
+Bảo quản dưới dầu vô trùng: Dầu parafin vừa ngăn cản môi trường khô vừa ngăn cản trao đổi chất do cản trở sự xâm nhập của oxi.

+Bảo quản trong cát hoặc đất sét vô trùng: do cấu trúc lý hoá của cát đất sét rất phù hợp cho việc mang các vi sinh vật, chủ yếu là các bào tử, sau khi làm khô đất sét, cát cùng với vi khuẩn có thể bảo quản tế bào rất lâu.

+Đông khô: là phương pháp hoàn thiện và có hiệu quả nhất. Vi khuẩn được trộn với môi trường thích hợp (sữa, huyết thanh,...) rồi làm lạnh và làm khô nhờ băng khô, sau mấy năm bảo quản tế bào vẫn có khả năng sống mà không bị biến đổi về mặt di truyền.

+Bảo quản trong glycerin (10%) và giữ trong tủ lạnh sâu (-60, -80) đây là phương pháp thích hợp.

Biểu đồ phát triển của vi khuẩn trong điều kiện nuôi cấy tĩnh (logarit) số lượng vi khuẩn

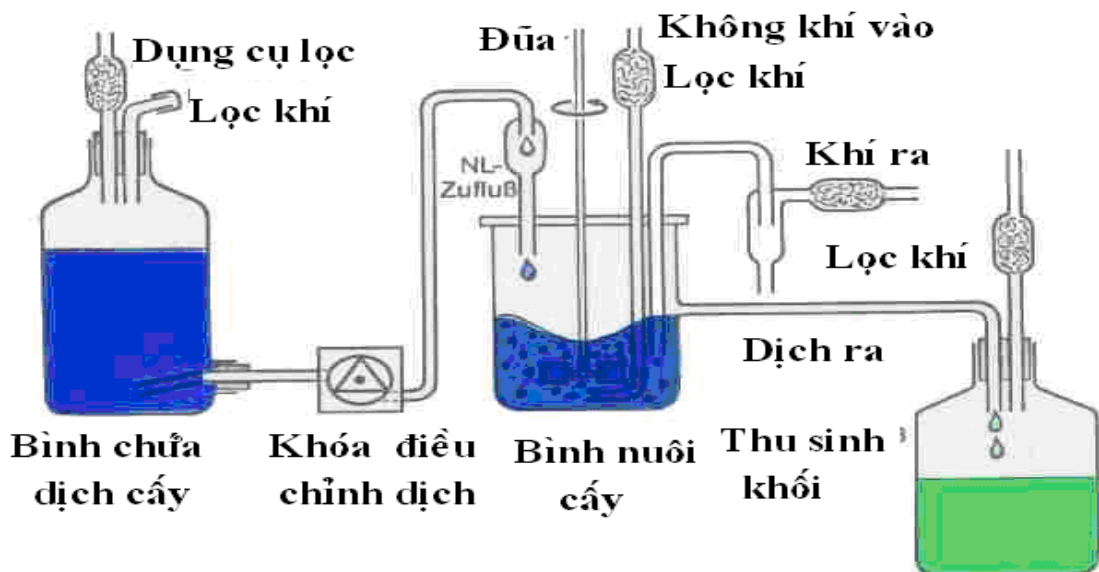


Pha lag (I), pha log (II), pha ổn định (III), pha tử vong (IV)

Sinh trưởng và phát triển của vi khuẩn trong điều kiện nuôi cấy liên tục

Trong điều kiện nuôi cấy liên tục, kéo dài thời gian sinh trưởng, tức là kéo dài pha thứ III. Muốn làm được như vậy người ta bố trí, hệ thống nuôi cấy gồm một hệ thống bình cấy, phía trên nối với dung dịch nuôi cấy. Phía dưới nối với hệ thống thu sinh khối. Trong bình nuôi cấy có hệ thống sục khí và que khuấy. Sau một thời gian nuôi cấy người ta rút ra một lượng dung dịch vi khuẩn, sau đó cho vào bình, dịch nuôi cấy vi khuẩn, bằng lượng lấy ra. Như vậy, vi khuẩn sinh sản liên tục, phương pháp này có thể thu được sinh khối lớn.

Nuôi cấy liên tục trong Chemostat



-Câu hỏi ôn tập chương

1. Thành phần hóa học chính tham gia cấu trúc tế bào vi khuẩn.
2. Các phương thức vận chuyển chất dinh dưỡng xảy ra trong tế bào vi khuẩn.
3. Phương pháp đếm số lượng tế bào vi khuẩn bằng phương pháp đếm trực tiếp (thông qua buồng đếm hồng cầu)
4. Đếm số tế bào vi khuẩn thông qua phương pháp Breed
5. Đếm số lượng tế bào vi khuẩn bằng phương pháp đếm gián tiếp (phương pháp pha loãng)
6. Vẽ và giải thích đồ thị phát triển của vi khuẩn trong điều kiện nuôi cấy tĩnh hệ thống kín.
7. Giải thích sự phát triển của vi khuẩn trong điều kiện nuôi cấy liên tục.

-Tài liệu tham khảo:

1. W.D.PHILIPPS-T.J.CHILTON, người dịch Nguyễn Bá (1997). Nhà xuất bản giáo dục.
2. Nguyễn Lâm Dũng, Nguyễn Đình Quyển, Phạm Văn Ty (2000). Nhà xuất bản giáo dục Hà Nội.
3. Vũ Thị Minh Đức (2001). Thực tập vi sinh vật học. Nhà xuất bản Đại Học Quốc Gia Hà Nội.
4. Phạm Thành Hồ (2002). Sinh học đại cương. Nhà xuất bản Đại học quốc gia thành phố Hồ Chí Minh.
5. Biên Văn Minh, Phạm Văn Ty, Kiều Hữu ảnh, Phạm Hồng Sơn, Phạm Ngọc Lan, Nguyễn Thị Thu Thủy (2006). Giáo trình vi sinh vật học. Nhà xuất bản Đại học Huế.

-Giải thích thuật ngữ:

Petri: tên nhà khoa học phát minh ra hộp đĩa lòng dẹt trong nuôi cấy vi khuẩn.

Permease: protein làm nhiệm vụ vận chuyển chất qua màng

Glycoprotein: phức protein liên kết với oligo hoặc polysacarit

Glycogyl hóa: sự gắn đường vào protein

Macfaclan: dãy ống nghiệm chứa $BaSO_4$ ở các nồng độ khác nhau, người ta đã tính toán số lượng vi khuẩn tương ứng mỗi độ đục. Dùng Macfaclan để định lượng số vi khuẩn có trong dung dịch.

CHƯƠNG IV-VIRUS HỌC (8 tiết)

Giảng viên: BSTY. Nguyễn Xuân Hòa-TS. Phạm Hồng Sơn

Nội dung chương: Chương virus học được viết tóm tắt trong 26 trang phục vụ cho 8 tiết giảng với các nội dung cơ bản như: giới thiệu về lịch sử phát triển của virus học, các đặc trưng cơ bản của virus, các dạng hình thái và cấu trúc một số dạng điển hình của virus. Virus là vi sinh vật cấu trúc chỉ gồm acid nucleic (AND hoặc ARN) và vỏ bọc protein. Mỗi dạng cấu trúc khác nhau của virus có sự khác nhau trong quá trình tái tạo chính vì thế trong chương này trình bày khá kỹ quá trình tái tạo của các nhóm virus điển hình.

Mục tiêu: Để có thể nghiên cứu sâu về virus và ảnh hưởng của chúng đối với đời sống con người và súc vật từ đó có cách phòng trị thích hợp, trước tiên người học cần nắm vững những đặc trưng cơ bản nhất, căn cứ vào hình thái phân biệt được một số dạng điển hình, hiểu về nguyên lý tái tạo của những nhóm virus có acidnucleic khác nhau.

I. SƠ YẾU VỀ LỊCH SỬ PHÁT TRIỂN CỦA VIRUS HỌC [1]

Khoảng 1500 năm trước công nguyên, vào đời vua Ai Cập thứ 18 đã có những bằng chứng về bệnh bại liệt. Nhà triết học cổ Hi Lạp Aristotle (384-322 trước công nguyên). Đã miêu tả các triệu chứng của bệnh dại. Khoảng 2-3 thế kỷ trước công nguyên người Trung Hoa và người Ấn Độ đã miêu tả về bệnh đậu mùa. Tất nhiên khi đó con người chưa biết được nguyên nhân gây ra các bệnh hiểm nghèo này.

Năm 1886 A. Mayer (người Đức) lần đầu tiên phát hiện thấy bệnh khảm ở lá cây thuốc lá và chứng minh đó là một bệnh truyền nhiễm.

Năm 1892 nhà sinh lý học thực vật trẻ tuổi D. I. Ivanoskii, người Nga bắt tay vào việc nghiên cứu mầm bệnh khảm ở thuốc lá. Ông chứng minh được rằng mầm bệnh này nhỏ hơn vi khuẩn, vì nó có thể chui qua các nén lọc vi khuẩn bằng sứ và không quan sát được bằng kính hiển vi quang học. Khi nuôi cấy trên môi trường nuôi cấy vi khuẩn chúng không mọc được nhưng nếu cấy vào các cây thuốc lá khỏe thì cây khỏe bị mắc bệnh. Từ kết quả trên ông kết luận có một loại vi sinh vật rất nhỏ đã gây bệnh cho cây thuốc lá và ông gọi chúng là vi khuẩn cực tiểu hay độc tố của vi khuẩn.

Sáu năm sau, năm 1898 nhà vi sinh vật học Hà Lan M.W. Beijerinck (1851-1931) cũng nghiên cứu một cách độc lập mầm bệnh của bệnh khảm thuốc lá và ông cho rằng đó là một chất dịch có hoạt tính truyền nhiễm ông dùng tiếng Latin là virus (mầm độc) để gọi mầm bệnh này. Ông kết luận:

1. Bệnh đốm thuốc lá không phải do vi khuẩn gây ra mà do "chất dịch có hoạt tính truyền nhiễm". Ông dùng tiếng Latin là Virus (mầm độc) để gọi mầm bệnh này. Thuật ngữ virus có từ bây giờ.

2. Virus qua lọc chỉ sản sinh trong mô sống của thực vật.

3. Có thể diệt virus bằng cách đun sôi. Tuy nhiên nếu chỉ sấy khô thì tính độc vẫn còn.

Cũng chính vào năm ấy hai nhà bác học Đức F. Loeffler và F. Frosch lần đầu tiên đã phát hiện ra virus gây bệnh lở mồm long móng ở gia súc có sừng.

Năm 1901, các bác sĩ quân y người Anh đã phát hiện ra virus gây bệnh sốt vàng ở người.

Về sau chỉ trong một thời gian ngắn, các nhà bác học đã liên tiếp phát hiện ra hàng chục virus gây bệnh cho người và gia súc.

Mãi đến năm 1939 chiếc kính hiển vi điện tử ra đời và cũng từ mốc thời gian này, loài người mới nhìn thấy hình dạng của virus. Virus đầu tiên quan sát được là virus khảm thuốc lá. Từ đó ngành virus học đã phát triển hết sức nhanh chóng, đến nay đã trở thành ngành khoa học hoàn chỉnh.

Do sự phát triển trong nghiên cứu về virus, từ trước đến nay đã có khá nhiều định nghĩa khác nhau về virus, song định nghĩa đầy đủ nhất là của Giáo sư Chu Phúc Đán (Đại Học Phúc Đán Trung Quốc). Định nghĩa virus như sau:

"Virus là một loại sinh vật phi tế bào, siêu hiển vi, mỗi loại virus chỉ chứa một loại acid nucleic. Chúng chỉ có thể ký sinh bắt buộc trong các cơ thể sống, dựa vào sự hiệp trợ của hệ thống trao đổi chất của vật chủ mà sao chép acid nucleic, tổng hợp các thành phần như protein,...sau đó tiến hành lắp nối để sinh sản; trong điều kiện ngoài cơ thể, chúng có thể tồn tại lâu dài ở trạng thái đại phân tử hóa học, không sống và có hoạt tính truyền nhiễm".

Người ta đã phát hiện được 1671 loài virus của côn trùng (1990), 931 loài virus của động vật có xương sống, 300 loài virus của người (1984), 100 loài virus trên nấm, và trên 2850 loài và chủng thực khuẩn thể (1987).

II. NHỮNG ĐẶC TRƯNG CỦA VIRUS VÀ PHÂN LOẠI VIRUS [1]

2.1. Những đặc trưng của virus

Virus là những vi sinh vật chưa có cấu tạo tế bào, kích thước cực kỳ nhỏ bé, muốn thấy được chúng phải sử dụng kính hiển vi điện tử, mặc dù virus rất nhỏ bé nhưng nó có đặc trưng của vật chất sống, có thể nhân lên trong tế bào sống và gây bệnh ở hầu hết các loài sinh vật.

Virus có các đặc tính sau:

1- Virus có kích thước vô cùng nhỏ bé từ hàng chục đến hàng trăm nm ($1\text{nm} = 10^{-3}\mu = 10 \text{ \AA}^0$).

2- Virus không có cấu tạo tế bào, chỉ là vật chất sống đơn giản chứa một loại acid nucleic (ADN hoặc ARN) và được bao bọc bằng một lớp protein, protein có tác dụng bảo vệ và giúp cho virus bám vào tế bào. Một số loại còn có áo ngoài (có nguồn gốc từ tế bào chủ).

3- Thông tin di truyền trong acid nucleic điều hành quá trình tổng hợp các thành phần cấu tạo nên virus khi virus đã xâm nhập vào trong tế bào.

4- Virus không có trao đổi chất, chỉ có thể sinh sản trong các tổ chức sống.

5- Virus ký sinh nội bào tuyệt đối, tách khỏi tế bào chủ virus không sống được, do đó còn gọi virus là vật trung gian giữa vô sinh và hữu sinh.

6- Virus có khả năng tạo thành các tinh thể.

Tùy từng lúc từng giai đoạn chức năng của virus mà nó có thể có các tên gọi khác nhau.

Virion: (hạt virus) nó là dạng virus có thành phần phân hóa học hoàn chỉnh là một virus thành thực.

Virus tái tạo: là dạng acid nucleic của virus sau khi đã xâm nhập vào tế bào cảm nhiễm, đây là dạng virus tái tạo để cho ra các virion mới.

Viroid: nó không có vỏ bọc protein có dạng sợi và có khả năng gây bệnh.

Hình thái và phân loại virus (theo Phạm Hồng Sơn. 2002)[3]

Loại virus	Họ	Nhóm, chi	Hình thái	Kích thước
Virus ADN một sợi (không có áo ngoài)	<i>Circoviridae</i>	<i>Circovirus</i>	Cầu	15-17
	<i>Pavoviridae</i>	<i>Pavovirus</i>	Hạt, hình cầu	Nhỏ nhất
<i>Densovirus</i>				
Virus ADN hai sợi (không có áo ngoài)	<i>Adenoviridae</i>	<i>Mastadenovirus</i>	Hai sợi dạng xoắn	70-90
		<i>Aviadenovirus</i>		
	<i>Papovaviridae</i>	<i>Papillomavirus, Polyomavirus</i>	Khối, 20 mặt tam giác đều	45-55
Virus ADN hai sợi có áo ngoài	<i>Poxviridae</i>	<i>Orthopoxvirus, Parapoxvirus, Avipoxvirus, Capipoxvirus, Suispoxvirus, Leporipoxvirus, Moluscipoxvirus, Yatapoxvirus; +Entomopoxvirinae: A, B, C,</i>	Thoi, viên gạch.	220 - 450 x 140
		<i>Alphaherpesvirinae, Betaherpesvirinae, Gamaherpesvirinae,</i> hơn 90 loài đã biết đến	Phức tạp, trung tâm có lõi	
	<i>Baculoviridae</i>	<i>Granulovirus, Nucleopolyhedrovirus, Baculovirus</i>	Chưa rõ	50-70 x 240-420
Các virus có enzyme phiên ngược.	<i>HepaADNviridae</i>	HepaADNvirus: <i>+OrthohepaADNvirus, +AvihepaADNvirus</i>	Cầu	40-42
	<i>Retroviridae</i>	Retrovirus <i>+Oncovirus, +Retrovirus, +Retrovirus type D, +Retrovirus type HTV/BLV, +Sspumavirus, +Lentivirus,</i>	Cầu	80-130

Các virus ARN một sợi âm (có áo ngoài)	<i>Orthomyxoviridae</i>	<i>Influenza virus A,B; Influenza virus C</i>	Cầu	80-120
	<i>Paramyxoviridae</i>	<i>Respirovirus, Rubulavirus, Henipavirus, Morbillivirus; Pneumovirus</i> và một số chưa phân loại	Cầu, que, sợi	150-300
	<i>Bunyaviridae</i>	<i>Bunyavirus, Phlebovirus, Nairovirus, Hantavirus, Tospovirus</i>	Cầu	90-110
	<i>Arenaviridae</i>	1. LCM-Lassa group-Nhóm LCM-Lassa, 2. Tokabe	Cầu, vô định	110-130
	<i>Rhabdoviridae</i>	<i>Vesiculovirus, Lyssavirus, Rhabdovirus thực vật</i>	Que	45-430
	<i>Filoviridae</i>	<i>Marburgvirus, Ebolavirus, Restonvirus</i>	Sợi, que phân nhánh, ...	Ôn định 80
	<i>BoARNviridae</i>	chung với <i>Filoviridae</i> và <i>Paramyxoviridae</i>	Cầu	80-100
Các virus ARN một sợi dương có áo ngoài	<i>Coronaviridae</i>	<i>Coronavirus, Torovirus</i>	Cầu	75-160
	<i>Arteriviridae</i>		Gần hình cầu	50-72
	<i>Togaviridae</i>	<i>Alphavirus</i> có 27 loài, <i>Rubivirus (Rubellavirus, sởi đỏ)</i>	Cầu	60-70
	<i>Flaviviridae</i>	<i>Flavivirus</i> có 9 loài, <i>Pestivirus</i> có 3 loài, <i>Hepatitis C virus Group</i> (nhóm viêm gan C)	Cầu nhỏ	40-60

Virus ARN một sợi (dương) không có áo ngoài	<i>Caliciviridae</i>	<i>Calicivirus: Vesicular exanthema virus, San Miguel sea lion virus, Feline calicivirus, Canine calicivirus, Rabbit haemorrhagic disease virus</i>	Khối mặt xứng	20 đôi	35-39
	<i>Picornaviridae</i>	<i>Enterovirus, Hepatovirus, Cardiovirus, Rhinovirus, Apterovirus, và một số chưa phân loại</i>	Nhỏ mặt	20	22-30
	<i>Astroviridae</i>	<i>Astrovirus:</i>	Cầu		27-30
Virus ARN hai sợi (không có áo ngoài)	<i>Reoviridae</i>	Reoviruses: <i>Orthoreoviruses, Orbivirus, Coltivirus, Rotavirus, Aquareoviruses, Cypovirus, Phytoreovirus, Fijivirus, các virus thực vật chưa phân nhóm</i>	Đôi xứng 20 mặt đều hay cầu		60-80
	<i>BiARNviridae</i>	<i>BiARNvirus</i>	Đôi xứng 20 mặt đều		60

III. HÌNH THÁI CẤU TẠO CỦA VIRUS [4]

3.1. Hình thái của virus

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 thực có cấu trúc hoàn chỉnh. Thành phần chủ yếu của hạt virus là acid nucleic (ADN hay ARN) được bao quanh bởi một vỏ protein.

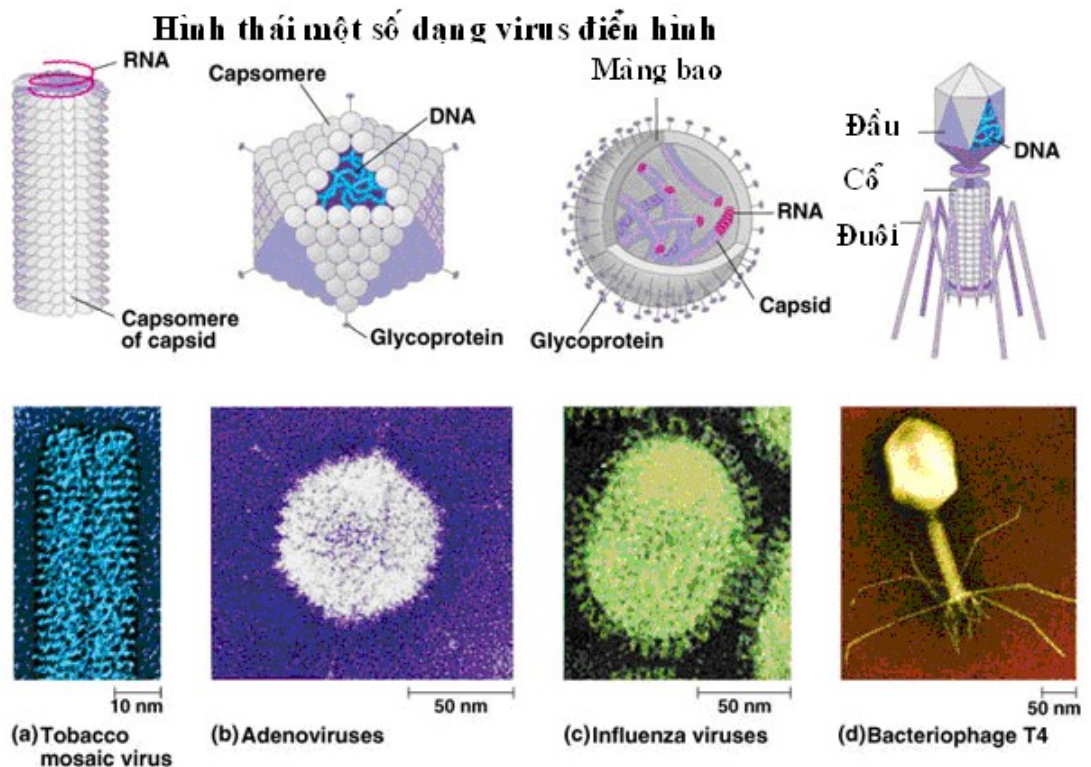
Acid nucleic nằm ở giữa hạt virus tạo thành lõi hay hệ gen của virus. Protein bao bọc bên ngoài lõi tạo thành một vỏ capsid. Capsid mang các thành phần kháng nguyên và có tác dụng bảo vệ lõi acid nucleic. Capsid cấu tạo bởi các đơn vị capsom. Lõi và vỏ hợp lại tạo thành một nucleocapsid, đó là kết cấu cơ bản của mọi virus.

Một số virus khá phức tạp, bên ngoài capsid còn có một màng bao (hay áo ngoài) cấu tạo bởi lipid hay lipoprotein. Có loại trên màng bao còn có các mấu gai bám đầy chung quanh. Màng bao thực chất là màng tế bào chất của vật chủ nhưng đã bị virus cải tạo thành và mang tính kháng nguyên đặc trưng cho virus. Màng bao có thể bị các dung môi hòa tan lipid (cồn, ether,...) phá hủy.

Hình thái virion

Để quan sát được hình thái virion phải sử dụng kính hiển vi điện tử, ta thấy virion thường có cấu trúc đối xứng xoắn, đối xứng 20 mặt hoặc đối xứng đẳng trục. Loại thứ ba là

đối xứng phức hợp, không giống các loại trên. Mỗi loại đối xứng lại phân thành loại có màng bao và loại không có màng bao.



A. Đối xứng xoắn:

*Không có màng bao:

1. Hình que: virus khảm thuốc lá (TMV)
2. Hình sợi: thể thực khuẩn f_1 , f_d , f_{13} của vi khuẩn *E. coli*

*Có màng bao:

3. Dạng uốn khúc: virus cúm (họ *Orthomyxoviridae*)
4. Dạng đạn: virus dại họ (*Rhabdoviridae*)

B. Đối xứng 20 mặt.

*Không có màng bao:

5. Dạng nhỏ: virus viêm tủy xám (họ *PicoARNviridae*)
6. Dạng lớn: virus mụn cơm (họ *Parvoviridae*)
7. Virus sởi: (họ *Togaviridae*)

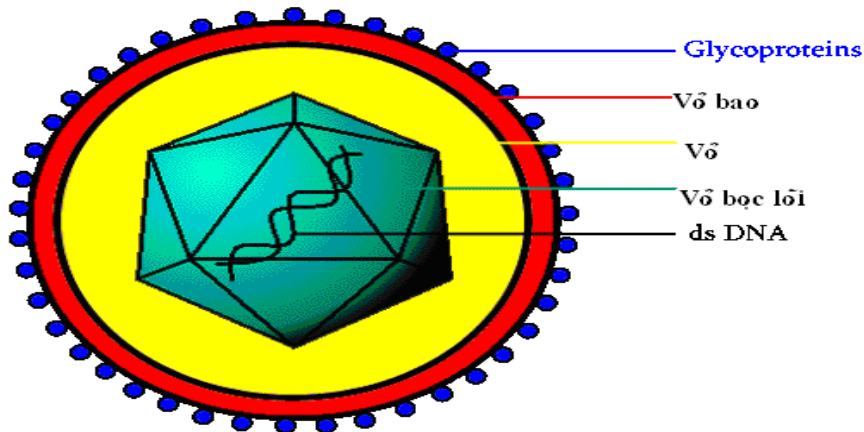
C. Đối xứng phức hợp

*Không có màng bao: thể thực khuẩn T của vi khuẩn *E. coli*

*Có màng bao: virus đậu mùa (họ *Poxviridae*)

3.2. Thành phần hóa học của virus

Cấu trúc cơ bản của virus DNA



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. Một virus thành thực có cấu trúc hoàn chỉnh. Bao gồm hai thành phần chính: hạt virus là acid nucleic (ADN hay ARN) và protein vỏ.

Acid nucleic nằm ở giữa hạt virus tạo thành lõi hay hệ gen của virus. Protein bao bọc bên ngoài lõi tạo thành một vỏ capsid. Capsid mang các thành phần kháng nguyên và có tác dụng bảo vệ lõi acid nucleic. Capsid cấu tạo bởi các đơn vị capsom. Lõi và vỏ hợp lại tạo thành một nucleocapsid, đó là kết cấu cơ bản của mọi virus.

Một số virus khá phức tạp, bên ngoài capsid còn có một màng bao cấu tạo bởi lipid hay lipoprotein. Có loại trên màng bao còn có các mấu gai bám đầy chung quanh. Màng bao thực chất là màng tế bào chất của vật chủ nhưng đã bị virus cải tạo thành và mang tính kháng nguyên đặc trưng cho virus. Màng bao có thể bị các dung môi hòa tan lipid (cồn ethe,...) phá hủy.

Acid nucleic nằm ở giữa hạt virus tạo thành một lõi hay hệ gen của virus.

Acid nucleic là cơ sở lưu giữ tái tạo mọi thông tin di truyền vì vậy nó là thành phần quan trọng của mọi virus. Virus có nhiều loại hình acid nucleic và là cơ sở phân tử đáng tin cậy để phân loại virus. Các loại hình acid nucleic được phân biệt dựa trên mấy điểm chú ý sau đây.

- Là ADN hay ARN?
- Là chuỗi đơn hay chuỗi kép ?
- Là dạng sợi hay dạng vòng?
- Là vòng kín hay vòng hở?
- Hệ gen là một thành phần, hai thành phần, ba thành phần hay nhiều thành phần? Ví dụ:

Thông tin di truyền là ADN			
Chuỗi đơn		Chuỗi kép	
Dạng sợi	Dạng vòng	Dạng sợi	Dạng vòng
<i>Papoviridae</i> (gây bệnh ban đào trẻ em)	Thể thực khuẩn, ϕ X 174, M13, fd, fl của <i>E. coli</i>	<i>Adenoviridae</i> (gây bệnh đường hô hấp), <i>Herpesviridae</i> (mụn rộp), <i>Poxviridae</i> (gây bệnh đậu, mùa)	<i>Papovaviridae</i> (mụn cơm)
Thông tin di truyền là ARN			

Chuỗi đơn	Chuỗi kép
<i>PicoARNviridae</i> , (viêm gan A), <i>Rhinovirus</i> (LMLM) <i>Caliciviridae</i> , <i>Togaviridae</i> , <i>Orthomyxoviridae</i> , <i>Rhabdoviridae</i> (dại), <i>Retroviridae</i>	<i>Bunyaviridae</i> , <i>Paramyxoviridae</i> , <i>Reoviridae</i> , tiêu chảy trẻ, virus PCV gây bệnh cho côn virus, virus gây bệnh vàng lúa, thể thực khuẩn $\phi 6$ của <i>Pseudomonas</i>

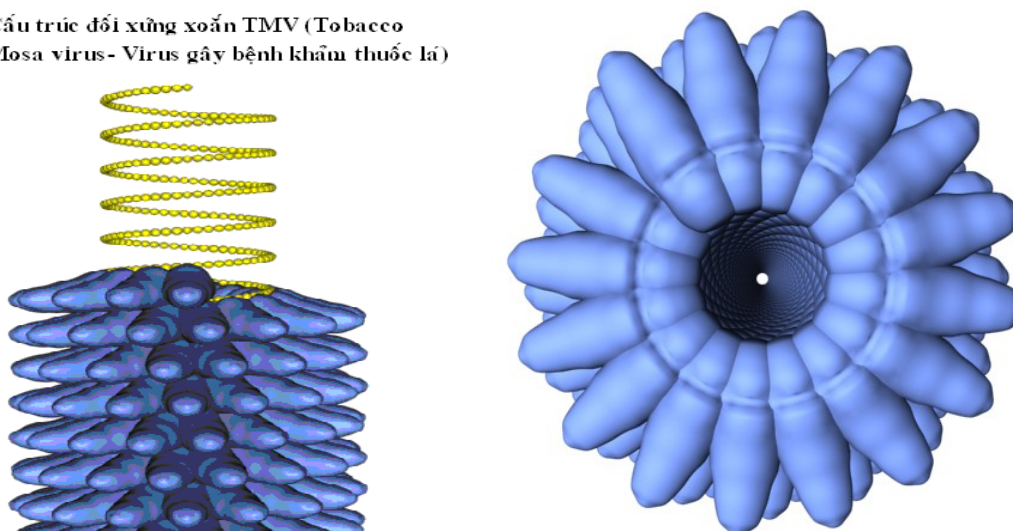
Protein bọc bên ngoài lõi tạo thành một vỏ gọi là capsid. Capsid mang các thành phần kháng nguyên và có tác dụng bảo vệ lõi acid nucleic. Capsid có cấu tạo bởi một hạt đơn vị phụ gọi là hạt capsid hay capsom. Lõi và vỏ hợp lại tạo thành một nucleocapsid, đó là kết cấu cơ bản của mọi virus.

Một số virus khá phức tạp, bên ngoài capsid còn có một màng bao có cấu tạo bởi lipid hay lipoprotein. Có lúc trên màng bao còn có các mấu gai bám đầy chung quanh. Màng bao thực chất là màng tế bào chất hoặc màng nhân của tế bào vật chủ nhưng đã bị virus cải tạo thành và mang tính kháng nguyên đặc trưng cho virus. Màng bao có thể bị các dung môi hòa tan lipid (như ete,...) phá hủy.

3.3. Cấu trúc của ba dạng hình thái điển hình của virus

3.3.1. Cấu trúc đối xứng xoắn: lấy virus gây bệnh khảm thuốc lá (TMV: *Tobacco mosa*) làm ví dụ.

Cấu trúc đối xứng xoắn TMV (Tobacco Mosa virus- Virus gây bệnh khảm thuốc lá)



Loại virus này được phát hiện sớm và nghiên cứu sâu hơn cả. TMV có hình que thẳng, dài 300 nm, rộng 15 nm, lõi rộng 4 nm. TMV chứa 95% protein và 5% chuỗi ARN đơn. Capsid chứa 2130 capsom hình chiếc giày. Mỗi capsom cấu tạo bởi 158 gốc acid amine, khối lượng phân tử 17500. Các capsom bám vào sợi ARN xoắn tròn ốc. Có cả thảy 130 vòng xoắn, mỗi vòng xoắn dài 2,3 nm, trên đó có trung bình 16,33 capsom. Sợi ARN có chứa 6390 nucleotit, khối lượng phân tử là 2×10^6 . Cứ 3 nucleotit thì kết hợp với một phân tử protein.

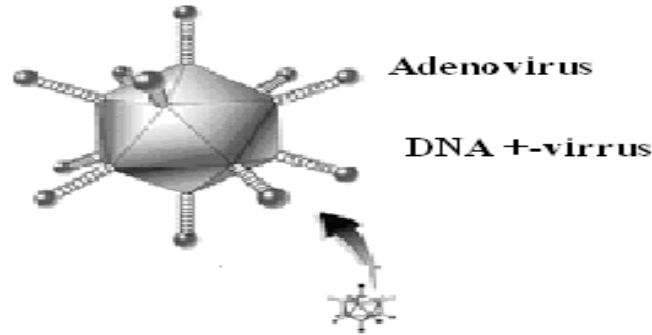
Vì TMV có vỏ protein bao bọc quanh sợi ADN xoắn ốc nên có kết cấu hết sức ổn định. Có tác giả cho biết, bảo quản ở nhiệt độ bình thường trong 50 năm TMV vẫn còn giữ được năng lực cảm nhiễm. Khi xử lý TMV bằng kiềm yếu ở pH =10,5 thì TMV bị phân ra thành những đoạn protein và ARN riêng ra. Mỗi đoạn protein này chỉ chứa vài capsom. Nếu hạ pH xuống 5 ngay khi không có ARN, các capsom này gắn lại với nhau tạo thành vỏ capsid giống hệt như cũ. Nếu có ARN thì chúng gắn lại với nhau như ban đầu để tạo thành một virus TMV hoàn chỉnh, có độ dài xác định.

TMV gây tổn thất đáng kể ở thuốc lá, đậu đỗ và một số cây trồng khác. Gần đây người ta đã nghiên cứu tới các loại vaccin TMV để phòng bệnh cho cả cà và khoai tây,...

3.3.2. Đối xứng 20 mặt

Lấy virus *Adenovirus* làm ví dụ. Đó là một loại virus gây bệnh cho người và động vật được phân lập năm 1953. Chúng xâm nhiễm vào đường hô hấp, kết mạc mắt, các tổ chức lympho gây viêm. Từ thập kỷ 80 người ta đã biết có tới 80 loại *Adenovirus*, vật chủ tự nhiên là người, trâu bò, chó, khỉ, chuột, chim, ếch, nhái.

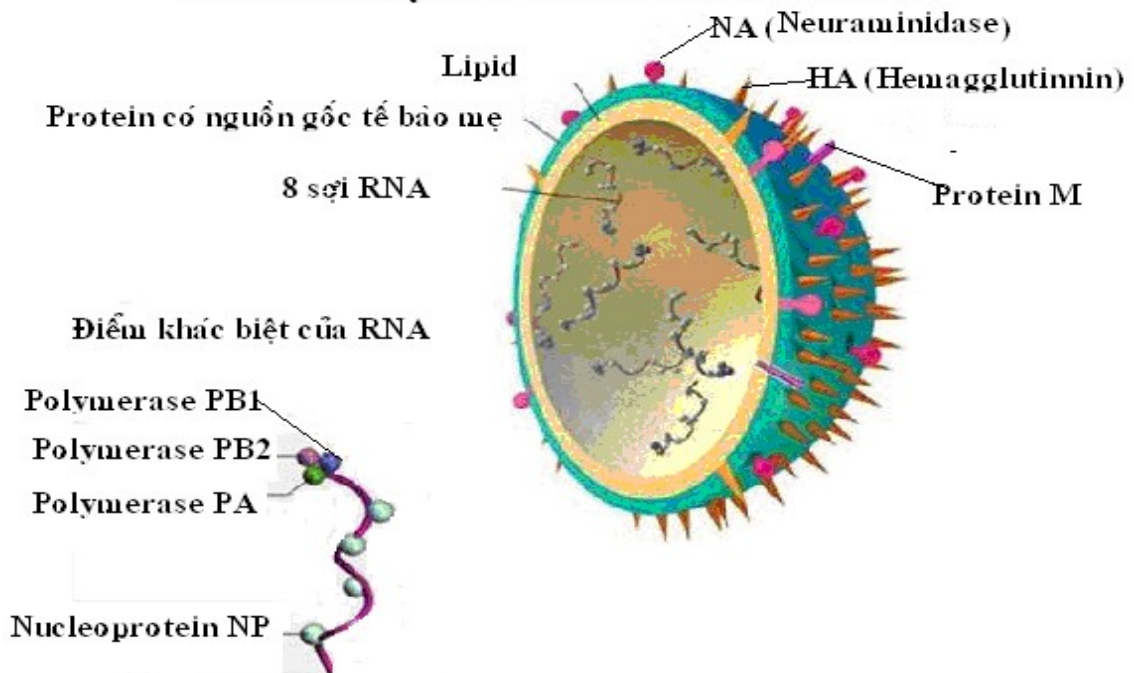
Dạng virus hình cầu đối xứng 20 mặt

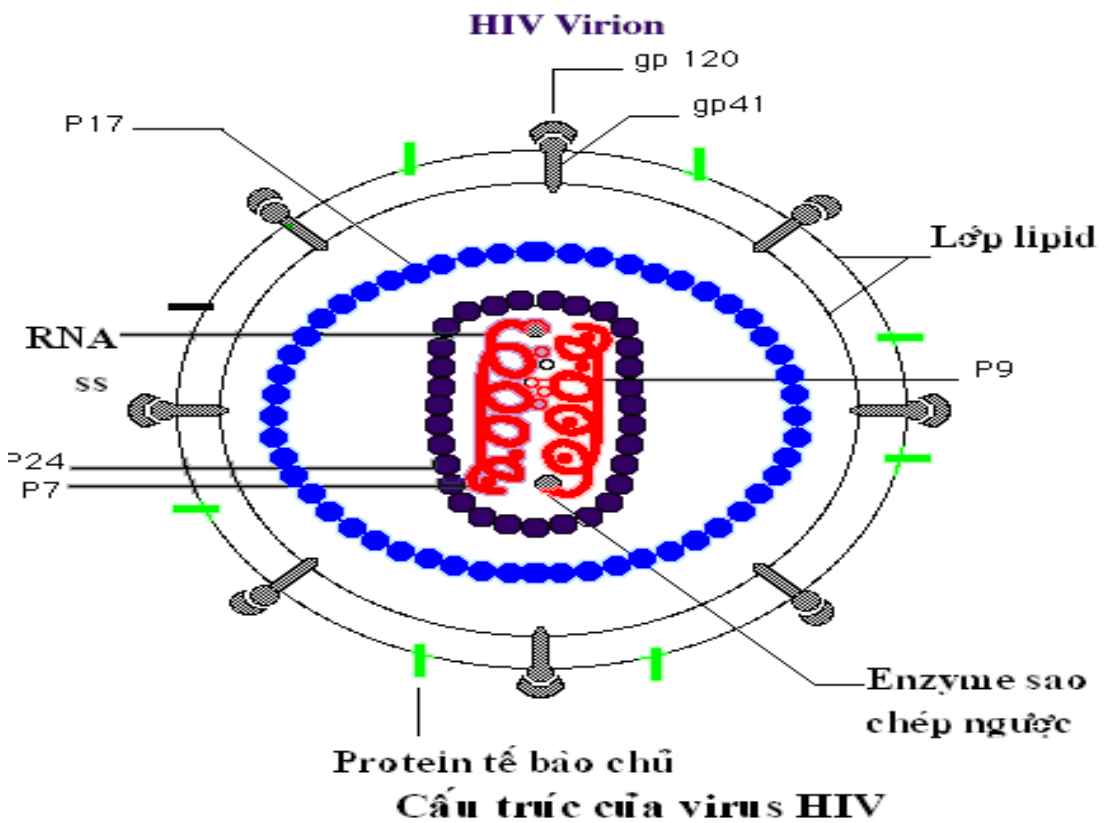
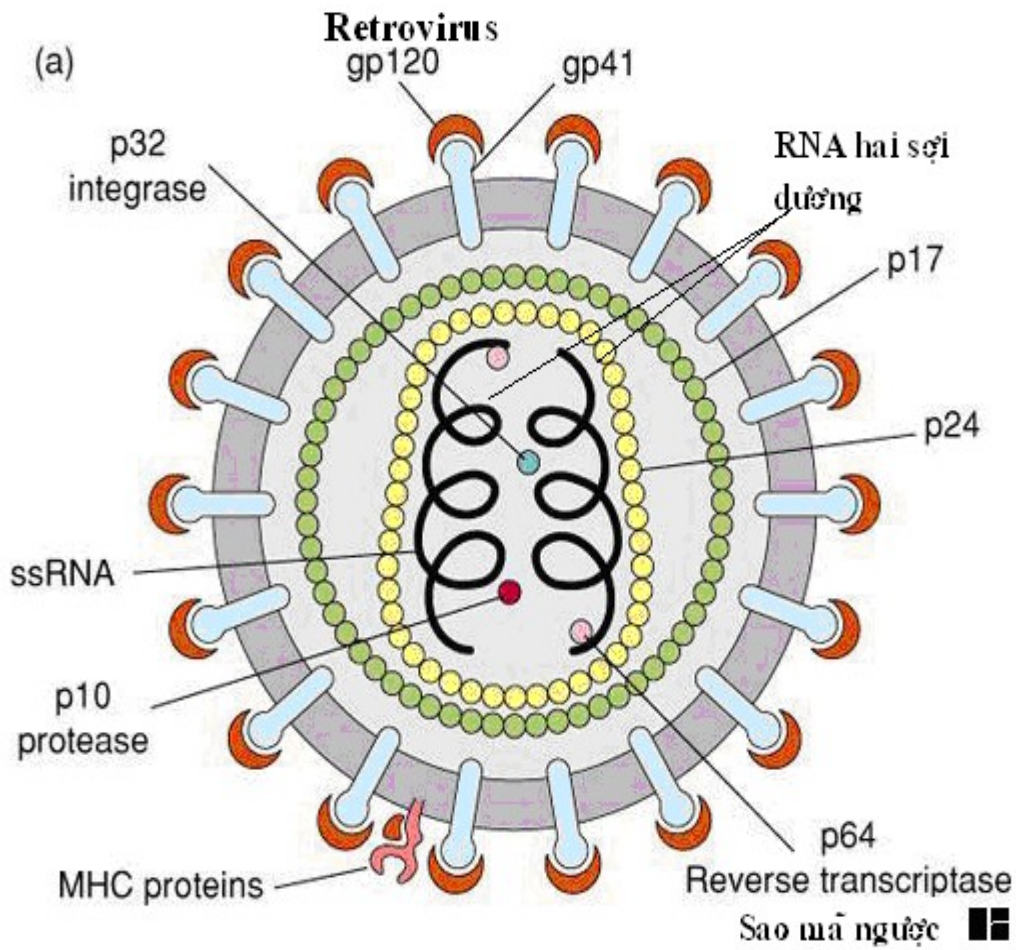


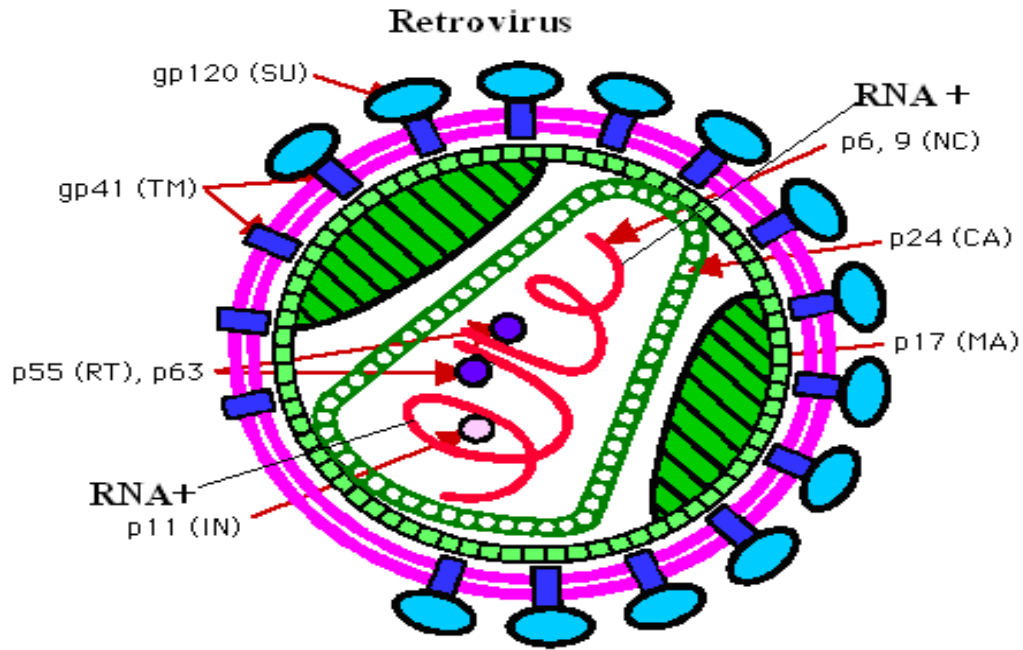
Adenovirus có cấu trúc 20 mặt, thoáng trông gần giống hình cầu, không có màng bao, đường kính 70-80 nm. Chúng có tất cả 12 góc, 20 mặt, 30 cạnh. Capsid cấu tạo bởi 252 capsom, trong đó có 12 thể ngũ lân có khối lượng phân tử 70000, phân bố ở 12 góc và 240 thể lục lân có khối lượng phân tử 120.000, phân bố đều trên 20 mặt. Thể ngũ lân cấu tạo bởi 5 monomer protein mọc thẳng ra đầu có hình cầu, những sợi này được gọi là sợi ADN xoắn kép. Tất cả các loại *Adenovirus* đều có 36.500 cặp nucleotit.

Adenovirus chỉ phát triển được trên tổ chức tế bào người, thích hợp nhất là trên tế bào tổ chức thận, không phát triển được trên phôi gà. Vì *Adenovirus* phát triển và lắp bên trong nhân tế bào vật chủ cho nên có thể làm cho tế bào vật chủ tạo ra các thể bao hàm.

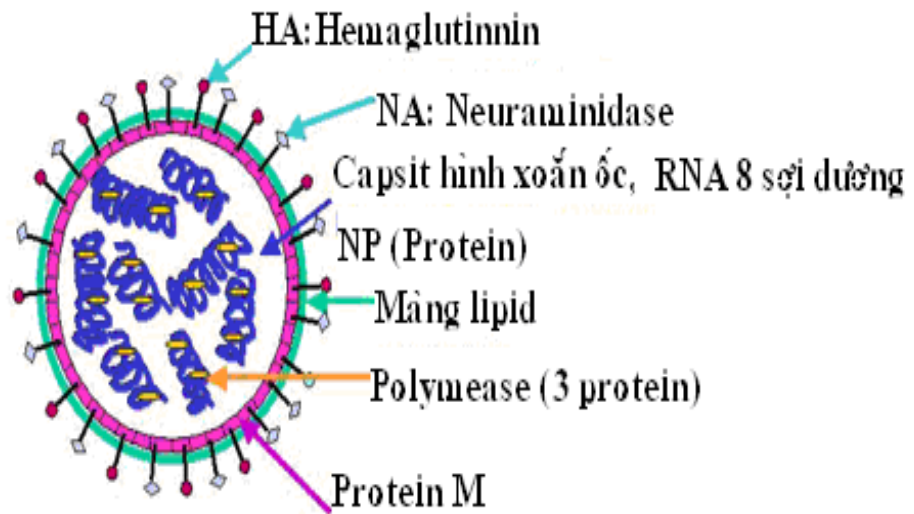
Virus Orthomyxovirus influenza (Cúm gia cầm)







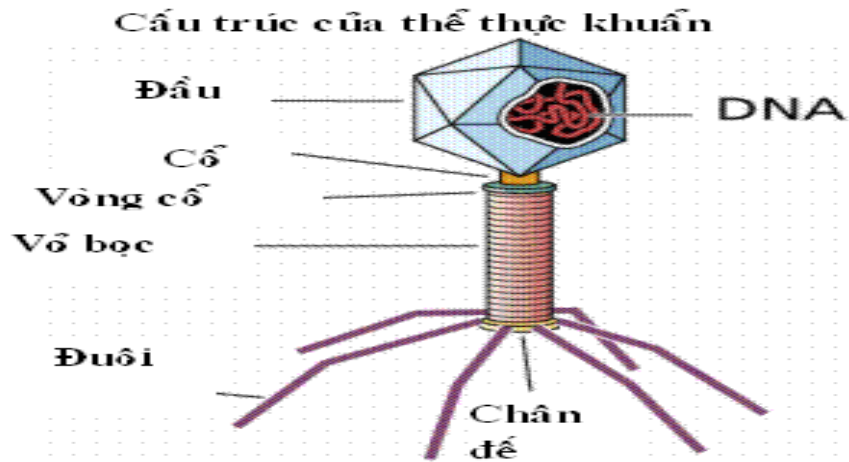
ORTHOMYXOVIRUSES (gây bệnh cúm)



type A, B, C : NP, M protein
 sub-types: HA or NA protein

3.3.3. Cấu trúc đối xứng phức hợp [4]

Lấy thể thực khuẩn T số chẵn của vi khuẩn *Escherichiae coli* làm ví dụ. Loại này gồm có T₂, T₄, T₆ phân bố rất rộng rãi trong tự nhiên. Đây là mô hình rất tốt để nghiên cứu về virus học và về sinh học phân tử. Vì vậy chúng được nghiên cứu rất sâu sắc, nhất là đối với thể thực khuẩn T₄.



Thể thực khuẩn T₄ cấu tạo bởi 3 bộ phận: đầu, cổ và đuôi.

Đầu cấu trúc đối xứng 20 mặt còn đuôi lại có đối xứng xoắn, chính vì vậy mà người ta gọi là đối xứng phức hợp. Đầu dài 95 nm, rộng 65 nm, dưới kính hiển vi điện tử có thể thấy rõ 20 mặt.

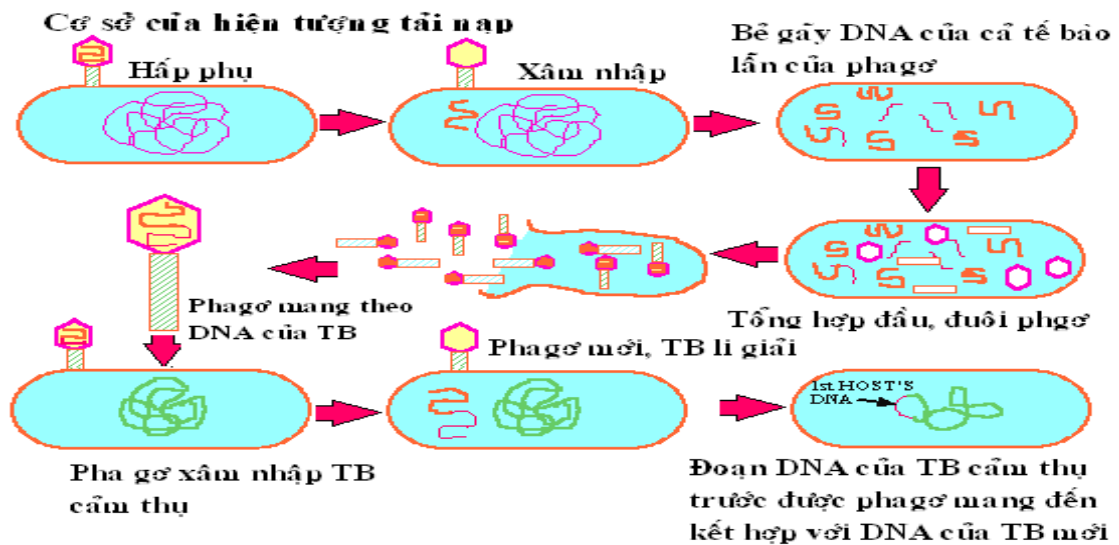
Capsid có cấu tạo bởi 8 loại protein, lượng chứa protein chiếm tới 76-81% trong thể thực khuẩn. Mỗi capsom có đường kính là 8 nm. Có cả thảy là 212 capsom. Bên trong đầu có sợi ADN, đầu nối với đuôi qua cổ, đó là một đĩa hình lục giác tạo thành, đường kính 37,5 nm, có 6 tua cổ.

Đuôi gồm có bao đuôi cấu tạo bởi 144 capsom. Ống đuôi cấu tạo bởi 24 vòng xoắn, tương ứng với 24 vòng xoắn trên bao đuôi. Đĩa gốc cũng tương tự như ở đĩa cổ, đó là một đĩa hình lục giác rộng ở giữa. Trên đĩa gốc có mọc ra 6 sợi đuôi và 6 mấu ghim. Sợi đuôi cấu tạo bởi 4 loại protein khá lớn và 2 loại protein khá nhỏ. Nó có tác dụng hấp phụ chuyển hóa và miễn cảm với tế bào vật chủ.

Sau khi sợi đuôi hấp phụ, đĩa gốc sẽ bị kích thích dẫn đến việc co rút bao đuôi làm cho ống đuôi đâm vào tế bào vật chủ. Khi đó 144 capsom của đuôi sẽ phát sinh những phản ứng tương đối phức tạp, làm cho chiều dài đuôi co lại còn 50%, rất giống với sự co của các protein sợi cơ.

IV. SỰ PHÁT TRIỂN CỦA VIRUS [5]

Chúng ta lấy thể thực khuẩn T của vi khuẩn *E. coli* để làm đối tượng nghiên cứu chính khi xem xét các phương thức sinh sản của virus.



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

Nói chung sự sinh sản của virus được chia làm 5 giai đoạn:

Hấp phụ → Xâm nhập → Sao chép → Thành thực → phóng thích

Có tác giả lại chia làm sáu giai đoạn:

Hấp phụ → Xâm nhập → cởi áo → Sao chép → Thành thực → phóng thích

4.1. Sự hấp phụ của virus lên tế bào cảm thụ

Không có sự gắn kết giữa virus với tế bào thì hiện tượng nhiễm virus sẽ không xảy ra. Nhưng không phải tất cả những tế bào gắn kết đều có thể bị nhiễm virus. Trong những trường hợp gắn kết không chắc chắn thì nó sẽ kéo theo sự tái tạo không chắc chắn sẽ xảy ra.

Trong dung dịch, khi thể thực khuẩn ngẫu nhiên gặp tế bào vật chủ tương ứng, có thể có sự tiếp xúc giữa mút của sợi đuôi với thụ thể đặc biệt trên bề mặt tế bào. Có tác giả cho rằng đó là một quá trình hóa học hình thành giữa gốc $-NH_2$ sợi đuôi và $-COOH$ trên thụ thể.

Có thể do chạm vào các tua cô mà búi sợi đuôi được gỡ tung ra sau khi sợi đuôi đã bám trên thụ thể, các mấu ghim và đĩa gốc sẽ áp sát bề mặt tế bào.

Người ta nhận thấy trên bề mặt của vi khuẩn có khoảng 300 điểm hấp phụ. Các thể thực khuẩn khác nhau có các vị trí khác nhau về điểm hấp phụ.

Thể thực khuẩn	Điểm hấp phụ
T ₃ , T ₄ , T ₇ của <i>E. coli</i>	Lipopolysaccarit
T ₂ , T ₆ của <i>E. coli</i>	Lipoprotein
SP-50 <i>Bacillus subtilis</i>	Acid teichoic
X của <i>Salmonella</i>	Tiên mao
f ₂ , MS ₂	pili

Số lượng thể thực khuẩn: vì số điểm hấp phụ trên bề mặt tế bào vật chủ có hạn, do đó thể thực khuẩn có thể hấp phụ cũng có hạn. Số lượng thể thực khuẩn tương ứng có thể hấp phụ trên mỗi tế bào miễn cảm được gọi là phức số cảm nhiễm (M.O.I). Phức số cảm nhiễm thường rất lớn, tới 250-360. Nếu một lượng lớn thể thực khuẩn đồng thời hấp phụ một tế bào miễn cảm, vì đầu ống đuôi của từng thể thực khuẩn đều có một ít lysozyme làm cho bề mặt tế bào vật chủ như có trăm, ngàn lỗ khiến cho tế bào bị phá vỡ. Đó là do M.O.I quá cao gây nên.

Trường hợp này sự phá vỡ tế bào, không làm sản sinh các thể hệ thực khuẩn mới, người ta gọi đó là sự phá vỡ tự ngoại.

Các ion dương hóa trị hai thường xúc tiến hấp phụ: Ca^{2+} , Mg^{2+} , Ba^{2+} ,...

Các ion hóa trị ba thường làm bất hoạt hấp phụ: Al^{3+} , Fe^{3+} , Cr^{3+} ,...

Các nhân tố hỗ trợ: tryptophan có thể xúc tiến sự hấp phụ của thể thực khuẩn T_4 .

pH: môi trường trung tính có lợi cho sự hấp phụ, môi trường khi $\text{pH} < 5$ $\text{pH} > 10$ khó hấp phụ.

Nhiệt độ thích hợp cho sự phát triển, cũng là nhiệt độ thích hợp cho sự hấp phụ.

Cần nắm vững các yếu tố nói trên để có thể xúc tiến sự hấp phụ khi cần tiêu diệt vi khuẩn gây hại hoặc ức chế sự hấp phụ khi sử dụng vi khuẩn hoặc xạ khuẩn trong công nghiệp lên men.

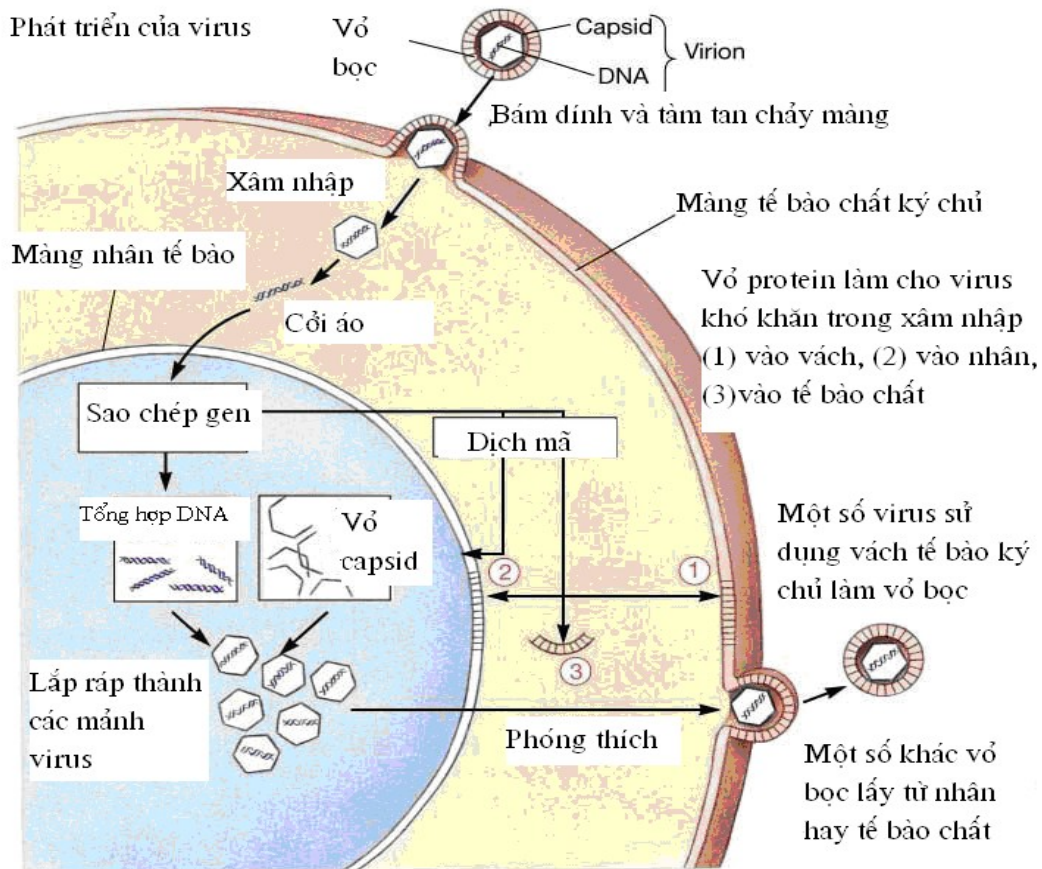
4.2. Sự xâm nhập của virus vào tế bào ký chủ

Sau khi hấp phụ đĩa gốc và sợi đuôi sẽ nhận được một kích thích, làm cho 144 capsom của bao đuôi sẽ có những vận động phức tạp. Chúng co lại chỉ còn 1/2 chiều dài và đâm ống đuôi vào qua thành tế bào và màng tế bào chất. Trong quá trình này các enzyme lysozyme ở đầu ống đuôi có tác dụng hòa tan peptydoglican ở mỗi bộ phận của thành tế bào. Sự tiếp nhận nucleocapsid qua tế bào nhận cảm nó làm cho màng tế bào bị chảy ra, (nơi tiếp xúc virus với tế bào chủ nó hòa vào nhau hình thành lỗ hồng) vỏ bọc virus ở lại ngoài màng tế bào. Ngay khi ấy nucleic acid nó chảy vào trong tế bào qua lỗ hồng do virus gây nên.

Thời gian hấp phụ đến xâm nhập là rất ngắn, ở nhiệt độ thích hợp các thể thực khuẩn T_4 chỉ cần có 15 giây. Nếu có từ hai thể thực khuẩn trở lên xâm nhập vào một tế bào vật chủ thì cuối cùng cũng chỉ có một thể thực khuẩn sinh sản mà thôi.

4.3. Giai đoạn cởi áo của acid nucleic

Từ nucleocapsid có thể cần sự tham gia của protein tế bào hay một số cơ quan khác. Cởi áo nó mới bộc lộ được gen virus. Tiếp sau khi cởi áo acid nucleic của virus đi vào chu kỳ tái tạo hay sao bản, nó yên lặng trong thời gian cư trú trên hệ gen tế bào ký chủ cho đến khi có những tác nhân kích thích thì nó mới hoạt động.



4.4. Sự sao chép[6]

4.4.1. Sao chép acid nucleic

Quá trình sinh sản xảy ra cùng với sự sao chép acid nucleic và sinh tổng hợp protein. Đầu tiên thể thực khuẩn cung cấp thông tin di truyền cho tế bào vật chủ và bắt tế bào tổng hợp ra các "nguyên liệu" dựa trên hệ thống trao đổi chất của tế bào vật chủ. Các nguyên liệu sẽ được tiếp tục tạo thành các bộ phận của thể thực khuẩn (vỏ protein và acid nucleic). Sau cùng lắp ráp các thành phần thành các thể thực khuẩn hoàn chỉnh. Đó là các thể thực khuẩn thế hệ con có kích thước như nhau.

4.4.1.1. Sao chép ở ADN virus

Phần lớn trường hợp, quá trình tái tạo diễn ra trong nhân tế bào. Trừ một số trường hợp ngoại lệ như ở Poxviruses và Iridoviruses (virus gây bệnh ở côn trùng và cá) quá trình tái tạo xảy ra trong tế bào chất.

Ở virus ADN quá trình nhân lên diễn ra trong nhân tế bào, có sự tham gia của các enzyme ADN polymerase, ARN polymerase của tế bào ký chủ.

Trường hợp của Poxviruses và Iridoviruses, virion của nó có thể mã hóa enzyme transcriptase vì vậy chúng có thể tái tạo trong tế bào chất.

Tái tạo ở ADN virus nó cũng tuân theo nguyên tắc bán bảo toàn và đảm bảo tính đối xứng của hai mạch tái tạo. Trong trường hợp ADN virus như ở Adenovirus quá trình tái tạo ở cả hai mạch nó không nhất thiết phải tuân thủ các nguyên tắc trên.

Trong tế bào vật chủ ADN chuỗi thẳng của thể thực khuẩn được khép vòng kín nhờ ligase.

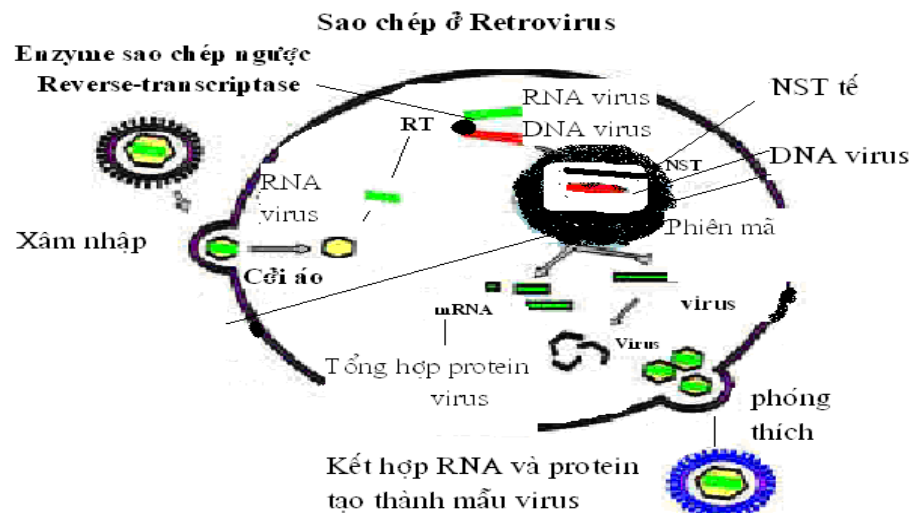
Nhiễm sắc thể vòng của virus mở đầu sao chép ở một vị trí đặc biệt và diễn ra theo hai hướng quanh phân tử theo một quá trình tương tự như ở nhiễm sắc thể của vi khuẩn.

Những lần sao chéo tiếp theo trong nhiều trường hợp diễn ra theo một quá trình gọi là vòng xoáy. Một endonuclease cắt một trong hai sợi và đầu 3'-OH của sợi bị cắt được dùng làm ngòi để gắn thêm các nucleotide khác. Sợi nguyên vẹn bổ sung được dùng làm khuôn. Như vậy đầu 5' bị thay thế và sau đó được sao chép. Theo cách này các phân tử sợi kép được tổng hợp có thể dài gấp nhiều lần nhiễm sắc thể của virus. Các phân tử như vậy được gọi là thể đa liên. Sau đó sẽ được cắt thành các nhiễm sắc thể của từng virion thường.

Trong một số trường hợp sự khép vòng không diễn ra trước sao chép. Phân tử ADN của virus dạng duỗi thẳng được sao chép nhiều lần thành các phân tử giống nhau. Sau đó tái tổ hợp để tạo ra các thể đa liên. Cuối cùng các thể đa liên được một endonuclease cắt thành các nhiễm sắc thể của virus.

4.4.1.2 Sự sao chép ở ARN virus

Quá trình tổng hợp của ARN virus, xảy ra sớm và chính xác nhất trong tế bào chất không phụ thuộc vào nhân. Trường hợp ngoại lệ là Orthomyxoviruses quá trình sao chép nó phụ thuộc vào ADN vật chủ và Retroviruses tái tạo thông qua một ADN trung gian. Còn lại NST là ARN được sao chép qua chất trung gian là ARN sợi đôi.



+Khi ARN của virion là sợi dương: NST được dịch mã ngay sau khi xâm nhập vào tế bào vật chủ, do đó một protein mà virus phải tổng hợp là replicase (ARN-polimease phụ thuộc ARN) không gặp ở các tế bào chưa bị nhiễm virus. Replicase xúc tác tổng hợp một phân tử ARN gọi là sợi đơn bổ sung cho NST virus. Như vậy NST được sao chép qua hai chặng. Trước hết sợi âm được tổng hợp ra để tạo thành phân tử sợi đôi dạng sao chép. Sau đó replicase sẽ dùng sợi âm làm khuôn để tổng hợp ra một bản sao mới của sợi dương.

+Khi ARN của virus là sợi âm hoặc sợi kép: sẽ không thể dịch mã vì thiếu vị trí gắn ribosom. Tất cả các virion chứa NST như vậy đều chứa các phân tử replicase đi vào tế bào chủ cùng với NST. Replicase xúc tác sự sao chép của NST virus qua một dạng trung gian sợi kép. Ở các virus này các sợi dương tiếp theo sẽ được tổng hợp từ dạng trung gian sao chép, dùng làm ARN thông tin để tổng hợp các protein của virus.

Về mặt di truyền các thể thực khuẩn đơn giản. Nhiễm sắc thể chỉ đọc mã cho 4 protein: protein capsid chủ yếu (protein vỏ), protein capsid thứ yếu (protein thành thực), protein dung giải và ARN- replicase.

Các virus phức tạp hơn chứa nhiều gen đọc mã cho các protein capsid cũng như cho quá trình tập hợp. Chẳng hạn thể thực khuẩn T cần 40 gen để tổng hợp capsid.

Các đơn vị kiến trúc bộ máy sinh tổng hợp bao gồm: acid amine, ribosom, nucleozit triphosphat cần cho virus sao chép đều do tế bào vật chủ tổng hợp nên. Tuy nhiên một số virus chứa nucleotide cải biến không thấy có trong tế bào vật chủ. Trong trường hợp này ADN của virus đọc mã cho các enzyme xúc tác một số bước quan trọng trong quá trình tổng hợp một số nucleotide không bình thường này.

Trong đa số trường hợp việc tổng hợp các bazơ không bình thường bắt đầu bằng một nucleotide monophosphat bình thường. Một enzyme do virus đọc mã cải biến nucleotide này, các enzyme khác của virus chuyển nucleotide trên thành NTP (nucleotide triphosphat) không bình thường. Cuối cùng một polymerase do virus đọc mã lắp nucleotide này vào acid nucleic virus.

Để ngăn cản việc lắp bazơ bình thường vào nhiễm sắc thể của virus, một số virus tổng hợp các enzyme có chức năng phân hủy NTP bình thường bằng cách chuyển nó thành NMP tương ứng, do đó đã cung cấp nhiều cơ chất hơn cho việc tổng hợp các triphosphat không bình thường.

Acid nucleic chứa nucleotid không bình thường có ưu điểm chọn lọc là kháng lại tác dụng phân giải của các nuclease trong tế bào chủ. Ví dụ: các thể thực khuẩn T chặn bình thường của *E. coli* chứa 5- hydroximethylxitozin được glucozil hóa ở vị trí 5'-OH; các thể thực khuẩn đột biến mất khả năng glucozil hóa ở vị trí 5' OH, ADN sẽ bị bất hoạt bởi một nuclease gặp trong *E. coli*.

Dưới đây là các base cải biến gặp trong ADN của một số thể thực khuẩn.

Base cải biến	Base bị thay thế	Mức độ cải biến (%)	Thể thực khuẩn	Vi khuẩn chủ
5-Hydroximethylxitozin	Citozin	100	T chặn	<i>E. coli</i>
5- Methylxitozin	Citozin	100	XP 12	<i>Xanthomanos ozyzae</i>
5-Hydroximethyluracin	Timin	100	Ø E	<i>B.subtillis</i>
Uracin	Timin	100	PBS ₂	<i>B. subtillis</i>
2- Aminoadenin	Adenin	100	S2L	<i>Synechococcus elongus</i>
α-Glutamiladenin	Adenin	20	SP10	<i>B. subtillis</i>

Retroviruses có enzyme dịch mã ngược (ARN-dependent ADN polymerase) nó xúc tác tổng hợp ADN trung gian để kết hợp với gen của tế bào ký chủ.

4.4.2. Sinh tổng hợp protein

4.4.2.1. Sinh tổng hợp protein trong pha sớm

Thông tin di truyền chứa trong acid nucleic được mRNA chuyển đến ribosome có trong nguyên sinh chất của tế bào. Trên các polyribosome những protein sớm được tổng hợp bằng cách sắp xếp các acid amin. Protein trong pha sớm được tổng hợp trong quá trình nhân lên của virus gồm có hai loại.

-Protein hạn chế: làm nhiệm vụ kìm hãm và đình chỉ tất cả các quá trình tổng hợp của tế bào chủ, để tế bào cung cấp cơ chất cho quá trình nhân lên của virus.

-Protein hoạt hóa: là những protein có liên quan tới việc sao chép của virus, đó là những ADN polymerase và ARN polymerase, hoạt tính của các men này trong tế bào tăng rõ rệt, nó có tác dụng xúc trong quá trình tổng hợp acid nucleic.

4.4.2.2. Sinh tổng hợp protein cấu trúc (trong pha muộn)

Quá trình sinh tổng hợp protein cấu trúc của virus thường xảy ra sau khi tổng hợp acid nucleic.

Là giai đoạn phiên dịch mã của mRNA, sắp xếp các acid amin có trong tế bào thành protein virus. Quá trình này có sự tham gia của ribosome, tARN (vận chuyển acid amin) và các enzyme phục vụ cho quá trình tổng hợp protein. Giai đoạn này quá trình tổng hợp protein như ở vi khuẩn.

Sự sinh trưởng nội bào của virus gây nên nhiều hậu quả có hại cho tế bào vật chủ. Sự sao chép của một số thể thực khuẩn sợi chứa ADN chỉ kìm hãm nhẹ tốc độ sinh sản của vật chủ. Trong khi đó sự sao chép của các thể thực khuẩn T chặn, kìm hãm sự biểu hiện của các gen chủ, do tổng hợp một số nuclease phân hủy ADN của tế bào vật chủ. Thậm chí các gen thoát được tác dụng của những nuclease này cũng không thể phiên mã, vì các enzyme do virus đọc mã đã adenyl hóa và vì vậy bất hoạt hóa ARN-polymerase của tế bào vật chủ.

4.5. Sự thành thực của virus

Sự thành thực còn được gọi là sự lắp ráp, là giai đoạn thứ tư của quá trình sinh sản virus.

Sau khi các protein capsid và acid nucleic được tích lũy phong phú, trong tế bào vật chủ sẽ bắt đầu quá trình lắp ráp.

Ở virus thực vật TMV và ở các virus có cấu trúc đối xứng xoắn ốc sự lắp ráp tương đối đơn giản. Các protein capsid sẽ liên kết với geneom của virus và cuộn lại thành hình xoắn ốc.

Sự lắp ráp của các thể thực khuẩn có đối xứng, phức tạp hơn. Khi đó quá trình lắp ráp và giải phóng các virion thành thực liên quan với nhau. Việc tập hợp diễn ra ở mặt trong của màng tế bào chất và khi các protein capsid gắn vào ADN thì sợi đang sinh trưởng bị đẩy qua thành tế bào.

Việc lắp ráp của các virus có đối xứng 20 mặt và các thể thực khuẩn hoặc virus có đối xứng phức hợp (có đầu và đuôi) sẽ khác một chút. Trong đa số trường hợp các protein capsid tập trung lại thành một cấu trúc rỗng gọi là procapsid hay tiền capsid, có hình dạng và kích thước của capsid. Sau đó acid nucleic của virus đi vào cấu trúc này và kết hợp thành một trạng thái chặt chẽ.

Với các virus có đối xứng 20 mặt, procapsid sẽ được hàn lại và trở nên không thấm các phân tử lớn. Ở các thể thực khuẩn gồm hai thành phần thì đuôi được tập hợp riêng biệt sau đó mới gắn với đầu có chứa ADN.

Trong hầu hết trường hợp bước cuối cùng trong giai đoạn lắp ráp của một virus có vỏ là việc tiếp nhận một phần màng của tế bào vật chủ bao lấy lõi nucleocapsid khi virus đi qua màng tế bào vật chủ. Trước khi diễn ra bước này, các protein do virus đọc mã sẽ tích tụ ở màng tế bào chất hay màng trong của nhân. Ở các virus động vật có vỏ, các protein của virus được tổng hợp trên ribosom gắn vào mạng lưới nội chất thô và được màng bên cạnh bao lấy khi chúng được tổng hợp. Thường các protein này được glicozid hóa bởi các enzyme có mặt trong mạng lưới nội chất. Các virus có vỏ chứa ARN thì protein vỏ của virus di chuyển đến màng tế bào chất nhờ bộ máy Golgi. Sau đó lõi nucleoprotein của virion di chuyển đến mặt trong của màng và được bao bọc bởi màng chứa các protein virus, khi lõi rời tế bào nhờ một quá trình tương tự như quá trình nảy chồi. Ở virus có vỏ chứa ADN thì protein màng di chuyển đến màng trong của nhân. Tại đây nucleocapsid tập hợp trong nhân sẽ liên kết với các

vùng của màng trong nhân, đã gắn với các protein màng của virus. Màng này bao quanh lõi nucleoprotein và virion tách khỏi nhân. Virion thành thực sẽ chuyển tới mạng lưới nội chất.

4.6. Sự phóng thích

Ở các virus ARN có vỏ và các thể thực khuẩn dạng sợi, sự phóng thích khỏi tế bào như một phần của quá trình lắp ráp cuối cùng của virion. Virus ADN có vỏ, có thể di chuyển từ mạng lưới nội chất đến bào nang. Từ đây chúng được phóng thích nhờ quá trình đào thải khỏi tế bào gọi là quá trình xuất bào. Ở một số virus động vật, không có vỏ (Adenovirus) virus trực tiếp phóng thích qua màng tế bào chất mà không làm tổn hại đến tế bào chủ. Tuy nhiên, nhiều virus động vật và virus thực vật sẽ làm giết chết tế bào vật chủ và thoát ra ngoài sau khi tế bào chủ đã bị tự phân. Trong phần lớn trường hợp thể thực khuẩn được giải phóng thông qua việc làm phân giải vi khuẩn. Có trường hợp một gen của thể thực khuẩn được biểu hiện trong pha muộn sẽ đọc mã cho lysozyme phân giải các liên kết glycozit của peptidoglycan. Có loại thể thực khuẩn mang gen đọc mã cho việc phân giải liên kết peptit trong peptidoglycan.

V. CÁC PHƯƠNG PHÁP NUÔI CẤY VIRUS

Virus không có hệ thống enzyme cho nên chúng chỉ có thể được nuôi cấy trên môi trường tổ chức sống. Virus không thể phát triển trong các môi trường nhân tạo được. Tùy từng loại virus mà người ta có thể lựa chọn phương pháp nuôi cấy thích hợp.

5.1.1. Nuôi cấy trên động vật thí nghiệm

Đây là phương pháp cổ điển, đã được sử dụng từ lâu (Pasteur đã tiêm virus dại vào não thỏ) và ngày nay còn được ứng dụng để phân lập virus, để nghiên cứu bệnh lý, tác dụng gây bệnh trên cơ thể và các tổ chức riêng biệt, những đặc tính sinh học của virus. Tuy nhiên phương pháp này còn tương đối cồng kềnh, mất nhiều thời gian, không kinh tế và đặc biệt là dễ gây ô nhiễm và lây lan mầm bệnh.

Phương pháp này, dùng huyền 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 biểu hiện lâm sàng và bệnh tích đặc trưng khi mổ khám, có thể kết luận sự có mặt của virus. Nếu biểu hiện lâm sàng không lộ rõ ra, người ta cũng có thể xác định hiệu giá kháng thể trong máu con vật, qua đó chứng minh sự có mặt của virus.

Nếu sau khi tiêm, động vật không bị ốm, người ta cũng giết động vật sau 5-10 ngày, dùng phủ tạng nghiền nát thành huyền dịch để tiêm cho động vật mới "tiêm truyền mù". Bằng cách này sau 2-3 lần tiêm có thể gây được bệnh cảnh lâm sàng hoặc ít ra cũng gây được những biến đổi trong phủ tạng của con vật mà qua đó phán đoán sự tồn tại của virus.

Tùy từng loại virus mà có thể lựa chọn động vật cảm thụ. Ví dụ: virus Newcastle chọn gà giò, virus gây viêm não dùng chuột trắng, virus dịch tả lợn dùng lợn choai, virus cúm dùng sóc.

Tùy theo tính chất gây bệnh của virus, và tùy theo mục đích công việc nghiên cứu mà lựa chọn đường tiêm thích hợp nhất. Ví dụ: virus đường hô hấp (cúm), thì giỏ vào mũi hoặc tiêm vào khí quản; virus hướng thần kinh thì tiêm vào não (dại, viêm não); virus hướng thượng bì (virus đậu) thì xát lên da hoặc các lỗ chân lông, virus hướng phủ tạng thì tiêm vào xoang bụng, dưới da hoặc bắp thịt.

Phương pháp tiêm truyền virus qua động vật còn dùng để chế tạo các loại vaccin hay các kháng nguyên chẩn đoán.

Thuận lợi của phương pháp này là có thể nghiên cứu được bệnh lý trên con vật, tác dụng gây bệnh của virus trên toàn bộ cơ thể và những tổ chức riêng biệt.

Nhược điểm: cồng kềnh, mất nhiều thời gian và không kinh tế.

5.1.2. Phương pháp nuôi cấy trên phôi thai gà đang phát triển

Đa số virus có thể phát triển trên môi trường phôi thai gà, do đó phương pháp này được sử dụng rộng rãi để phân lập, kiểm nghiệm, định loại virus, chế tạo kháng nguyên và các loại vaccin. Đây là phương pháp thuận lợi, tiết kiệm kinh phí và cho kết quả nhanh chóng, có thể nuôi cấy hàng loạt phôi gà và thu được một lượng virus lớn.

Lấy trứng gà đã thụ tinh cho ấp ở 38°C ở độ ẩm 60% tùy thuộc vào loại virus, mà chọn tuổi phôi thích hợp thường 6-13 ngày và lựa chọn đường tiêm vào các tổ chức khác nhau của phôi.

Sử dụng phương pháp này cần chú ý

Với virus cảm nhiễm đường hô hấp thì tiêm vào *túi niệu* hoặc *túi ối*, màng niệu đệm hoặc não, 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 màng não.

Sau khi tiêm dùng paraffin vô trùng gắn lên vị trí tiêm, rồi tiếp tục ấp trong tủ ấm 37°C trong 2-4 ngày, sau đó mổ trứng và lấy các tổ chức chứa virus. Dựa vào biến đổi đại thể của các tổ chức phôi mà đánh giá sự phát triển của virus. Ví dụ: nuôi cấy virus đậu vào màng niệu đệm, màng niệu đệm sẽ dày lên, hoặc khi tiêm virus Newcastle vào túi niệu sau 24-48 giờ, có xuất huyết trên phôi, phôi có thể bị phù.

Trong trường hợp không gây được bệnh tích biến đổi có thể nhìn thấy được, người ta có thể phát hiện sự nhân lên của virus trong phôi bằng cách tiêm dịch thể các túi hoặc huyền dịch các tổ chức phôi nghiền nát vào động vật cảm thụ, sau đó xét nghiệm phản ứng huyết thanh.

Ngoài phôi gà người ta có thể dùng phôi vịt để nuôi cấy virus. Ví dụ: virus dịch tả vịt.

Ngoài đường tiêm thích hợp phải chọn liều tiêm phù hợp, trong virus học có hai loại liều tiêm:

+Liều tiêm thực tế ml, thông thường 0,2ml/phôi.

+Liều tiêm cần thiết: biểu thị bằng nồng độ pha loãng của virus theo chỉ số LD₅₀ (Lethal dosis) tức liều tối thiểu gây chết 50% hoặc theo chỉ số ID₅₀ (Infection dosis) tức liều gây nhiễm 50%.

5.1.3. Nuôi cấy virus trên tổ chức tế bào

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 virus, 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 vaccin.

Nguyên tắc: nếu lấy một tổ chức tế bào cho vào môi trường dinh dưỡng thích hợp thì các tế bào sống sẽ bắt đầu phân chia. Nếu cứ sau một thời gian lại rửa và cho thêm dung dịch mới, thì tế bào sẽ phân chia không ngừng. Dùng các tế bào đó để cấy virus.

Để tạo ra các tế bào tổ chức người ta lấy tế bào từ các mô của người và động vật như người ta dùng tế bào sơ phôi gà hay tế bào Hela (tế bào da lấy từ cô gái có tên Hela), màng ối, thận, phôi, thận lợn, tinh hoàn động vật,...

Nuôi tế bào: sau khi lấy mô, người ta dùng men trypsin phá hủy mô liên kết giữa các tế bào để tách chúng ra thành các tế bào riêng lẻ sau đó quay li tâm với dung dịch muối đệm để loại hết trypsin rồi thêm vào đó môi trường dinh dưỡng để nuôi tế bào.

Môi trường dinh dưỡng nuôi cấy tế bào được chia làm hai loại: tự nhiên (có nguồn gốc từ các chất có sẵn như huyết thanh động vật, nước ép nhau thai, chất đệm) và tổng hợp (gồm nhiều chất khác nhau như các acid amin, hydrat carbon, lipid, muối khoáng có thêm huyết thanh để chúng phân chia tăng số lượng tế bào).

Trộn môi trường dinh dưỡng trên với hỗn dịch tế bào rồi rót vào các bình dẹt hoặc đĩa petri, đặt nằm ở 37°C, sau 6-7 ngày các tế bào sẽ mọc dính chặt vào đáy bình tạo thành một lớp tế bào.

Dùng hỗn dịch virus pha loãng 10^{-2} - 10^{-1} trong dung dịch muối đệm Hank cấy vào trong bình đựng tế bào một lớp, sao cho vừa đủ ướt mặt lớp tế bào. Sau đó đổ dung dịch môi trường mới vào bình.

Khi nuôi cấy trên môi trường tế bào, song song với sự nhân lên về số lượng của virus là sự thoái hóa của tế bào thể hiện ở sự biến đổi rất đặc trưng ở tế bào do virus gây ra. Hiện tượng này được gọi là sự hủy hoại tế bào. CPE (Cyto pathogen effect). Căn cứ vào CPE khi quan sát trên kính hiển vi quang học, có thể đánh giá được kết quả nuôi cấy virus, CPE có những bệnh tích đặc trưng sau:

- Tế bào co tròn, nguyên sinh chất bị mất, chỉ còn nhân.
- Tạo nên sự dung bào, tế bào co tròn, nguyên sinh chất mất, nhân vỡ tan,
- Tạo các cầu nối giữa các tế bào giữa tế bào lành và tế bào bị nhiễm có nhiều các cầu nối, tạo thành từng đám tế bào.
- Tạo nên các hợp bào: các tế bào hợp lại chung một màng có rất nhiều nhân.
- Tạo nên các tiểu thể bao hàm nằm trong nhân, trong nguyên sinh chất.

Thời gian nhân lên của các virus có khác nhau, nói chung từ 2-10 ngày. Virus nhân lên gây hủy hoại tế bào, sự hủy hoại này có thể phát hiện được dưới kính hiển vi quang học hoặc thêm các chất chỉ thị màu vào môi trường và quan sát bằng mắt thường. Các tế bào không bị virus hủy hoại vẫn phát triển bình thường và sinh ra nhiều acid trong môi trường (làm pH giảm xuống, làm đỏ phenol trong dung dịch chuyển sang màu vàng). Nếu môi trường không thay đổi chứng tỏ tế bào đã bị hủy hoại.

CPE (Cytopathic effect). Căn cứ vào CPE khi quan sát trên kính hiển vi quang học, có thể đánh giá được kết quả nuôi cấy virus, CPE có những bệnh tích đặc trưng sau:

- Tế bào co tròn, nguyên sinh chất bị mất, chỉ còn nhân.
- Tạo nên sự dung bào, tế bào co tròn, nguyên sinh chất mất, nhân vỡ tan,
- Tạo các cầu nối giữa các tế bào giữa tế bào lành và tế bào bị nhiễm có nhiều các cầu nối, tạo thành từng đám tế bào.
- Tạo nên các hợp bào: các tế bào hợp lại chung một màng có rất nhiều nhân.
- Tạo nên các tiểu thể bao hàm nằm trong nhân, trong nguyên sinh chất.

Để tạo nên các tế bào nuôi, người ta thường dùng các tế bào lấy từ các mô của người và động vật cho vào môi trường dinh dưỡng và để ở nhiệt độ thích hợp thì các tế bào này sẽ sống và bắt đầu phân chia, cứ sau một thời gian lại rửa và thêm dung dịch dinh dưỡng mới thì các tế bào sẽ phân chia không ngừng, sử dụng các tế bào đó để nuôi cấy virus.

5.1.4. Nuôi cấy virus trên môi trường biệt lập

Dùng mô, phôi, khí quản, gan, lách, da ruột, thận, thymus của phôi bò 2-4 tháng tuổi, hoặc phôi lợn cừu 1,5 tháng tuổi.

Ưu điểm của phương pháp này là virus được tái sản trong điều kiện giống tự nhiên hơn là tái sản trên lứa cấy tế bào riêng biệt, chúng phát triển, trao đổi chất và cấu trúc hoàn toàn khác mô phát triển trong cơ thể.

5.1.5. Nuôi cấy thực khuẩn thể

Dùng các tế bào vi khuẩn cảm thụ phage được nghiên cứu. Ví dụ cấy phage T₄ dùng lứa cấy *E. coli*. Khi nhiễm vào môi trường nuôi cấy vi khuẩn, phage sẽ chui vào tế bào và tấn công tế bào. Môi trường đang đục trở nên trong suốt. Lại tiến hành cấy truyền bằng cách lấy dịch trong có chứa phage để nhiễm vào lứa cấy vi khuẩn mới.

5.2. Nuôi cấy virus nhiễm bệnh thực vật

Dùng các cây cảm thụ, trồng riêng trong nhà kính. Thường nuôi cấy trên một năm, trồng theo nhiều đợt và tiến hành cấy truyền từ cây này sang cây khác non hơn đang ở thời kỳ phát triển mạnh.

- Lấy dịch lá ép, lọc qua màng lọc và tiêm vào cây.

- Lấy nhựa tiêm truyền thẳng.

- Đối với loại virus chỉ lan truyền trong thiên nhiên nhờ côn virus thì dùng côn virus làm trung gian.

VI. SỰ TÁC ĐỘNG LẤN NHAU GIỮA VIRUS VÀ TẾ BÀO KÝ CHỦ

Sự tác động giữa virus và tế bào ký chủ là một quá trình phức tạp liên quan đến chu kỳ tái tạo của virus. Hơn nữa sự tác động của virus với tế bào ký chủ tạo thành phức hợp, trong thời gian sao mã sự tác động này là nguyên nhân phát sinh bệnh lý tế bào. Toàn bộ hoạt động của virus nó hướng tới khả năng gây nhiễm của virus đối với tế bào cảm thụ. Hầu hết trường hợp nguyên nhân gây cảm nhiễm tế bào nó không thể hiện rõ ở bệnh tích cũng như hình thái tế bào, tuy nhiên sự sao chép của virus qua các giai đoạn có thể là nguyên nhân gây biến đổi các quá trình (tế bào tròn lên, tế bào bị tách ra, hình thành các thể hợp bào,...) hoặc làm cho tế bào phân hủy (chết).

+Tế bào chết

Trong quá trình tái tạo virus làm cho tế bào chết có thể nguyên nhân do nhiều yếu tố khác nhau. Trong đó nhân tố quan trọng là virus đã ngăn chặn sự tổng hợp chất cơ bản của tế bào, các phân tử như protein. Trong quá trình nhân lên, virus bắt tế bào tổng hợp những thành phần mà virus cần với lượng lớn. Tế bào phải tổng hợp các thành phần như vỏ protein, nucleocapsid. Những sản phẩm mà tế bào phải tổng hợp cho virus có thể gây độc cho tế bào. Sau khi giải phóng khỏi chu kỳ tái tạo, một số virus phá vỡ tế bào chủ. Trong một số trường hợp khác, sự ức chế của chất mới tổng hợp đối với tế bào, nó là nguyên nhân phá hủy lysosom và tiếp theo là các enzyme thủy phân và kết quả là tế bào chết.

+Tác động lên tế bào

Tác động lên tế bào Cytopathic effect (CPE) là kết quả của những thay đổi trên tế bào kể từ khi virus gây nhiễm. Khi tế bào bị nhiễm virus có thể có những biến đổi màng tế bào, màng tế bào mất khả năng trao đổi chất và mất khả năng liên kết với các tế bào bên cạnh. Kết quả của sự tác động này là nhân của tế bào bị tan ra. Sự tổng hợp lõi và vỏ trong tế bào chủ cấu thành bộ phận của các loại virus như Herpesviruses và Paramyxoviruses. Sự biến đổi của màng tế bào làm thay đổi tính thấm nó cho phép các ion, độc tố, kháng thể, kháng sinh,... lọt vào trong tế bào. Những tế bào này nhân của nó bị trương phồng đôi lúc còn gọi chúng là những tế bào nhân không lồ.

Biến đổi bề ngoài của CPE như: sự phá vỡ bộ khung tế bào, làm cho tế bào bị nhiễm virus, tròn lồi lên. Những tế bào này sẽ bị dung giải hoặc hình thái chúng sẽ bị thay đổi.

Những biến đổi bệnh tích tế bào trong chẩn đoán lâm sàng có thể cho biết, tế bào đã bị nhiễm virus. Bệnh tích tế bào (CPE) là căn cứ quan trọng trong chẩn đoán, xếp lớp virus. Sự nhiễm virus vào tế bào đối với một số loại virus (Poxviruses, Rhabdoviridae nó làm biến đổi tế bào chất như tế bào chất co tròn hình hạt xoan. Biến đổi bệnh tích tế bào ở bề mặt tế bào nó chứa đựng nhiều protein virus hoặc các mẫu virus. Chúng thường có những biến đổi ở những vị trí đặc trưng và xuất hiện trong thời gian tế bào bị nhiễm, để chống lại virus.

+ Biến đổi thành tế bào ác tính

Trong quá trình biến đổi này, tế bào cảm thụ bị nhiễm virus có một số đặc điểm như, hình thái tế bào bị biến đổi, tế bào chậm phát triển, thuộc tính và đặc tính sinh học thay đổi. Virus làm thay đổi tế bào thành những tế bào ác tính, có thể gây ra ung thư.

Tế bào bị virus biến đổi thành những tế bào độc trong đó có các khối u chứa virus. Virus từ nhiều họ khác nhau có thể xâm nhập và biến đổi tế bào cảm thụ, những khối u virus lành tính nó có những đặc tính khác thường (kích thước, hình dạng, thành phần hóa học cấu tạo) nó so với các sự phát triển của các u ác tính trong tế bào cảm thụ.

Sự biến đổi của những khối u ác tính nó thường mang đặc tính biến đổi hình thái học tế bào. Chúng bị mất đi một số đặc tính hình thái và tế bào tròn dày lên, sự thay đổi này như đã mô tả ở (CPE) biến đổi bệnh tích tế bào. Đây là đặc điểm làm giảm bớt sự tập trung của virus lên bề mặt.

Biến đổi trong quá trình phát triển, những dấu hiệu để nhận biết khối u ác tính là biến đổi của virus bên trong tế bào cảm thụ, nó ức chế sự phát triển hay sự tác động làm giảm bớt nhu cầu dinh dưỡng trong quá trình phát triển, tác động kéo dài sẽ ảnh hưởng xấu tới chu kỳ tế bào, làm cho tế bào phát triển thành các khối (immortality, không diệt được).

Một số đặc điểm biến đổi tế bào ác tính nó được thể hiện ở chỗ, thay đổi quá trình tổng hợp ADN, thay đổi nhiễm sắc thể (chromosom), xuất hiện một số đặc điểm mới hay bắt đầu hình thành kháng nguyên bề mặt và giảm sự liên kết. Thông thường sự thay đổi đặc tính hóa sinh của tế bào u ác tính là mất cân bằng trong chu trình AMP. Chu trình AMP là chu trình hóa học, đó là quá trình khử cung cấp năng lượng giúp cho chu kỳ tế bào được diễn ra liên tục. Hơn nữa quá trình này phức tạp khi tăng thêm sự tạo thành các khối bạch cầu, quá trình lên men hình thành acid lactic, nó làm thay đổi hàm lượng đường trong kết cấu protein và lipid.

+Sự phát sinh ung thư

Mặc dù nguyên nhân tác động để hình thành ung thư rất khó, một số virus ADN và ARN đã có sự kết hợp với một chất đặc biệt trong quá trình biến đổi. Sự phát sinh ung thư ở virus là do nó mang thông tin di truyền kết hợp với quá trình phát triển của tế bào, nó *kìm hãm hay biến đổi gen của tế bào*. Sự kích thích gen virus nó ngăn chặn sự phát triển của tế bào.

Gen của virus nó làm biến đổi tính chất của tế bào, được biết như là gen đột biến gây bệnh ung thư (v-oncogens), nó làm cho tế bào tăng trưởng quá mức không kiểm chế được. Việc khám phá ra gen gây đột biến gây ung thư dẫn đến việc tìm thấy những tế bào mang gen tương tự, gọi chúng là (proto-đột biến ung thư) (c-oncogen), bình thường nó tồn tại yên lặng trong tế bào và nó chỉ hoạt động ở những nơi đặc biệt. Gen gây đột biến-*proto* sinh ra từ tế bào gồm các nhân tố ảnh hưởng đến tăng trưởng, nhân tố sao chép, phát triển cơ quan nhận cảm. Ở ADN virus là tác nhân gây ung thư phải kể đến như virus gây bệnh Marek's (*Herpesviridae*) và virus gây các khối u nhú ở bò, ngựa, chó (*Papillomaviridae*). Những virus này có hệ gen rất điển hình (gen của chúng độc lập với nhiễm sắc thể tế bào ký chủ). Gen gây ung thư (v-oncogen) mã hóa thành protein để kết hợp với bản sao virus.

ARN virus kết hợp với gen gây ung thư chúng là thành viên của nhóm *Retroviridae* (gây bệnh leukosis ở gia cầm và ở mèo). Những virus này, gen của chúng kết hợp vào trong bộ gen của nhiễm sắc thể tế bào cảm thụ (provirus hoặc provirus ADN). Ở Retrovirus nguyên nhân gen đột biến gây bệnh ung thư có thể là do gen đột biến tự chúng mã hóa hoặc bởi sự thay đổi của tế bào đột biến hay do gen đột biến thông qua sự xâm nhập hệ gen của chúng đi vào liên kết với gen trong nhiễm sắc thể tế bào cảm thụ.

+Trường hợp không thay đổi hình thái hoặc chỉ thay đổi một vài chức năng tế bào

Trong một số trường hợp, virus gây nhiễm virus tế bào nhưng có thể có hoặc không có bệnh tích trên tế bào cảm thụ. Những trường hợp này được quy vào nhiễm virus nội tế bào. Những trường hợp này cần thiết phải có sự tái tạo lại bản sao của virus. Phương pháp thích hợp nhất để virus có thể hoạt động mà không gây biến đổi hình thái tế bào là virus phải xâm

nhập và nhân lên một cách hợp lý ở những vị trí thích hợp khi đó chúng sẽ không gây biến đổi tế bào.

Cảm nhiễm virus

Cảm nhiễm virus được định nghĩa như là quá trình mầm bệnh xâm nhập và phát triển trong cơ thể ký chủ, có thể gây phát bệnh hoặc không phát bệnh phụ thuộc vào nhiều điều kiện như virus, ký chủ, môi trường. Bệnh do virus gây nên có thể ở các mức độ khác nhau: cấp tính, mạn tính, ngấm ngầm hay dai dẳng. Biểu hiện đầu tiên của bệnh là các triệu chứng mà ta có thể thấy được.

Lây nhiễm và truyền bệnh

Lây nhiễm có thể nguyên nhân là do sự tiếp xúc trực tiếp với các con vật bị nhiễm virus, bởi sự tiếp xúc gián tiếp với mầm bệnh do con vật mắc bệnh đào thải ra trong tự nhiên. Nó có thể bảo tồn mầm bệnh, hoặc trong các thiết bị vận chuyển con vật, hoặc qua các sinh vật truyền bệnh. Sự lan truyền mầm bệnh virus từ mẹ sang con (qua nhau thai, máu, qua sữa) còn gọi là truyền theo chiều dọc. Một sự truyền bệnh khác từ mẹ sang con nữa là truyền ngang qua sự tiếp xúc.

Hoạt động ngấm ngầm âm ỉ, có thể tìm thấy virus không tái tạo trong khoảng thời gian chúng xâm nhập nhưng không thể nhân lên sự tái tạo của virus khi virus không chiến thắng sự chống cự của tế bào.

Các con đường xâm của virus vào cơ thể

Virus xâm nhập vào trong cơ thể cảm thụ thông qua cơ quan hô hấp (virus bám trên các hạt bụi, giọt nước nhỏ), thông qua cơ quan sinh dục (từ sự sinh sản, thụ tinh), qua sự giải phẫu (các dụng cụ, các giọt nước nhỏ), qua cơ quan tiêu hóa (miệng, hậu môn không đảm bảo vệ sinh), qua các tổn thương tổ chức da trầy xước, sứt, côn trùng cắn,...). dù cho tế bào có hệ thống phòng thủ để chống lại sự xâm nhập của virus song nó rất dễ bị nhiễm virus. Tính nhạy cảm của tế bào nó làm cho virus hoạt động rộng, chúng thông qua cơ quan nhận cảm ở bề mặt tế bào, nó cho phép sự xâm nhập của virus.

VII. Hiện tượng cản nhiễm và interferon

7.1. Hiện tượng cản nhiễm (interference)

Khái niệm: Từ lâu người ta đã nhận thấy rằng khi virus nhiễm vào tế bào, sẽ làm cho tế bào nhiễm và các tế bào lân cận không có khả năng tiếp nhận lần nhiễm tiếp theo của các loại virus đó hoặc các loại virus khác.

Năm 1937 Findlay gây nhiễm cho khi virus sốt thung lũng *Ript* sau đó gây nhiễm tiếp cho khi này virus sốt vàng với liều gây chết, thì khi không chết: Nếu chỉ gây nhiễm cho khi bằng virus sốt vàng thì khi sẽ chết.

Năm 1957, Isac và Lindenmen gây nhiễm virus cúm bắt hoạt vào phôi gà đang phát triển, sau đó lại gây nhiễm tiếp bằng virus cúm cường độc thì thấy không có sự nhân lên của virus trong phôi gà.

Như vậy, sự xâm nhiễm của một loại virus vào tế bào trước đó đã có sự ngăn cản sự nhân lên của virus xâm nhiễm vào tế bào tiếp theo đó. Hiện tượng này gọi là hiện tượng cản nhiễm.

Để giải thích cho hiện tượng cản nhiễm người ta đưa ra hai cơ chế sau:

Virus thứ nhất có thể làm hỏng bề mặt của tế bào chủ, hoặc làm hỏng các con đường chuyển hóa của nó, làm cho nó không bị bội nhiễm bởi một virus khác nữa. Điều này xảy ra với các virus mà giữa chúng có sự giống hay khác tính kháng nguyên.

Virus thứ nhất có thể kích thích việc sản xuất ra một chất ức chế gọi là cản nhiễm tố (interferon), chất này ngăn cản việc sao chép của virus thứ hai.

Có thể phân biệt các hiện tượng cản nhiễm khác nhau:

Nếu hai virus cùng loại cản nhau gọi là hiện tượng *cản nhiễm đồng loại*.

Nếu hai virus khác loại cản nhau gọi là hiện tượng *cản nhiễm dị loại*.

Nếu virus trong quá trình nhân lên đã ngăn cản lại các con cháu của chính nó xâm nhiễm vào các tế bào khác gọi là hiện tượng tự *cản nhiễm*

Cũng có trường hợp khi virus vào trước lại kích thích làm tăng sự gây nhiễm của virus vào sau gọi là hiện tượng *tăng nhiễm*. Ví dụ: trong môi trường tế bào tinh hoàn lợn một lớp, virus Newcastle không gây hủy hoại tế bào, nhưng nếu cấy virus dịch tả lợn vào môi trường này trước 5 ngày, rồi tiếp sau đó cấy virus Newcastle, thì virus này gây hủy hoại tế bào. như vậy virus dịch tả lợn làm tăng sự gây nhiễm của virus Newcastle.

7.2. Interferon

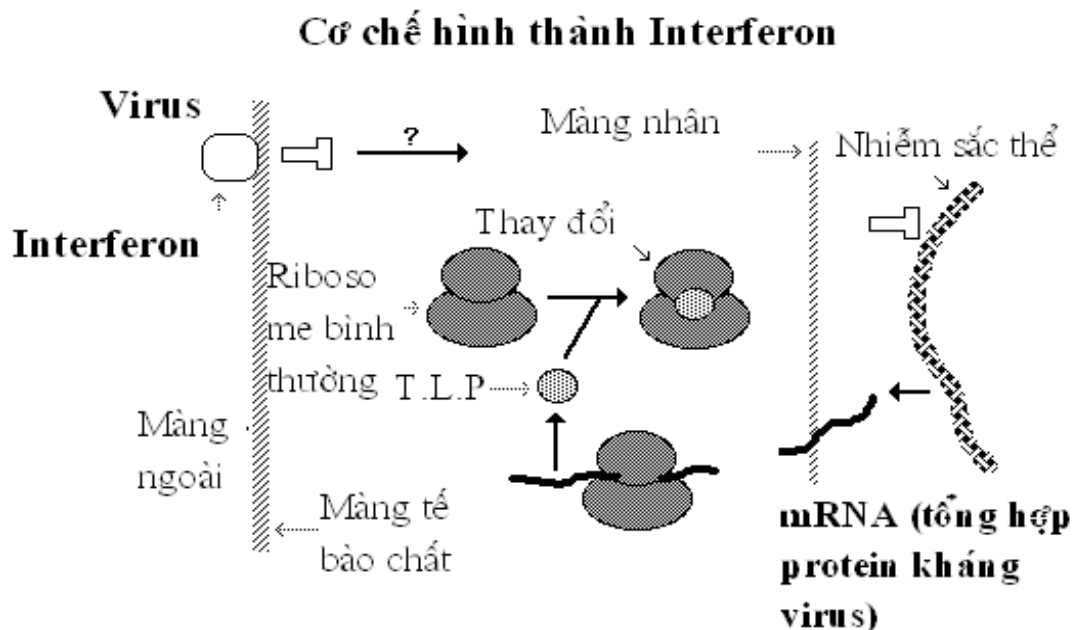
Định nghĩa

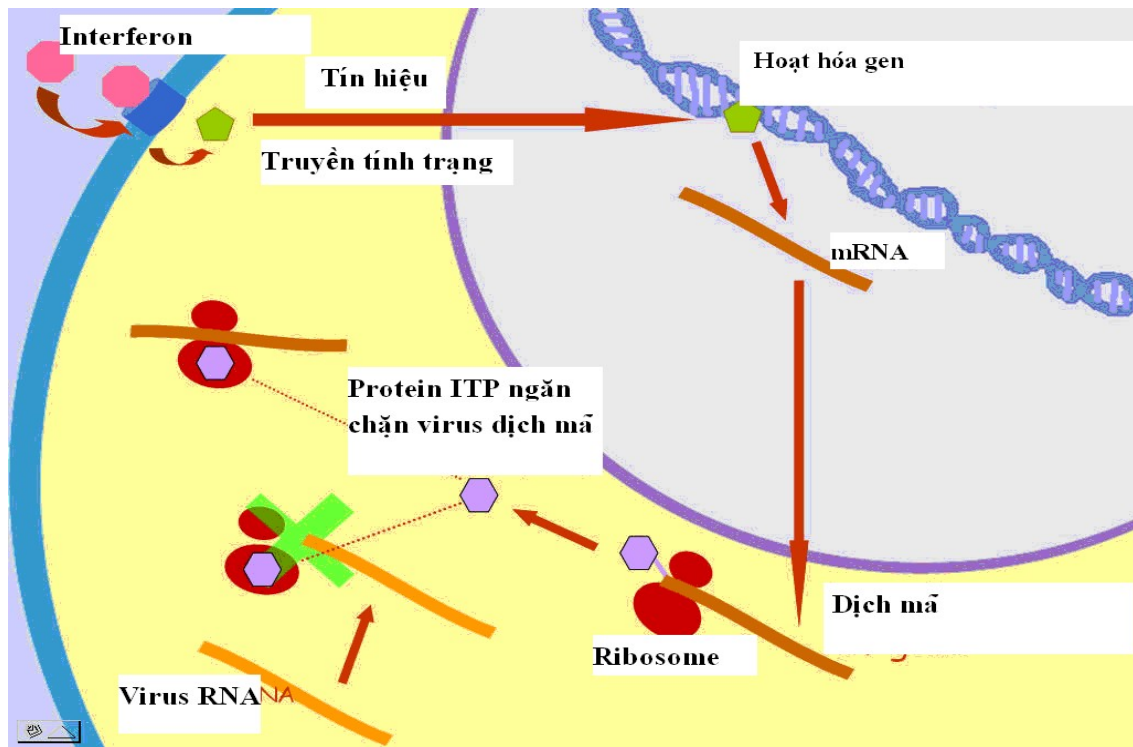
Interferon là một loại chất do tế bào sản sinh ra tiếp theo sau những cảm ứng tác động khác nhau, chất này có đặc tính ức chế sự nhân lên của virus bằng cách giải thoát sự khống chế việc tổng hợp một protein kháng virus, protein này có khả năng khống chế sự phiên dịch các thông điệp của virus ở ribosome.

7.2.1. Sự hình thành interferon

Tất cả các tế bào động vật đều có khả năng sinh ra interferon. Sự hình thành do tác động của bất cứ nguồn thông tin ngoại lai nào mà không phải chỉ là virus, như vi khuẩn độc tố vi khuẩn, nấm, *Rickettsia*, nguyên sinh động vật,...

Trong tế bào bình thường luôn có sự tồn tại các gen cấu trúc chịu trách nhiệm tổng hợp interferon nhưng ở trạng thái bị kìm hãm khi virus xâm nhập vào hoặc có sự kích thích của các yếu tố ngoại lai vào tế bào thì gen cấu trúc được giải kìm hãm và hoạt hóa, thực hiện quá trình sinh tổng hợp interferon. Interferon sau khi sinh ra phần lớn qua màng để ra ngoài vào các tế bào kề bên.





7.2.2. Tính chất của interferon

Interferon đã được tách dưới dạng tinh khiết. Đó là những phân tử protein có phân tử lượng khác nhau từ 8.000-13.000 tùy theo tế bào sinh ra chúng.

Khá bền vững với acid ở nhiệt độ bình thường. Ở pH=2 nhiệt độ 4°C hoạt tính giữ vững trong thời gian dài.

Hoạt tính của interferon dễ bị biến đổi hoặc mất hẳn khi bị tác động của các enzyme (trypsin, pepsin) và nhiệt độ cao (60-75°C/1giờ, 100°C/5phút).

Interferon còn có tác dụng kìm hãm sự nhân lên của các virus khác nhau, nó không phải là kháng thể đặc hiệu. Interferon có tác dụng đặc hiệu với từng loại tế bào cần bảo vệ, có nghĩa là nó sẽ bảo vệ các tế bào cùng loại với tế bào đã sinh ra nó ví dụ: interferon nhận được từ tế bào của chuột chỉ có tác dụng ngăn cản virus gây bệnh trên các tế bào của chuột mà không ngăn cản virus gây bệnh cho các tế bào của gà, lợn,...

7.2.3. Cơ chế tác động của interferon

Sau khi nhiễm virus tế bào sẽ sinh ra interferon cảm ứng. Một phần lớn ra ngoài và xâm nhập vào các tế bào bên cạnh và có tác dụng bảo vệ các tế bào này khỏi bị tác động gây hại của virus đối với chúng.

Tác dụng này là do interferon đã hoạt hóa gen trong các tế bào gây nên sự tổng hợp protein kháng virus-AVP (anti viral protein) AVP có tác dụng kìm hãm sự tạo thành mARN của virus do vậy quá trình chuyển hóa acid nucleic và protein của virus không thực hiện được, do đó không có sự nhân lên.

Có giả thuyết cho rằng interferon phá hủy quá trình phosphoryl hóa và do đó làm giảm lượng ATP cần thiết để tổng hợp hạt virus trong tế bào.

Người ta đã chứng minh được interferon có tác dụng trực tiếp ngăn cản quá trình tổng hợp các thể virus, bằng cách kìm hãm sự tổng hợp ARN của virus, hoặc gián tiếp ngăn cản quá trình này bằng cách làm tổn thương sự chuyển hóa acid nucleic và protein virus.

7.2.4. Đặc điểm tác dụng của interferon

-Không có tác dụng bảo vệ tế bào gốc-tế bào đã sinh ra interferon mà chỉ bảo vệ được các tế bào bên cạnh.

- Interferon không có tác dụng ngăn cản sự hấp thụ của virus lên màng cũng như xâm nhập vào trong tế bào và cũng không có tác dụng phá hủy virus.

- Interferon không có tác dụng chống virus ở bên ngoài tế bào, mà nó chỉ có tác dụng khi vào trong tế bào và gây ra tác động gián tiếp do sinh ra AVP.

Bảng so sánh sự giống, khác nhau của interferon và kháng thể miễn dịch

So sánh	Interferon	Kháng thể
Cơ chế hình thành	Tế bào bị nhiễm virus	Tế bào có thẩm quyền miễn dịch
Cơ chế tác động	Chống acid nucleic	Chống vi khuẩn, virus, protein kháng nguyên
Bản chất	Protein	Protein
Vị trí tác dụng	Bên trong tế bào	Bên ngoài tế bào
Tính chất tác động	Trực tiếp lên virus	Trực tiếp lên virus, vi khuẩn
Tính chất đặc hiệu loài	Có	Không
Đặc hiệu chống mầm bệnh	Không	Có
Thời gian xuất hiện	Ngay sau vài giờ	Chậm sau vài ngày
Thời gian có hiệu lực	Ngắn, mất ngay	Rất lâu, vài tháng, vài năm, cả đời
Loại hình miễn dịch	Qua trung gian tế bào	Miễn dịch dịch thể
Ứng dụng	Can thiệp vaccine trực tiếp vào ổ dịch	Có tác dụng phòng bệnh bằng vaccine và kháng huyết thanh

-Câu hỏi ôn tập chương:

1. Những đặc trưng cơ bản nhất của virus.
2. Căn cứ vào acid nucleic virus phân làm những loại nào?
3. Trình bày quá trình tái tạo của virus ADN ?
4. Trình bày quá trình tái tạo của virus ARN.
5. Virus xâm nhập vào tế bào gây nên những dạng bệnh lý nào?

-Tài liệu tham khảo

1. Nguyễn Lâm Dũng, Nguyễn Đình Quyền, Phạm Văn Ty (2000). Nhà xuất bản giáo dục Hà Nội.
2. Phạm Thành Hồ (2002). Sinh học đại cương. Nhà xuất bản Đại học quốc gia thành phố Hồ Chí Minh.

3. Biên Văn Minh, Phạm Văn Ty, Kiều Hữu ảnh, Phạm Hồng Sơn, Phạm Ngọc Lan, Nguyễn Thị Thu Thủy (2006). Giáo trình vi sinh vật học. Nhà xuất bản Đại học Huế.

4. Nguyễn Vĩnh Phước(1976). Vi sinh vật học Thú y tập III. Nhà xuất bản đại học và trung học chuyên nghiệp Hà Nội.

5. Phạm Hồng Sơn (2002). Giáo trình vi sinh vật thú y. Nhà xuất bản Nông nghiệp Hà Nội.

6. Phạm Hồng Sơn(2006), Giáo trình bệnh truyền nhiễm thú y. Nhà xuất bản nông nghiệp Hà Nội.

7. Nguyễn Khắc Tuấn(1999). Vi sinh vật học, nhà xuất bản nông nghiệp Hà Nội.

8. Phạm Văn Ty (2005). Virus học. Nhà xuất bản giáo dục.

-Giải thích thuật ngữ:

-**Vero**: tế bào thận khi nuôi cấy mô dùng để phân lập virus

-**Virion**: acid nucleic được bao bọc bởi vỏ bọc protein

-**Virulence**: mức độ phát sinh bệnh nguyên virus

-**Receptor** (thụ thể): điểm tiếp nhận trên bề mặt tế bào, nơi virus bám vào.

-**Restrovirus**: virus chứa genom ARN sợi đơn, dương. Trong quá trình nhân lên có giai đoạn trung gian tạo ADN nhờ enzyme phiên mã ngược.

-**Reverse transcription**: quá trình sao chép thông tin từ ARN sang ADN.

Provirus: genom của virus cài xen vào nhiễm sắc thể tế bào.

CHƯƠNG V

NẤM (CHÂN KHUẨN HỌC) ĐẠI CƯƠNG (2 tiết)

-Giảng viên: BSTY. Nguyễn Xuân Hòa-PGS.TS. Phạm Hồng Sơn

-Tóm tắt: những kiến thức cơ bản về nấm men và nấm mốc được trình bày cô đọng trong 12 trang phục vụ cho 3 tiết giảng. Chương VI trình bày một số dạng hình thái và cấu trúc của nấm men, nấm mốc. Khác với vi khuẩn nấm thuộc nhóm vi sinh vật *Eukaryotae*. Sự đa dạng trong chu kỳ sống của chúng dẫn đến nhiều cơ chế di truyền khác nhau.

-Mục tiêu: Sinh viên cần nắm được điểm khác nhau của nấm men và nấm mốc, vai trò của chúng trong đời sống con người và chăn nuôi thú y. Nắm rõ một số chu trình phát triển điển hình để có thể thúc đẩy những nấm có lợi phát triển cũng như hạn chế những nấm có hại cho con người và động vật.

A-NẤM MEN

I. HÌNH THÁI, CẤU TẠO NẤM MEN [1]

Nấm men là loại vi sinh vật có cấu tạo đơn bào có kích thước lớn, cấu tạo hoàn chỉnh, không di động và sinh sản chủ yếu bằng phương pháp nảy chồi.

Chúng phân bố rộng rãi trong tự nhiên, nhất là trong đất, có thể nói đất là môi trường tự nhiên để dử giống nấm men đặc biệt là trên bề mặt của nhiều loại lá cây, lương thực, thực phẩm khác.

Nấm men có khả năng sinh sản nhanh chóng, sinh khối của chúng giàu protein, lipid, vitamin. Nấm men có khả năng lên men các loại đường để tạo thành rượu trong điều kiện yếm khí, trong điều kiện hiếu khí thì chúng tạo thành sinh khối tế bào, vì vậy nấm men được ứng dụng rộng rãi trong công nghiệp thực phẩm để sản xuất rượu bia, nước giải khát, men bánh mì protein sinh khối,... Tuy nhiên cũng có những loại nấm men có hại cho sản xuất, làm nhiễm các quá trình công nghệ và gây hư hỏng sản phẩm.

1.1. Hình thái, kích thước nấm men

Hình thái của nấm men thay đổi phụ thuộc tùy loại nấm men, điều kiện nuôi cấy, tuổi của ống giống, do đó nấm men có hình thái rất đa dạng: hình trứng hay hình bầu dục (*Saccharomyces*), hình bầu dục, hình tròn, hình ống dài, hình quả dưa chuột, quả chanh, hình bình hành, hình tam giác và một số hình dạng đặc biệt khác.

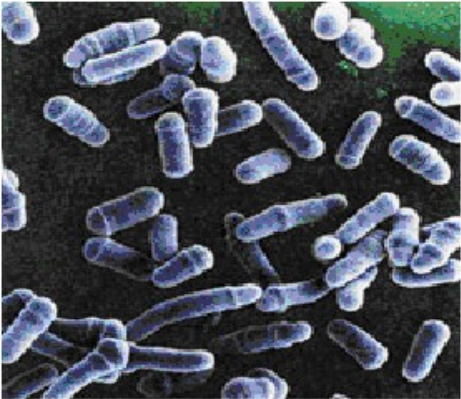
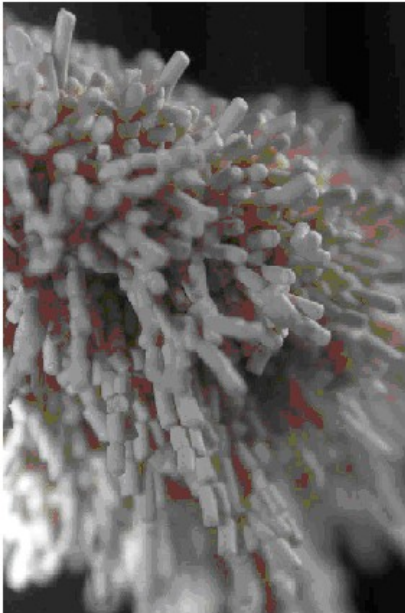
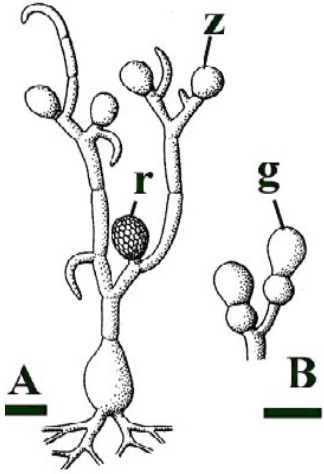
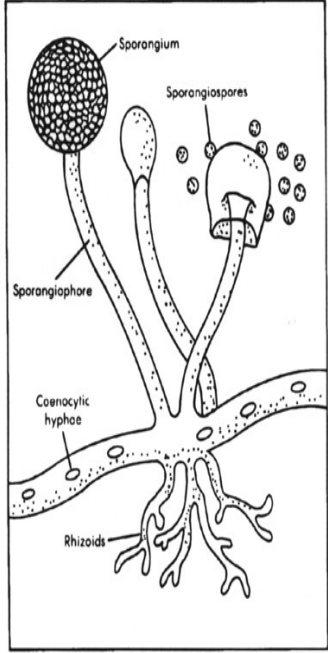
Một số loại nấm men có tế bào hình dài nối tiếp nhau thành những dạng sợi gọi là khuẩn ty thể (*Mycelium*) hoặc khuẩn ty thể giả (*Pseudomycelium*).

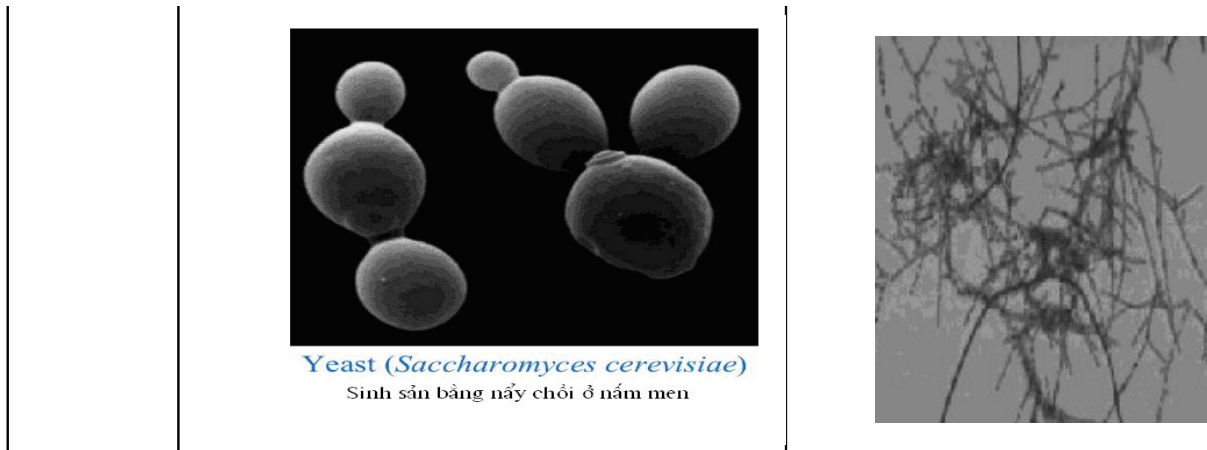
Kích thước tế bào nấm men thay đổi rất nhiều, phụ thuộc giống, loài. Nói chung kích thước của nấm men lớn hơn kích thước của tế bào vi khuẩn, trung bình khoảng 3-5 x 5-10 μ m.

Muốn quan sát và đo kích thước nấm men người ta thường nhuộm màu tiêu bản bằng dung dịch lugol, hoặc các thuốc nhuộm thông thường (fuchsine, xanh metylen) rồi dùng thước đo vật kính mà quan sát.

Phân biệt hình thái nấm men và nấm mốc [2]

Đ iễm phân biệt	Nấm men	Nấm mốc
Cơ thể	Đơn bào, thay đổi tùy loại nấm	Cơ thể phân nhánh giả đa bào, giả đa nhân

<p>Hình dạng</p>	<p>Trứng, bầu dục, tròn ổng dài, quả dưa chuột, hình bình hành, tam giác và một số hình đặc biệt khác.</p>	<p>Dạng sợi phân nhánh, sinh trưởng ở đỉnh tạo thành một đám chằng chịt các sợi.</p>
<p>Khuẩn ty</p>	<p>Chỉ một số loại có khuẩn ty hình dài nối tiếp nhau.</p>  <p>Hình dạng tế bào nấm men (phân cắt)</p>  <p>Dạng bào tử đốt</p>	<p>Sợi nấm phân nhánh, phát sinh từ bào tử. 1-Sợi nấm hình lò xo, xoắn ốc, quấn queo xoắn tròn lại. 2- Hình đốt quấn chặt nhau thành một khối. 3-Hình vệt, một đầu to và cong. 3- Hình sừng hươu. 4- Hình lược, lá dừa.</p>  <p>Hình thái nấm mốc</p> 



2.2. Cấu tạo tế bào nấm men[4]

Tế bào nấm men có cấu tạo gần giống tế bào vi khuẩn, tuy có cấu tạo đơn bào nhưng cũng mang đầy đủ tính chất của một cơ thể sống, chúng có cấu tạo từ màng, nguyên sinh chất và nhân gồm các phần sau:

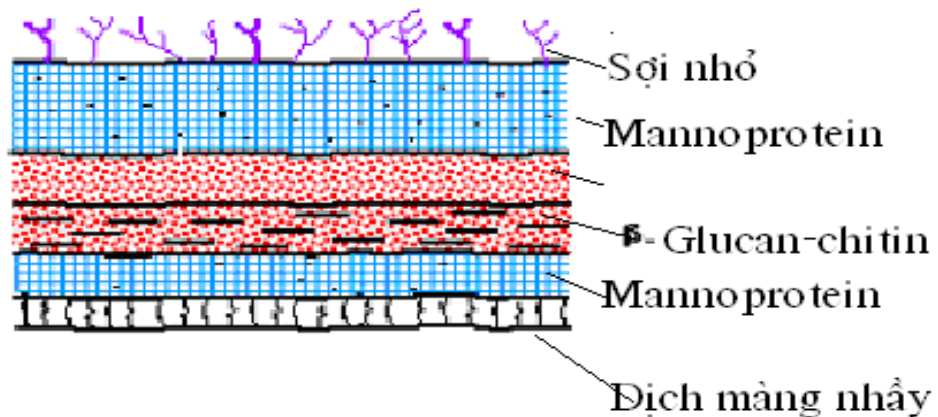
Cấu tạo tế bào nấm men



2.2.1. Thành tế bào

Có cấu trúc nhiều lớp như vỏ vi khuẩn nhưng thành phần hóa học chủ yếu là glycan (cấu tạo bởi các gốc D-glucoza) và mannan (D-manoza). Tỷ lệ Glucan và manan chiếm 90% trọng lượng vỏ trong đó mannan cao thấp hoặc không có. Thành phần khác có protein 6-7%, hexozamin và phần còn lại là lipid, poliphosphat, các chất chứa kitin.

Cấu trúc vách tế bào nấm men



2.2.2. Màng tế bào

Tương tự như màng nguyên sinh chất tế bào vi khuẩn về thành phần cấu tạo và chức năng tác dụng. Ngoài ra màng tế bào nấm men còn hoạt hóa ty thể.

2.2.3. Nguyên sinh chất

Thành phần hóa học, cấu trúc nguyên sinh chất tương tự như vi khuẩn nhưng sự khác nhau chủ yếu là sự tồn tại vài loại cơ quan con khác. Nguyên sinh chất của nấm men gồm có các cơ quan con sau:

a-Ty thể (*Mitochondria*)

Khác với tế bào vi khuẩn nấm men đã có ty thể. Đây là những thể hình cầu, hình que, hình sợi nhưng hình dạng và số lượng có thể thay đổi khác nhau phụ thuộc vào điều kiện nuôi cấy và trạng thái sinh lý tế bào. Là những thể hình cầu, hình que, hình sợi, kích thước 0,2-0,5 x 0,4-1 μm luôn luôn di động và tiếp xúc với các cấu trúc khác của tế bào. Hình dạng và số lượng ty thể thay đổi phụ thuộc vào điều kiện nuôi cấy và trạng thái sinh lý tế bào.

Cấu tạo ty thể gồm hai lớp màng: *Lớp màng trong* có hình lượn sóng hay hình răng lược để tăng diện tiếp xúc với cơ chất, trong có chứa dịch. Giữa hai lớp có các hạt nhỏ bám trên màng là những hạt cơ bản. Bên trong ty thể là chất dịch hữu cơ.

Chức năng của ty thể: nó được coi như là trạm năng lượng của tế bào nấm men.

+ Nó tham gia vào việc thực hiện các phản ứng oxy hóa giải phóng năng lượng ra khỏi cơ chất, làm cho năng lượng được tích lũy dưới dạng ATP.

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

+ Tham gia vào việc tổng hợp một số hợp chất protein, lipid, hydratcacbon, những hợp chất này tham gia vào cấu tạo màng tế bào.

Ngoài ra ty thể còn chứa nhiều loại men khác nhau như: oxidase, cytochromoxidase, peroxidase, phosphatase,...

b, Ribosome: số lượng ribosome thường thay đổi tùy thuộc từng loài, từng giai đoạn phát triển và từng điều kiện nuôi cấy. Khác với vi khuẩn nấm men có hai loại ribosome trong nguyên sinh chất của nấm men:

Loại 70S (30S và 40S) tồn tại chủ yếu trong ty thể, loại 80S tồn tại chủ yếu trong mạng lưới nội chất và một số ít tồn tại ở trạng thái tự do. Loại 80S có hoạt tính tổng hợp protein mạnh hơn.

c, Không bào: mỗi tế bào nấm men có một không bào khá lớn và nhiều không bào nhỏ có tác dụng điều hòa áp suất thẩm thấu, tham gia vào quá trình trao đổi chất tế bào vì nó chứa nhiều hợp chất hữu cơ ở trạng thái trung gian, nó được coi như những phần dự trữ quan trọng của tế bào, nó tham gia vào các quá trình điều hòa các quá trình sinh trưởng và phát triển của tế bào nấm.

Hạt dự trữ: hạt lipid, hạt glycogen và một ít hạt tinh bột khác.

2.2.4. Nhân [1]

Nhân của tế bào nấm men là nhân thật, nhân đã có sự phân hóa, có kết cấu hoàn chỉnh và ổn định, có màng nhân. Nhân có hình tròn hay hình bầu dục, bắt đầu có những biểu hiện của tế bào tiến hóa, đó là phân chia theo hình thức gián phân. Màng nhân, gồm hai lớp có nhiều lỗ thủng (ở tế bào nấm men già, trên mỗi tế bào có khoảng 200 lỗ chiếm 6-8 % diện tích màng), trong có chất nhân, hạch nhân và các nhiễm sắc thể (Chromosome). Như vậy tế bào nấm men thuộc sinh vật cao đẳng. Thành phần hóa học quan trọng nhất của nhân là nucleoprotein và các enzyme. Nhân có vai trò chủ yếu là mang hệ thống thông tin di truyền chứa trong ADN, điều khiển việc tổng hợp các protein của mỗi loài, điều khiển việc tổng hợp các enzyme điều khiển hoạt động của enzyme và nhiều hoạt động sống khác của tế bào.

Muốn quan sát nhân tế bào nấm men người ta thường xử lý tiêu bản bằng dung dịch picric acid, dung dịch $\text{FeNH}_4(\text{SO}_4)$ 3% và dung dịch hematoxylin 10% khi đó nguyên sinh chất sẽ nhuộm màu tro còn nhân nhuộm thành màu đen.

2.4. Plasmid

Có một loại plasmid được phát hiện năm 1976 ở nấm men *Saccharomyces cerevisiae* được gọi là "2 μ m plasmid" có vai trò quan trọng trong thao tác chuyển gen của kỹ thuật di truyền. Loại plasmid này là một ADN vòng chứa 6300 đôi base.

Trong một số tế bào nấm men còn có các vi thể. Đó là các thể hình cầu hay hình trứng, đường kính 3 μ m, chúng phủ một lớp màng dày khoảng 7nm. Và thường có vai trò nhất định trong quá trình oxy hóa metanol.

3. Sinh sản của nấm men [4]

3.1. Sinh sản vô tính

a, Sinh sản bằng phương pháp nảy chồi

Khác với các loại nấm khác, nảy chồi là phương pháp sinh sản phổ biến nhất ở nấm men. Khi tế bào nấm men trưởng thành bắt đầu nảy ra một chồi nhỏ, chồi lớn dần lên, một phần nhân tế bào mẹ được chuyển sang chồi sau đó tách hẳn ra thành nhân mới. Đến một lúc nào đó tế bào mới sinh ra sẽ tạo đủ vách ngăn cách hẳn với tế bào mẹ. Trên mỗi tế bào mẹ có thể sinh ra một vài chồi nhỏ ở những vị trí khác nhau. Tế bào con sau khi tạo thành sẽ tách khỏi tế bào mẹ hoặc dính trên tế bào mẹ và tiếp tục nảy sinh các chồi mới. Nhiều thể hệ nấm men có thể dính với nhau tạo thành một đám phân nhánh như xương rồng. Muốn quan sát quá trình nảy chồi của tế bào nấm men, người ta dùng phương pháp "giọt treo", dùng phiến kính có hốc lõm và lá kính mang 1 giọt dịch nuôi cấy nấm men.

Ở điều kiện thuận lợi nấm men sinh sôi nảy nở nhanh, quan sát dưới kính hiển vi thấy, hầu hết tế bào nấm men đều có chồi. Khi một chồi xuất hiện, các enzyme thủy phân sẽ làm phân giải phần polysaccharid của thành tế bào làm cho chồi chui ra khỏi tế bào, vật chất mới được tổng hợp sẽ được huy động đến chồi và làm chồi phình to dần lên, khi đó sẽ xuất hiện một vách ngăn giữa chồi và tế bào mẹ, thành phần của vách ngăn cũng giống như thành tế bào. Khi tế bào chồi tách khỏi tế bào mẹ, ở chỗ tách ra còn giữ lại một sẹo của chồi, trên tế bào mẹ mang một vết sẹo, các vết sẹo này có thể thấy rõ khi nhuộm màu calcofluor hoặc primulin rồi quan sát dưới kính hiển vi huỳnh quang.

b, Sinh sản bằng phương pháp phân cắt:

Ngoài nảy chồi, một số nấm men còn sinh sản vô tính bằng cách phân cắt nhờ vách ngăn ngang giống như vi khuẩn, tế bào dài ra sau đó sinh ra những vách ngăn đặc biệt và phân cắt thành nhiều tế bào.

c, Sinh sản bằng bào tử đơn tính

Bào tử được hình thành từ một tế bào riêng rẽ không thông qua tiếp hợp. Sự hình thành bào tử loại này có nét giống sự hình thành nội bào tử của một số vi khuẩn có sinh bào tử nhưng khác ở chỗ, trong túi nấm hình thành nhiều bào tử hơn.

+Bào tử đốt: ở chi *Geotrichum*

+Bào tử bắn: ở chi *Sporobolomyces*, *Sporidiobolus*, *Bullera*. Loại bào tử này có hình thận được sinh ra trên một cuống nhỏ mọc ở các tế bào dinh dưỡng hình trứng. Sau khi bào tử chín nhờ một cơ chế đặc biệt bào tử sẽ được bắn ra phía đối diện. Khi cây nấm men trên thạch nghiêng theo một đường cây ziczắc, ít hôm sau sẽ thấy trên thành ống nghiệm phía đối diện với thạch nghiêng có một đường ziczắc khác do bào tử bắn ra.

+Bào tử áo hay bào tử màng dày: thường được sinh ra từ các khuẩn ty giả ở nấm *Candida albicans*

3.2. Sinh sản hữu tính

Sinh sản bằng bào tử túi

Bào tử túi được sinh ra trong các túi. Hai tế bào khác giới (mang dấu + và -) đứng gần nhau sẽ mọc ra hai mầm lồi. Chúng tiến lại với nhau và tiếp nối với nhau. Chỗ tiếp nối sẽ tạo ra một lỗ thông và qua đó chất nguyên sinh có thể đi qua để phối chất, nhân cũng đi qua để tiến hành phối nhân, sau đó nhân phân cắt thành 2, 4, 8. Mỗi nhân được bọc bởi chất nguyên sinh rồi tạo thành màng dày chung quanh và hình thành các bào tử túi. Tế bào dinh dưỡng biến thành túi.

Túi có thể được hình thành theo 3 phương thức:

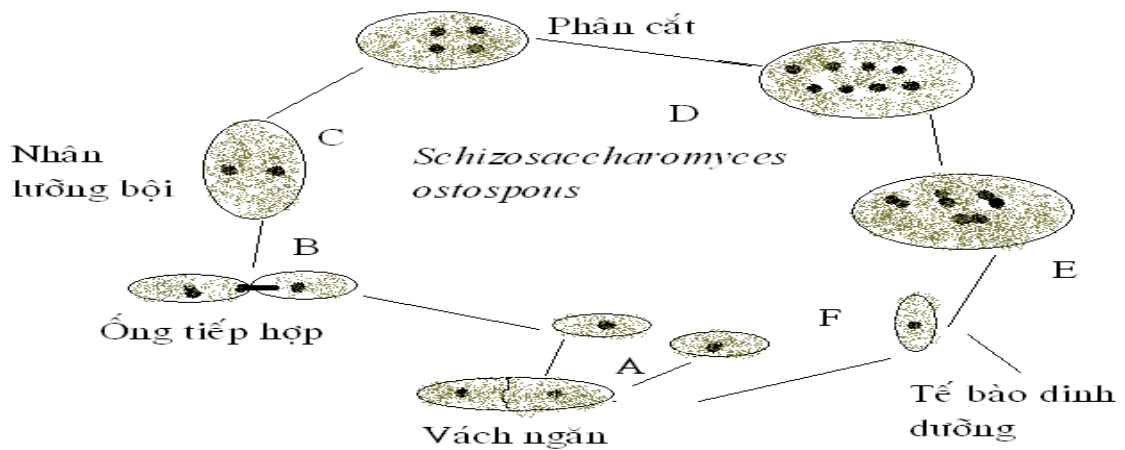
1. *Tiếp hợp đẳng giao*: do hai tế bào nấm men có hình thái, kích thước giống nhau tiếp hợp với nhau mà tạo thành. Ví dụ: *Schizosaccharomyces*, *Debaryomyces*.

2. *Tiếp hợp dị giao*: hai tế bào nấm men có hình thái, kích thước không giống nhau tiếp hợp với nhau mà thành. Ví dụ: *Nadsonia*.

Bào tử túi sau khi ra khỏi túi gặp điều kiện thuận lợi sẽ phát triển thành các tế bào nấm men mới.

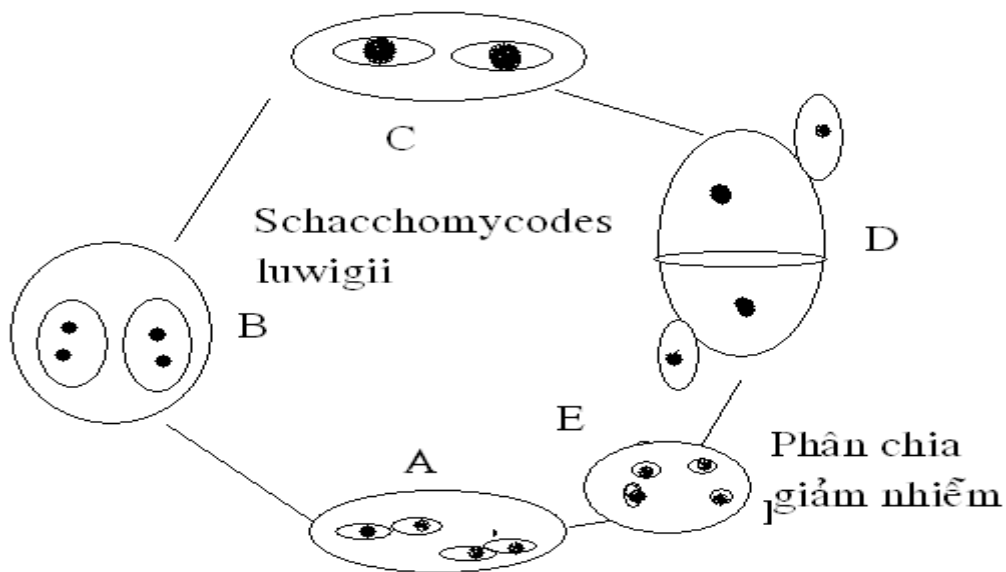
Chu trình phát triển của một số loại nấm men điển hình:

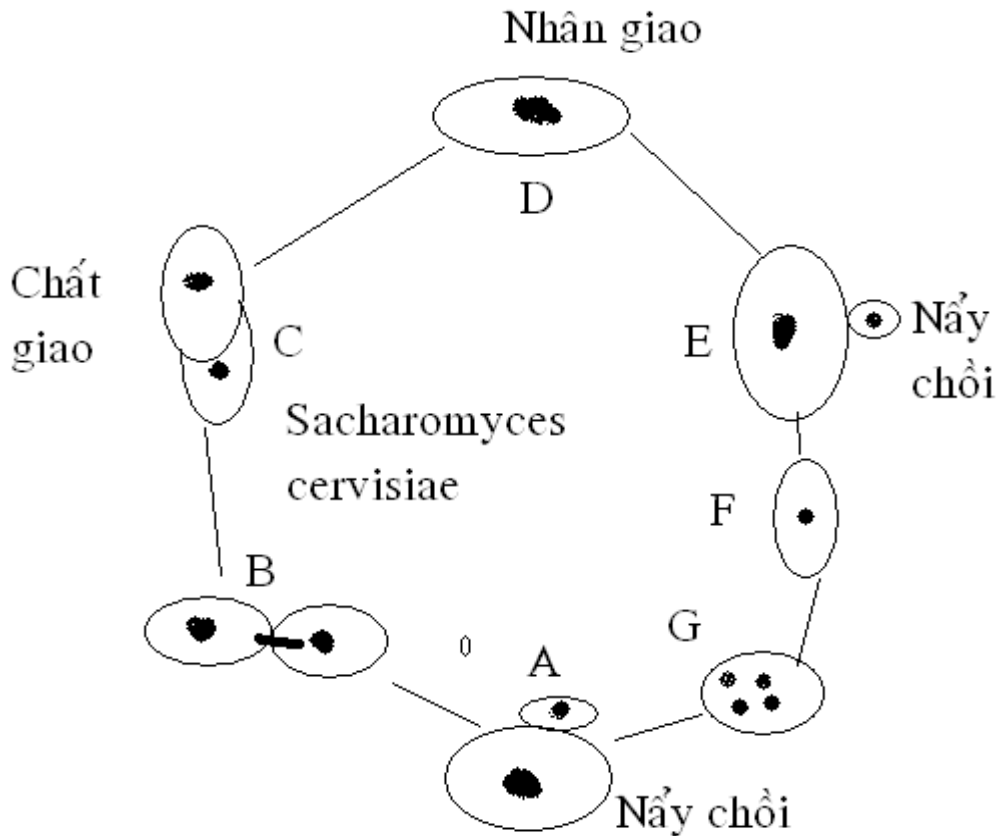
-*Schizosaccharomyces octospous*: tế bào sinh dưỡng đơn bội phân cắt nhờ vách ngăn ngang (A). Hai tế bào dinh dưỡng tiếp xúc với nhau và hình thành ống tiếp hợp (B). Nhân 2 tế bào hợp lại với nhau thành nhân lưỡng bội phân cắt 3 lần, lần thứ nhất là phân cắt giảm nhiễm (D). Tám tế bào đơn bội được sinh ra (e). Túi vỡ và giải phóng bào tử túi ra ngoài (F). Mỗi bào tử túi lại phát triển thành tế bào dinh dưỡng.



-*Schacchomycodes ludwigii*: từng cặp bào tử đơn bội kết hợp với nhau ngay trong túi. Xảy ra phối hợp tế bào chất (chất giao, nhân giao) (b) tế bào lưỡng bội sinh ra sẽ sinh ra nảy mầm và chui qua màng túi (c). Tế bào dinh dưỡng lưỡng bội tiếp tục sinh sôi nảy nở theo lối nảy chồi (d). Nhân trong tế bào dinh dưỡng phân chia giảm nhiễm tế bào biến thành túi chứa 4 bào tử túi (e).

-*Sacharomyces cervisiae*: tế bào dinh dưỡng đơn bội sinh sôi nảy nở theo lối nảy chồi (a). Hai tế bào kết hợp với nhau (b), xảy ra quá trình chất giao (c), nhân giao (d) để tạo ra các tế bào dinh dưỡng lưỡng bội. Tế bào dinh dưỡng lưỡng bội nảy chồi sinh ra những tế bào lưỡng bội khác (e). Tế bào dinh dưỡng lưỡng bội biến thành túi, phân cắt giảm nhiễm sinh ra 4 bào tử túi (f). Bào tử túi biến thành tế bào dinh dưỡng (g) theo lối nảy chồi.





4. Vai trò của nấm men

Nấm men phân bố rộng rãi trong tự nhiên, nhất là trong môi trường chứa đường, pH thấp (đất, nước, không khí, lương thực, thực phẩm, hoa quả,...), nhiều loại nấm men có khả năng lên men rượu vì vậy từ lâu người ta đã biết sử dụng nấm men để nấu rượu, bia, sản xuất cồn, glicerol,... Nấm men sinh sản nhanh, sinh khối của chúng giàu protein, vitamin vì vậy còn được sử dụng trong công nghiệp sản xuất thức ăn bổ sung cho người và gia súc.

Nấm men được sử dụng làm bột nở bánh mì, gây hương nước chấm, một số dược phẩm và gần đây còn được sử dụng để sản xuất lipid.

Bên cạnh những nấm men có ích cũng có những loại nấm men gây bệnh cho người và gia súc, làm hỏng lương thực, thực phẩm,...

5. Phân loại nấm men[5]

Theo hiểu biết hiện nay (I. Lodder, 1971, Macmilan, 1973) thì nấm men bao gồm 349 loài nấm khác nhau. Chúng thuộc 39 giống nấm, căn cứ vào khả năng sinh bào tử mà có thể chia thành 4 nhóm chính sau đây:

1- Nhóm nấm men có bào tử túi (ascospurus): gồm 22 giống khác nhau, thuộc lớp nấm túi.

2- Nhóm gần gũi với nấm đảm gồm 4 giống. Chúng có chu trình tương tự với các nấm thuộc bộ *Ustilaginales* của lớp nấm đảm.

3- Nhóm nấm men có bào tử trần: gồm có 3 giống thuộc họ *Sporiliomycetaceae*.

4- Nhóm nấm men không sinh bào tử: Một số giống sinh nội bào tử vô tính gồm 12 giống thuộc về lớp nấm bất toàn.

B-NẤM MỐC [3]

I. HÌNH THÁI CẤU TẠO CỦA NẤM MỐC

1.1. Đặc điểm hình thái

Nấm mốc là nhóm vi sinh vật có kết cấu dạng sợi phân nhánh. Tế bào cấu tạo hoàn chỉnh, kích thước lớn, có thể là đơn bào đa nhân hoặc đa bào đơn nhân.

1.2. Cấu tạo của nấm mốc

Nấm mốc được cấu thành bởi hai bộ phận: sợi nấm (khuẩn ty) và bào tử.

1.2.1. Khuẩn ty

Là các sợi nấm mọc ra từ bào tử, phân nhánh sinh trưởng tạo ra một mạng sợi nấm chằng chịt gọi là khuẩn ty thể. Kích thước chiều ngang 3-10 μ và chúng có các hình thái khác nhau tùy theo loại mốc, điển hình là: hình lo xo hay hình xoắn ốc, hình cái vợt một đầu to và cong, hình đốt quần chặt vào nhau thành khối chặt, hình sừng hươu, hình răng lược hay hình lá dứa.

Căn cứ vào vị trí chức năng của khuẩn ty có thể phân 3 loại:

1. **Khuẩn ty cơ chất**: phát triển sâu vào môi trường làm nhiệm vụ hấp thu dinh dưỡng nên còn gọi là khuẩn ty dinh dưỡng tồn tại ở hai dạng là:

-**Thể đệm (stroma)**: giống như một cái đệm ghế, cấu tạo bởi nhiều khuẩn ty bện chặt với nhau.

-**Hạch nấm (Sklerotium)**: có hình hơi tròn không đều bên trong là tổ chức sợi xốp.

2. Khuẩn ty khí sinh

Sợi nấm mọc lộ trên mặt môi trường từ bên trong hoặc bên trên thể đệm hay hạch nấm.

3. Khuẩn ty sinh sản

Phát triển từ một khuẩn ty khí sinh, phần đầu phát triển trong chứa bào tử.

1.2.2. Bào tử

Là tế bào sinh sản được hình thành bằng phương thức sinh sản vô tính hay hữu tính. Kết quả của sự sinh sản vô tính hay hữu tính sẽ sinh ra các loại bào tử khác nhau. Mỗi loại nấm mốc có thể cho ra một hay vài loại bào tử.

1.2.2.1. Bào tử vô tính

Bào tử đốt (actrospore): các khuẩn ty sinh sản có sự ngắt đốt, mỗi một đốt được coi như một bào tử, rơi vào môi trường sẽ phát triển thành một khuẩn ty mới.

Bào tử màng dây (chlamyospore): trên các đoạn của khuẩn ty sinh sản xuất hiện các phần lồi hình tròn hay hơi tròn có màng dây bao bọc.

Bào tử nang (sporangiospore): trên các đoạn của khuẩn ty sinh sản phình to dần hình thành một cái bọc hay gọi là nang, trong bọc chứa nhiều bào tử.

Bào tử đỉnh (Conidium): nhiều loài nấm có hình thức sinh sản này, các bào tử được hình thành tuần tự, liên tiếp từ khuẩn ty sinh sản. Phần lớn bào tử đỉnh là nội sinh -được sinh ra từ bên trong.

Bào tử đỉnh có thể được hình thành theo ba kiểu phát sinh khác nhau:

-*Kiểu thứ nhất* là sự cắt đứt của các khuẩn ty sinh sản tạo ra bào tử đính hay bào tử đốt.

-*Kiểu thứ hai* là sự nảy chồi từ phía đầu của sợi nấm sinh sản khác do sợi nấm sinh sản biến đổi thành. Bào tử đính sinh ra lại tiếp tục nảy chồi để sinh ra các bào tử mới tạo thành chuỗi hay khối bào tử.

-*Kiểu thứ ba* là sự sinh bào tử liên tiếp từ thể sinh sản, các bào tử đính mới sinh ra đẩy các bào tử cũ ra ngoài để tạo thành chuỗi bào tử mà càng gần gốc thì bào tử càng non.

1.2.1.2. Bào tử hữu tính:

Được hình thành do sự sinh sản hữu tính (bao gồm hiện tượng chất giao, nhân giao và phân bào giảm nhiễm) của nấm. Do cách thức sinh sản khác nhau mà tạo thành các loại bào tử khác nhau:

+*Bào tử noãn*: đầu tiên có sự xuất hiện noãn khí trên đỉnh các sợi nấm sinh sản. Noãn khí chín trong chứa nhiều noãn cầu. Hùng khí (là cơ quan giao tử đực) được sinh ra gần gần noãn khí sẽ tiến đến gần để tiếp xúc với noãn khí.

Sau khi tiếp xúc hùng khí sẽ sinh 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 có màng bao bọc và sau sau một thời gian phân chia giảm nhiễm sẽ phát triển thành một khuẩn ty mới.

+*Bào tử tiếp hợp*: khi hai khuẩn ty khác giống gần nhau sẽ xuất hiện hai mấu lồi được gọi là nguyên phôi nang (progametangia), hai mấu lồi có sự tiếp xúc và có sự xuất hiện vách ngăn tách hai phần đầu của hai mấu lồi thành hai tế bào đa nhân-hai tiểu giao tử tiếp hợp tạo thành một hợp tử có màng dày bao bọc được gọi là bào tử tiếp hợp. Sau một thời gian sống tiềm tàng, bào tử tiếp hợp sẽ nảy mầm phát triển thành một nang chứa nhiều bào tử.

+*Bào tử túi*: trên một khuẩn ty đơn bội sinh ra hai cơ quan sinh sản là túi giao tử đực hình ống-hùng khí và túi giao tử cái hình thành ở một đầu của khuẩn ty, phía trên thể sinh túi có một ống dài gọi là sợi thụ tinh.

Khi hùng khí tiếp xúc với sợi thụ tinh thì khối nguyên sinh chất chứa nhiều nhân của hùng khí sẽ qua sợi thụ tinh để vào thể sinh túi và nguyên sinh chất sẽ có sự phối hợp với nhau. Các nhân sắp xếp với nhau từng đôi một (đực, cái). Trên thể sinh túi sẽ mọc ra nhiều sợi sinh túi, các nhân kép được chuyển vào trong các sợi sinh túi từng phần sẽ phân chia nhiều lần và hình thành vách ngăn làm cho sợi sinh túi sẽ 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 ra 4 nhân sau đó tế bào này tách ra thành 3 tế bào tế bào giữa chứa hai nhân, tế bào gốc và ngọn chứa 4 nhân. Tế bào giữa hình thành túi bào tử. Tế bào ngọn và gốc sau này sẽ tiếp hợp thành một tế bào hai nhân, sau đó phát triển thành một túi mới.

Bào tử túi sẽ dài ra, hai nhân sẽ hợp thành một nhân lưỡng bội. Sau đó phân chia liên tiếp hai lần để tạo thành 8 nhân đơn bội. Các nhân kết hợp với một phần nguyên sinh chất và có màng bọc tạo thành bào tử túi. Tuy theo loại nấm mà số lượng, hình dạng, kích thước màu sắc bào tử túi sẽ khác nhau, khi bào tử thoát ra ngoài thì nảy mầm.

+*Bào tử đảm (basidiospore)*

Khi hai khuẩn ty đơn bội khác tính tiếp cận nhau thì trên một khuẩn ty sẽ xuất hiện một ống nối với khuẩn ty kia, nhân và nguyên sinh chất qua ống nối cũng được chuyển qua khuẩn ty ấy để tạo thành khuẩn ty thứ cấp có chứa hai nhân.

Khi tế bào ở đầu khuẩn ty này chuẩn bị phân cắt thì đoạn giữa hai nhân xuất hiện một ống nhỏ mọc hướng về chồi gốc của tế bào, một nhân sẽ chui vào trong ống và từng nhân phân chia tạo thành 4 nhân con, sau đó xuất hiện hai vách ngăn tạo ra 3 tế bào: một tế bào hai

-Câu hỏi ôn tập chương:

1. So sánh đặc điểm hình thái của nấm men và nấm mốc.
2. Điểm khác nhau cơ bản trong cấu trúc nấm và vi khuẩn.
3. Kể tên một số nấm có lợi và một số tên nấm có hại cho con người động vật
4. Các phương thức sinh sản của nấm men.

-Tài liệu tham khảo:

1. Nguyễn Lâm Dũng, Nguyễn Đình Quyến, Phạm Văn Ty (2000). Nhà xuất bản giáo dục Hà Nội.
2. Phạm Thành Hồ (1999). Di truyền học. Nhà xuất bản giáo dục, trang 320-422.
3. Biền Văn Minh, Phạm Văn Ty, Kiều Hữu ảnh, Phạm Hồng Sơn, Phạm Ngọc Lan, Nguyễn Thị Thu Thủy (2006). Giáo trình vi sinh vật học. Nhà xuất bản Đại học Huế.
4. Nguyễn Vĩnh Phước(1976). Vi sinh vật học Thú y tập III. Nhà xuất bản đại học và trung học chuyên nghiệp Hà Nội.
5. Nguyễn Khắc Tuấn(1999). Vi sinh vật học, nhà xuất bản nông nghiệp Hà Nội.

-Giải thích thuật ngữ:

-Nhân chuẩn: nhân có cấu trúc hoàn thiện có sự phân hóa hạch nhân và chất nhân

-Nhân sơ: nhân chưa có màng nhân

-Plasmid: ADN dạng vòng kín hai mạch nhỏ tồn tại trong nguyên sinh chất và hoạt động độc lập với nhiễm sắc thể của tế bào.

Schizosaccharomyces octospous: loài nấm men có chu trình ưu thế đơn bội

-*Schacchomycodes ludwigii:* loài nấm men có chu trình ưu thế lưỡng bội

-*Sacharomyces cervisiae:* loài nấm men có chu trình đơn bội

CHƯƠNG VI-DI TRUYỀN HỌC VI KHUẨN (8 tiết)

BSTY. Nguyễn Xuân Hòa – PGS. TS. Phạm Hồng Sơn

-Tóm tắt: Trong một thời gian dài, các nghiên cứu di truyền học được tiến hành ở các sinh vật nhân thực (*Eukaryote*), còn ở vi khuẩn (*Prokaryote*) thì chưa vì cho rằng không có sinh sản hữu tính. Tuy nhiên vào những năm 40, tái tổ hợp ở vi khuẩn đã được chứng minh. Những nghiên cứu về biến nạp, tải nạp và giao nạp có ý nghĩa quan trọng cho sự phát triển của di truyền học phân tử và góp phần xây dựng kỹ thuật lắp ghép gen. Những kiến thức cơ bản về di truyền học vi khuẩn được viết tóm tắt với các hình ảnh minh họa sinh động trong 26 trang phục vụ cho 8 tiết giảng.

-Mục tiêu: Sinh viên cần nắm được các khái niệm, cơ chế, điều kiện để xảy ra hiện tượng về biến nạp, tải nạp và giao nạp trong nghiên cứu di truyền vi khuẩn.

Về đặc tính di truyền và biến dị ở vi khuẩn người học cần nắm vững, hiện tượng biến dị về hình thái, màu sắc, kích thước khuẩn lạc. Nguyên nhân và biểu hiện đột biến ở vi khuẩn.

Di truyền: là đặc tính chung của mọi sinh vật, giữ lại và truyền cho con cháu những đặc điểm về cấu tạo và phát triển của tổ tiên.

Biến dị: là đặc tính chung của mọi sinh vật, có thể mang những sự khác biệt về nhiều chi tiết so với bố mẹ của chúng và với các cá thể khác cùng loài.

Đối tượng nghiên cứu của di truyền học không phải chỉ hiện tượng di truyền mà cả biến dị. Tính biến dị có vẻ như một đặc tính độc lập với tính di truyền nhưng thực ra, sự khác biệt giữa các cá thể trong cùng một loài trong nhiều trường hợp đều liên quan đến những biến đổi cơ sở vật chất di truyền của sinh vật.

Ở vi sinh vật, biến dị thể hiện ở mức độ lớn hơn sinh vật bậc cao, nhờ số các cá thể trong một quần thể lớn, sinh sản đồng loạt, giai đoạn sinh dưỡng ngắn, tần số đột biến và tần số tái tổ hợp cao và có khả năng trao đổi di truyền ngoài loài.

Dù cơ chế xuất hiện biến dị và di truyền như thế nào đi nữa, ở phần lớn trường hợp đều tạo ra một sự thích ứng tốt nhất với điều kiện ngoại cảnh.

Người ta phân biến dị làm hai loại, biến dị kiểu gen và biến dị kiểu hình.

Biến dị kiểu hình: là sự thích ứng của toàn bộ một quần thể có cùng một kiểu gen. Hiệu quả của sự biến dị này là sự hoạt động của các gen, lệ thuộc vào những điều kiện cụ thể của ngoại cảnh. Sự biến dị này, có thể đảo ngược lại, không bền và không có tính di truyền.

Biến dị kiểu gen hay đột biến: là sự thay đổi đột ngột một tính chất, mà tính chất này có thể di truyền được. Giữa một quần thể đồng nhất, người ta thấy xuất hiện bất thường biến chủng, nghĩa là một cá thể khác, có thể di truyền cho thế hệ sau tính chất khác với type bình thường. Toàn bộ các thế hệ sau, sinh ra từ một cá thể đột biến hình thành một chủng mới.

II. CƠ SỞ VẬT CHẤT DI TRUYỀN CỦA VI KHUẨN [1]

2.1. ADN nhiễm sắc thể, ARN và protein

Cũng như các sinh vật khác, mỗi vi sinh vật đều giống tổ tiên ở hầu hết các đặc điểm qua nhiều thế hệ. Đơn vị thông tin di truyền là gen. Gen là một đoạn ADN đảm nhiệm một chức năng nhất định trong quá trình truyền thông tin di truyền. Ở vi khuẩn, thông tin di truyền nằm trong ADN, còn một số loại virus, thông tin di truyền nằm trong ARN. Phần lớn gen nằm trong nhân tế bào, nhưng cũng gặp những gen nằm ngoài nhiễm sắc thể như Plasmid (Plasmid F, Plasmid R,...). Mọi sinh vật, trừ một số virus, dòng thông tin di truyền từ nhiễm sắc thể đến tế bào chất diễn ra như sau:

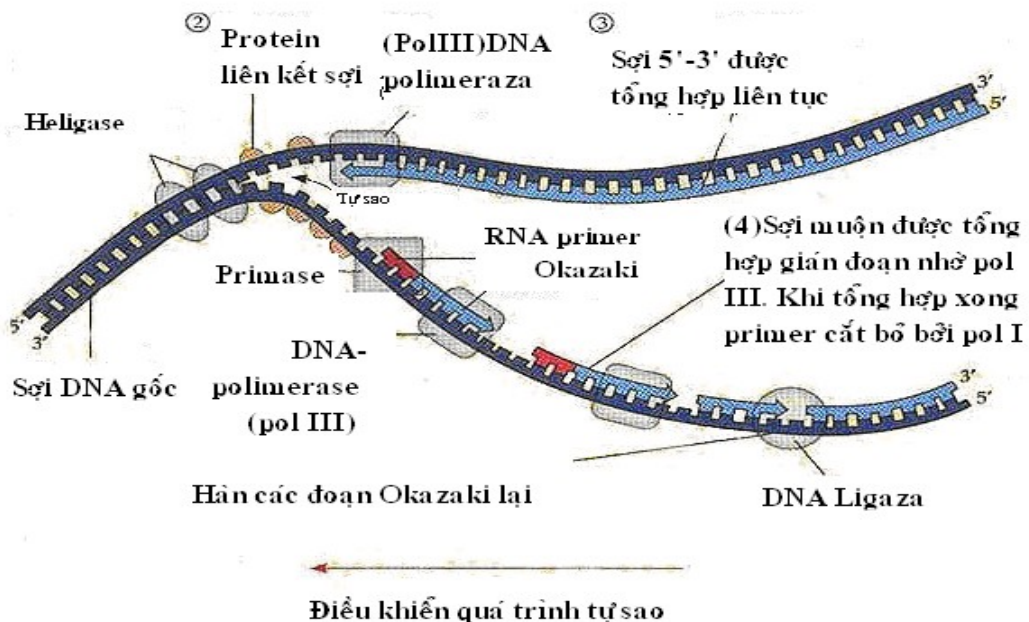
ADN → ARN → Protein

Bản chất của hiện tượng di truyền là ADN hoặc ARN có khả năng tự nhân lên, quá trình này được gọi là quá trình tự sao chép. Sau đó ADN được dùng để làm khuôn tổng hợp ARN trong quá trình phiên mã. Một số loại virus thông tin di truyền nằm trong ARN vì vậy để có thể lắp genom của bản thân vào NST của tế bào chủ, virus phải tổng hợp ra ADN trung gian từ sợi khuôn ARN. Quá trình này được gọi là quá trình phiên mã ngược, cuối cùng, sinh tổng hợp protein diễn ra trên phức hợp bao gồm sợi mRNA, ribosom.

2.1.1. Sao chép (tự sao) [2]

Là quá trình tổng hợp vật chất di truyền (ADN ở các vi sinh vật hoặc ARN của một số virus).

Về cơ bản quá trình sao chép ADN ở mọi tế bào vi sinh vật giống nhau. Nhưng quá trình này được nghiên cứu chi tiết nhất ở vi khuẩn *E. coli*. Gen của vi khuẩn *E. coli* là một sợi ADN kép, đóng vòng kín. Sao chép bắt đầu ở một gốc (Oric) và diễn ra liên tục cho đến kết thúc. Một đơn vị vật chất di truyền có khả năng tự sao chép từ đầu đến cuối như vậy gọi là một replicon. Sau khi một số protein nhận ra điểm gốc Oric, hai sợi ADN sẽ tách ra thành hai chạc sao chép, ở đây ADN được tổng hợp theo hai hướng đối nhau.



Sao chép ở *E. coli* diễn ra như sau:

1. Một số protein nhận ra gốc Oric và cởi xoắn ở đây
2. Hai phân tử helicase gắn vào hai đoạn sợi đơn và tiếp tục cởi xoắn
3. Các protein liên kết sợi đơn (SSB) tiếp với hai đoạn sợi đơn sau helicase
4. Trên sợi khuôn 3'-5' primase tổng hợp một ngòi duy nhất, sau đó pol-III lắp tiếp các nucleotit vào đầu 3'-OH của ngòi. Sợi con được sao chép liên tục và được gọi là sợi dẫn đầu.
5. Trên sợi khuôn đối diện, primase phải tổng hợp nhiều ngòi, pol-III lắp tiếp các nucleotit vào đầu 3'-OH của mỗi ngòi lại tạo thành các đoạn ADN khoảng 1000-2000 nucleotit gọi là đoạn Okazaki.

6. Pol-I cắt bỏ ngòi đồng thời sao chép bổ sung các đoạn Okazaki đứng sau.

7. Enzyme ligase "hàn" các chỗ hổng giữa các đoạn Okazaki.

Như vậy sợi con được tạo thành trên sợi khuôn 5'-3' được sao chép theo kiểu gián đoạn và được gọi là sợi muộn.

2.1.2. Phiên mã

Quá trình phiên mã cũng diễn ra theo hướng 5' - 3'. Ở *E. coli* enzyme xúc tác cho quá trình phiên mã cả ba loại ARN là ARN- polymerase và gồm có 5 chuỗi peptide: 2α ; β ; β' ; σ (xích ma), 4 chuỗi đầu gắn chặt với nhau ($2\alpha\beta\beta'$) và đều có hoạt tính polymerase gọi là enzyme tối thiểu. Chuỗi σ gắn lỏng lẻo vào enzyme tối thiểu, hướng dẫn enzyme này gắn chặt và chính xác vào vị trí mở đầu của mỗi gen (promotor).



Khác với sao chép, phiên mã chỉ diễn ra trên một sợi, thậm chí trên từng đoạn của sợi khuôn ADN. Hơn nữa ARN-polymerase không cần ngòi và cũng không có hoạt tính nuclease. Phiên mã ở *E. coli* diễn ra như sau:

1. Nhờ sợi "dẫn đường" của yếu tố σ (xích ma) ARN-polymerase gắn vào vị trí promoto trên sợi khuôn ADN và cởi xoắn ở đây.
2. Phiên mã bắt đầu. Nucleotit thứ nhất bao giờ cũng là ATP hoặc GTP gắn vào chuỗi β .
3. Sau khi phiên mã được khoảng 12 nucleotit, σ tách khỏi phức hợp để lại liên kết với một enzyme tối thiểu khác.
4. Khi sắp phiên mã xong, một gen ARN-polymerase sẽ gặp một trong hai tín hiệu kết thúc sau đây:

-Tín hiệu mạnh: không cần yếu tố protein bổ sung nào và cấu tạo dạng cặp tóc.

-Tín hiệu yếu: cũng có cấu trúc dạng cặp tóc nhưng thiếu đoạn oligo (U) và cần yếu tố protein Rho; Rho nhận ra và gắn vào đoạn ARN sợi đơn, thủy phân ATP rồi di động đến và tách và tách ARN khỏi phức hợp.

Sự mở đầu phiên mã ở *E. coli*, bị kìm hãm bởi chất kháng sinh rifamixin do chất này liên kết cạnh tranh vào vị trí gắn nucleotit đầu tiên trên chuỗi β .

Đáng chú ý là ngoài chức năng trong phiên mã, yếu tố σ còn có vai trò trong điều hòa hoạt động của gen. Chẳng hạn, ở *E. coli*, yếu tố σ^{70} (do có trọng lượng là 70000 kDa) làm nhiệm vụ hướng dẫn việc phiên mã các gen trong điều kiện bình thường. Tuy nhiên trong điều kiện bị sốc nhiệt (tăng nhiệt độ nuôi từ 37-42°C) tế bào tổng hợp một yếu tố β^{32} (32000kDa)- liên kết với enzyme tối thiểu bình thường ($2\alpha\beta\beta'\sigma^{32}$) và hướng dẫn enzyme này gắn vào promoto của các gen sốc nhiệt. Kết quả là 17 protein sốc nhiệt HSP (heart shock protein) đã được tạo thành, các protein này có thể có chức năng bảo vệ các enzyme chống lại sự biến tính bởi nhiệt.

Sự tạo thành bào tử ở vi khuẩn *Bacillus subtilis* khi cạn chất dinh dưỡng cũng được coi là biểu hiện của một sự sốc khác. Trong điều kiện như vậy *Bacillus subtilis* tổng hợp một yếu tố σ mới có vai trò trong việc tạo thành nội bào tử.

Ở các tế bào nhân thật kể cả các vi sinh vật, tồn tại 4 ARN-polymerase : pol. I gặp trong hạch nhân (tổng hợp các rARN lớn), pol. II gặp trong dịch nhân và tổng hợp tiền tARN, pol. III gặp trong dịch nhân và tổng hợp tARN và một số ARN nhỏ khác. Ty thể chứa ARN-polymerase riêng.

2.1.3. Dịch mã [3]

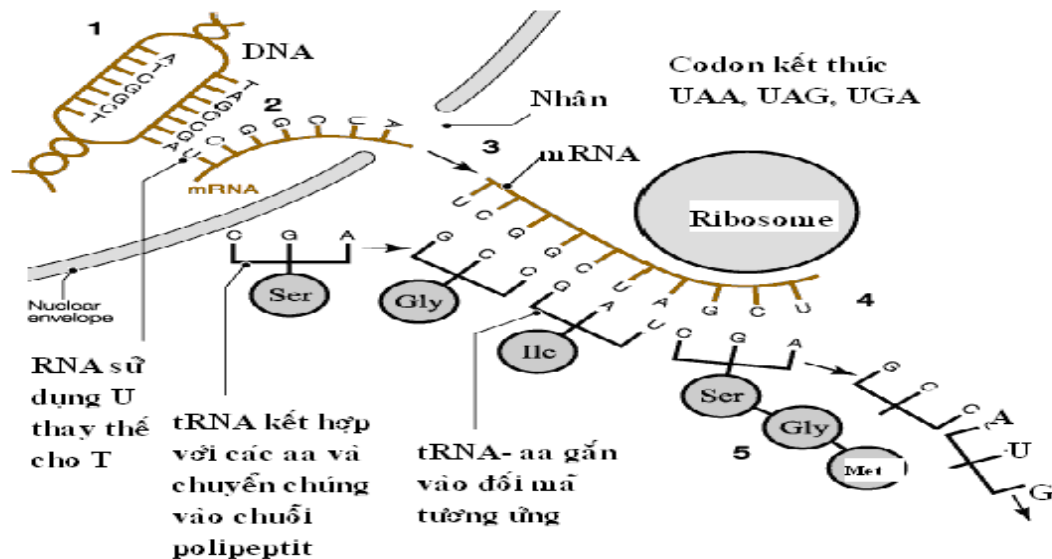
Cũng như sao chép và phiên mã, dịch mã về cơ bản diễn ra ở mọi tế bào giống nhau nhưng được nghiên cứu kỹ nhất ở *E. coli*. Tham gia vào quá trình này có ba thành phần chính: Ribosom, mARN, tARN.

Ở *E. coli* (và các bào quan như ty thể, lục lạp) ribosom thuộc loại 70S, có thể phân li thuận nghịch thành hai hạt nhỏ 30S, 50S. Hạt 50S chứa 34 protein và hai loại rARN (23S và 5S), hạt 30S chứa 21 protein và một loại rARN (16S).

Trên ribosom có hai vị trí gắn tARN: vị trí A gắn acid amine-tARN và vị trí P gắn vào peptidil-tARN.

ARN chỉ gồm 70-90 nucleotit, chứa nhiều base cải biến (dihydro, pseudotioridin,...), có cấu trúc lá chẻ ba với cuống và 3 thùy, lần lượt được gọi là DHU (Dihydro Uridin), AC (Anticodon) và TψX.

Vi acid amine mở đầu bao giờ cũng là metionin nên tế bào cần hai loại tARN: một vận chuyển Met mở đầu chuỗi và một vận chuyển Met ở giữa chuỗi. Met mở đầu chuỗi, sau khi gắn với tARN, phải được focmin hóa (nhờ enzyme transformilase) thành **focmin-metionil-tARN**. Vì vậy tARN mở đầu dịch mã và tARN chuyển Met vào giữa chuỗi được ký hiệu lần lượt là ARN_f^{Met} ARN_m^{Met} .



Trước khi tham gia vào tổng hợp protein mỗi acid amine phải được hoạt hóa qua hai phản ứng đều do enzyme aa-tARN-sinterase:

1. acid amine + ATP \rightarrow aa~ AMP + PP
2. aa~ AMP + tARN \rightarrow aa~ tARN + AMP

Như đã nói ở trên, khác với tế bào nhân thật, mARN ở *E. coli* không có chóp m⁷G ở đầu 5' (guanin được methyl hóa ở cacbon số 7) và đuôi poly A (có khoảng 100-200 base adenin) ở đuôi 3'. Hơn nữa, trong khi tế bào nhân thật, mARN là monocystron (chỉ đọc mã cho một chuỗi polypeptide) thì ở vi khuẩn, kể cả *E. coli*, mARN là polcystron (đọc mã lớn hơn 1 chuỗi polypeptide). Điều đáng chú ý là ở vi khuẩn ở mARN thường không gặp ở dạng nguyên vẹn, vì ngay khi đang còn phiên mã trên sợi khuôn ADN, các ribosom đã lần lượt gắn

vào đầu 5' của mRNA để tiến hành tổng hợp protein. Nghĩa là, ở tế bào nhân nguyên thủy, phiên mã và dịch mã diễn ra đồng thời về không gian và thời gian.

Có thể chia quá trình dịch mã ra làm ba chặng: mở đầu, kéo dài và kết thúc.

a, Mở đầu

Tham gia vào chặng này ngoài các thành phần kể trên còn có ba yếu tố protein gọi là yếu tố mở đầu: IF-1, IF-2, IF-3.

Trước hết, nhờ sự kích thích của IF-3, mRNA được liên kết với hạt ribosom 30 (trước đó IF-3 đã liên kết với ribosom 30S không cho ribosom 50S liên kết tùy tiện với ribosom 30S). Tiếp theo phức hợp fMet-ARN_f^{Met} ở dạng phức hợp (fMet-ARN_f^{Met}-IF-2-GTP) được chuyển vào vị trí P (gắn vào peptidin) trên hạt 30S ứng với codon mở đầu AUG của metionin. Nhưng bên trong mRNA cũng có nhiều codon AUG khác. Vậy chỉ riêng fMet-tARN với codon AUG tương ứng chưa đủ là tín hiệu mở đầu cho dịch mã. Shine và Dalgarno nhận thấy ở đầu 5' của mRNA và đầu 3' của rARN 16S bao giờ cũng có 3-9 nucleotit ghép đôi với nhau. Nhờ đoạn ghép đôi này mà codon AUG được chuyển chính xác vào vị trí mở đầu, bây giờ IF-3 bị tách ra.

Vai trò của IF-1 chưa rõ nhưng sự có mặt của nó là cần cho tác dụng của IF-2.

Sau khi fMet-ARN_f^{Met} gắn chính xác vào vị trí mở đầu thì hạt 50S liên kết tiếp vào thành monosom 70S đồng thời GTP bị thủy phân bởi chính IF-2, năng lượng thủy phân dùng để đẩy cả IF-1 và IF-2 ra ngoài. Kết quả là phức hợp mở đầu được tạo thành: (70S-mRNA-fMet-ARN_f^{Met}). thành."

b, Kéo dài

Ngoài các thành phần đã biết, chặng này còn cần 2 protein bổ sung gọi là yếu tố kéo dài EF-T và EF-G. Riêng yếu tố T lại gồm 2 protein, Tu và Ts, liên kết lỏng lẻo với nhau. Từ acid amine thứ hai trở đi, sự liên kết của aa-ARN vào ribosom cần sự kích thích của Tu và GTP trong phức hợp [aa_n-ARN-Tu-GTP].

Trước hết [aa₂-ARN-Tu-GTP] gắn vào vị trí A (acid amine) với codon tương ứng. Rồi (tương tự như chặng mở đầu), GTP bị thủy phân bởi Tu và Tu-GTP bị đẩy ra ngoài.

Liên kết peptide thứ nhất được hình thành do -COOH của acid amine thứ nhất (Met) với -NH₂ của acid amine thứ hai.

Để dịch mã được tiếp tục, bây giờ phức hợp [fMet-aa₂-tARN] phải từ vị trí A chuyển về vị trí P đồng thời đẩy tARN_f^{Met} trống ra ngoài. Sau đó phức hợp [aa₃-tARN-Tu-GTP] lại sẵn sàng vào vị trí A và các bước tiếp theo diễn ra cho đến kết thúc.

c, Kết thúc

Sau khi tổng hợp xong chuỗi polypeptide, ribosom sẽ gặp một trong 3 codon kết thúc hay là codon vô nghĩa (không mã hóa acid amine) UAA, UAG, UGA. Chuỗi polypeptide được tách khỏi ARN. Tiếp theo ribosom 70S bị phân li cùng với ARN_f.

Điều đáng chú ý là, dịch mã *in vivo* không diễn ra trên một monosom 70S đơn độc mà diễn ra đồng thời trên cùng một nhóm ribosom liên kết cạnh tranh với nhau trên sợi tARN gọi là polysom. Hơn nữa sau khi tổng hợp được một số acid amine, nhánh formin và nhiều trường hợp cả nhánh metionin, bị cắt khỏi chuỗi.

Hầu hết các chất kháng sinh thông dụng đều kìm hãm tổng hợp protein trên ribosom 70S, 80S hoặc cả hai.

Ở tế bào nhân thật acid amin mở đầu là metionin không cần formin hóa. Hơn nữa dịch mã ở ribosom 80S bị kìm hãm bởi một chất độc điển hình, đó là độc tố bạch hầu tiết ra.

Điều đáng ngạc nhiên là hệ thống miễn dịch của tế bào vi khuẩn cổ lại có những đặc điểm giống với tế bào nhân thật (acid amine mở đầu là metionin không cần formin hóa, không bị kìm hãm bởi chloramphenicol mà bởi độc tố bạch hầu)

2.2. Khái niệm và phân loại Plasmid[5]

Khái niệm: cũng như nhiều loại sinh vật, vi khuẩn là một vi sinh vật đơn bào, trong hệ gen của nó có nhiều gen chịu trách nhiệm tổng hợp nhiều loại sản phẩm khác nhau cho quá trình sống, sinh trưởng và phát triển của chúng. Điều hết sức đặc biệt là có nhiều gen cực kỳ quan trọng của vi khuẩn lại không nằm trong hệ gen của chúng mà định vị trên những ADN vòng tách biệt, nằm rải rác trong nguyên sinh chất của vi khuẩn gọi là các plasmid.

Plasmid là một phân tử ADN, có cấu trúc khép lại thành vòng tròn độc lập, có khả năng tồn tại và nhân lên một cách độc lập với hệ gen của tế bào chủ và tương tác, hoạt động vững bền với tế bào chủ. Giữa chúng và hệ gen tế bào chủ có những sự tương tác cộng sinh và chi phối lẫn nhau. Do vậy plasmid của loại vi khuẩn nào chỉ thích nghi với loại vi khuẩn đó. Tương tự, vi khuẩn chỉ tiếp nhận những plasmid mà chúng là tế bào chủ của các loại plasmid đó. Trong nhiều trường hợp plasmid có thể tái tổ hợp với nhiễm sắc thể gọi là episom.

Một vài phage cũng có thể được coi là plasmid, nếu xét về mặt cấu trúc, bởi chúng cũng là những ADN vòng khép kín, độc lập, nhưng xét về mức độ cộng sinh (tức hai bên cùng có lợi) thì phage không đáp ứng được yêu cầu này. Phage khi xâm nhập vào vi khuẩn chỉ tồn tại trong thời gian ngắn đủ để chúng nhân lên và sau đó phá hủy tế bào chủ mà chúng xâm nhập. Rồi tiếp tục gây nhiễm các tế bào khác. Vì vậy chúng không phải là plasmid theo đúng nghĩa của nó.

Plasmid có vai trò cực kỳ quan trọng trong lĩnh vực y, sinh, nông, dược và môi trường, bởi chúng có những chức năng hết sức đa dạng và tối cần thiết. Chúng là chủ nhân chứa các gen sản xuất kháng sinh, đồng thời cũng là chủ nhân của gen sản xuất sản phẩm kháng lại kháng sinh. Ở một số vi sinh vật gây bệnh cho người và động vật, chúng còn là chủ nhân của một số gen sản xuất các loại độc tố và các protein có hoạt tính cao có chức năng tăng cường độc lực cho vi khuẩn. Nhiều plasmid có lợi ví dụ như plasmid có trong vi khuẩn cố định ở nốt sần cây họ đậu, có khả năng tạo cho các vi khuẩn nốt sần thu nhận nitơ khí trời để sản xuất protein.

Plasmid còn có những loại chứa những gen sản xuất kháng sinh mà chúng ta có thể tận dụng để sản xuất kháng sinh chữa bệnh cho con người và động vật. Rất nhiều loại protein chứa những gen sản xuất các loại men rất đặc biệt để phân giải các hợp chất hữu cơ độc, các chất thải công nghiệp, các hóa chất, thuốc trừ sâu, chất sát trùng,...

Xét về mặt chuyển giao gen trong môi trường, plasmid là những phương tiện hết sức linh hoạt, vận chuyển ADN từ cá thể này sang cá thể khác. Người ta coi plasmid là các phương tiện dẫn truyền gen trong thiên nhiên. Khai thác các đặc tính sinh học của plasmid, ngày nay plasmid được ứng dụng một cách rộng rãi trong công nghệ sinh học và di truyền. Nhiều loại plasmid (chủ yếu là của *E. coli*) được thu nhận từ thiên nhiên, thiết kế lại gen và được sử dụng như là những plasmid dẫn truyền.

Phân loại plasmid: có thể dựa vào nhiều phương pháp khác nhau để phân loại plasmid. Một trong những phân loại phổ biến nhất hiện nay là dựa vào đặc tính của plasmid mà các thành viên trong nhóm đều có một đặc tính chung tương đối thuần nhất. Có thể tạm thời chia làm các nhóm plasmid chính:

1. Nhóm plasmid R: là loại plasmid chứa một hay nhiều gen có khả năng sản xuất các loại men có khả năng phân giải kháng sinh thành sản phẩm vô hoạt. Như plasmid Col: là các loại plasmid chứa các gen sản xuất kháng sinh colicin giúp cho vi khuẩn chống lại vi khuẩn khác.

2. Plasmid F: quy định sự tổng hợp pili giới tính cho vi khuẩn.

5. Vận chuyển và tái tổ hợp thông tin di truyền [7]

Ở tế bào nhân thật khi thụ tinh, các bộ gen đơn bội kết hợp với nhau tạo thành một hợp tử lưỡng bội. Qua các quá trình nguyên phân liên tiếp, ở hợp tử diễn ra sự tái tổ hợp giữa

hai bộ gen hay sự hình thành các bất chéo, xảy ra khi nhiễm sắc thể tương đồng tiếp hợp. Trong quá trình này, nhiễm sắc thể đứt ra và nối tại các điểm tương ứng. Vì thế nguyên liệu di truyền được trao đổi giữa các nhiễm sắc tử với nhau. Trao đổi chéo là một sự kiện ngẫu nhiên dẫn đến tái tổ hợp di truyền và vì thế làm nảy sinh các hệ gen mới. Trao đổi chéo có thể xảy ra bất kỳ nơi nào trên nhiễm sắc thể, nói chung có hai hoặc ba bất chéo được hình thành trên nhiễm sắc thể ở người trong quá trình tạo giao tử. Các giao tử chứa tổ hợp gen mới gọi là kiểu tái tổ hợp với nhau và sự giảm phân (phân bào giảm nhiễm) thành bộ gen đơn bội (giao tử).

Tái tổ hợp ở tế bào nhân nguyên thủy có điểm khác với tế bào nhân thật (vì vi khuẩn luôn luôn là tế bào đơn bội). Hợp tử ở chúng không phải là sản phẩm kết hợp của các tế bào. Thường chỉ một phần phân tử ADN được chuyển từ tế bào cho sang tế bào nhận, do đó sẽ xuất hiện các hợp tử một phần. ADN của tế bào nhận và một phần ADN của tế bào cho ghép đôi và trao đổi đoạn. Khi phân chia nhân và phân bào tiếp theo sẽ xuất hiện một tế bào chỉ chứa một nhiễm sắc thể đã tái tổ hợp. Tùy theo cách vận chuyển ADN, ta phân biệt ba kiểu vận chuyển tính trạng di truyền ở vi khuẩn: chuyển nạp, tải nạp và tiếp hợp, sau khi ADN được chuyển, trong tế bào nhận sẽ diễn ra tái tổ hợp. ADN của tế bào cho lắp vào ADN của tế bào nhận (thể tái tổ hợp).

5.1. Chuyển nạp

Chuyển nạp là sự biến đổi genotyp của vi khuẩn, dưới ảnh hưởng của ADN nhận được từ vi khuẩn cho. ADN dưới thể dung dịch tự do, hoặc được chiết rút từ vi khuẩn này sang một vi khuẩn nhận, không có sự can thiệp của một nhân tố cấu trúc nhiễm sắc thể, hoặc epixom hoặc của phage, vi khuẩn vectơ. Như thế một nòi vi khuẩn bị biến đổi về mặt di truyền do tiếp thu một mảnh ADN của vi khuẩn thuộc nòi khác.

Có hai loại chuyển nạp: chuyển nạp tự nhiên và chuyển nạp nhân tạo.

+Chuyển nạp tự nhiên: là hiện tượng chuyển nạp xảy ra khi nuôi cấy vi khuẩn trong điều kiện bình thường.

+Chuyển nạp nhân tạo: nhiều vi khuẩn khi nuôi cấy trong điều kiện bình thường không xảy ra chuyển nạp. Nhưng khi ủ tế bào trong dung dịch cation hóa trị hai với nồng độ cao thì xảy ra hiện tượng chuyển nạp.

Hiện nay hai hệ thống chuyển nạp tự nhiên được nghiên cứu sâu và thể hiện sự khác biệt là *Streptococcus pneumoniae* và *Haemophilus influenzae*. Loại *Streptococcus pneumoniae* được coi là điển hình cho kiểu chuyển nạp tự nhiên ở vi khuẩn Gram dương còn *Haemophilus influenzae* điển hình cho kiểu chuyển nạp tự nhiên ở các vi khuẩn Gram âm. Tuy nhiên, trên thực tế không hẳn như vậy. Việc nghiên cứu chuyển nạp tự nhiên của plasmid cho thấy sự khác biệt trong cơ chế chuyển nạp không nhất thiết tương ứng với tính chất của vách tế bào.

5.1.1. Những thí nghiệm của F. Griffith về sự chuyển nạp 1928

Đối tượng nghiên cứu của ông là vi khuẩn *Staphylococcus pneumoniae* (sách cũ viết là *Diplococcus pneumoniae*), một song cầu khuẩn Gram dương, gây bệnh viêm phổi. Khả năng gây bệnh của vi khuẩn này phụ thuộc vào vỏ nhầy. Phế cầu khuẩn tồn tại dưới hai kiểu hình dạng khuẩn lạc bóng láng S và dạng nhám xù xì R khi nuôi cấy trên môi trường đặc.

Những tế bào S có độc hại, được bao bọc bởi giáp mô cấu tạo bằng polysaccharit, hình thành những khuẩn lạc bóng láng (S=Smooth). Những tế bào không độc, không có giáp mô, hình thành những khuẩn lạc nhám xù xì (R=Rough). Mỗi type đều có tính di truyền, vi khuẩn nhân lên bằng cách sinh dưỡng và bảo tồn những tính trạng đặc biệt trong rất nhiều thế hệ.

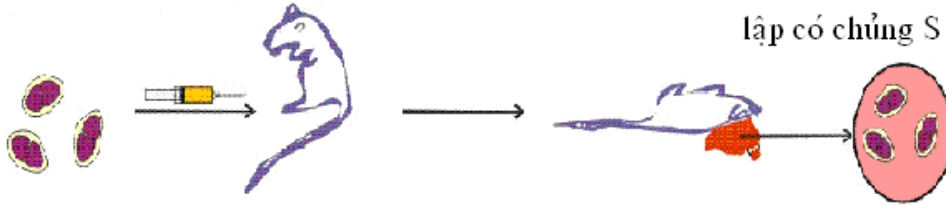
Trong những thí nghiệm của mình Griffith đã dùng những vi khuẩn S và R để tiêm truyền cho chuột.

Những thí nghiệm của Griffith về hiện tượng chuyển nạp

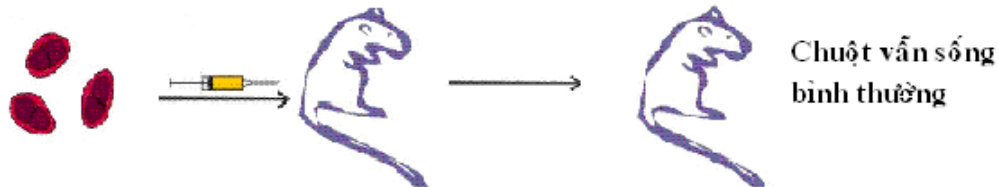
Khuẩn lạc dạng S (*Staphylococcus pneumoniae*) có giáp mô, bóng láng

Khuẩn lạc dạng R (*Staphylococcus pneumoniae*) không có giáp mô, nhám xù xì

Thí nghiệm 1: Tiêm canh khuẩn S (độc) cho chuột → Chuột chết lấy máu tim phân lập có chủng S (độc)



Thí nghiệm 2: Tiêm canh khuẩn S (đã xử lý bằng nhiệt)



Thí nghiệm 3: Tiêm canh khuẩn R (không độc)



Thí nghiệm 4: tiêm đồng thời canh khuẩn dạng R (không độc) và S độc nhưng đã xử lý bằng nhiệt

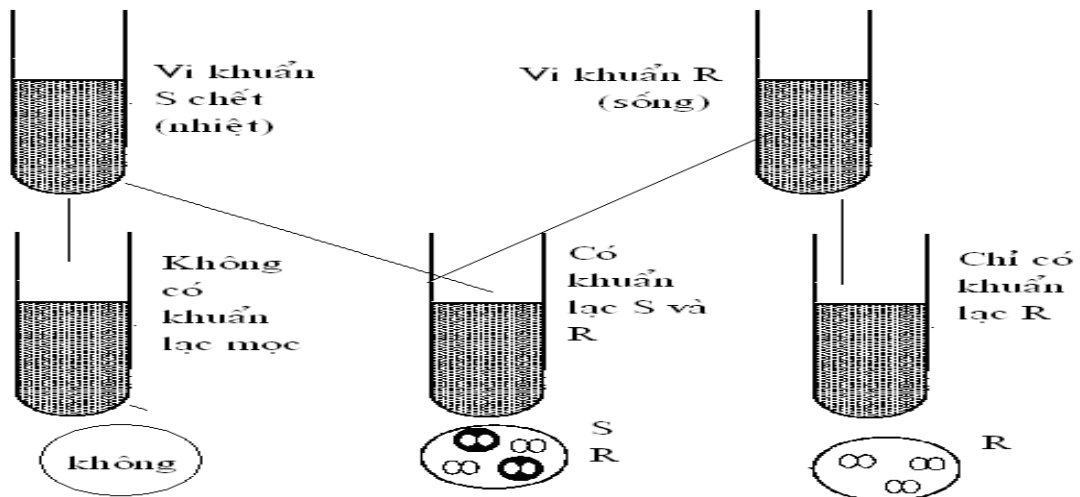


Chuột chết, phân lập thấy trong máu có vi khuẩn dạng S (độc) và dạng R

5.1.2. Thí nghiệm in vitro về hiện tượng chuyển nạp.

Nhiều nhà nghiên cứu sau đó đã xác minh những kết quả của Griffith. Quan trọng nhất là sự chuyển nạp in vitro của những tế bào R thành S.

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



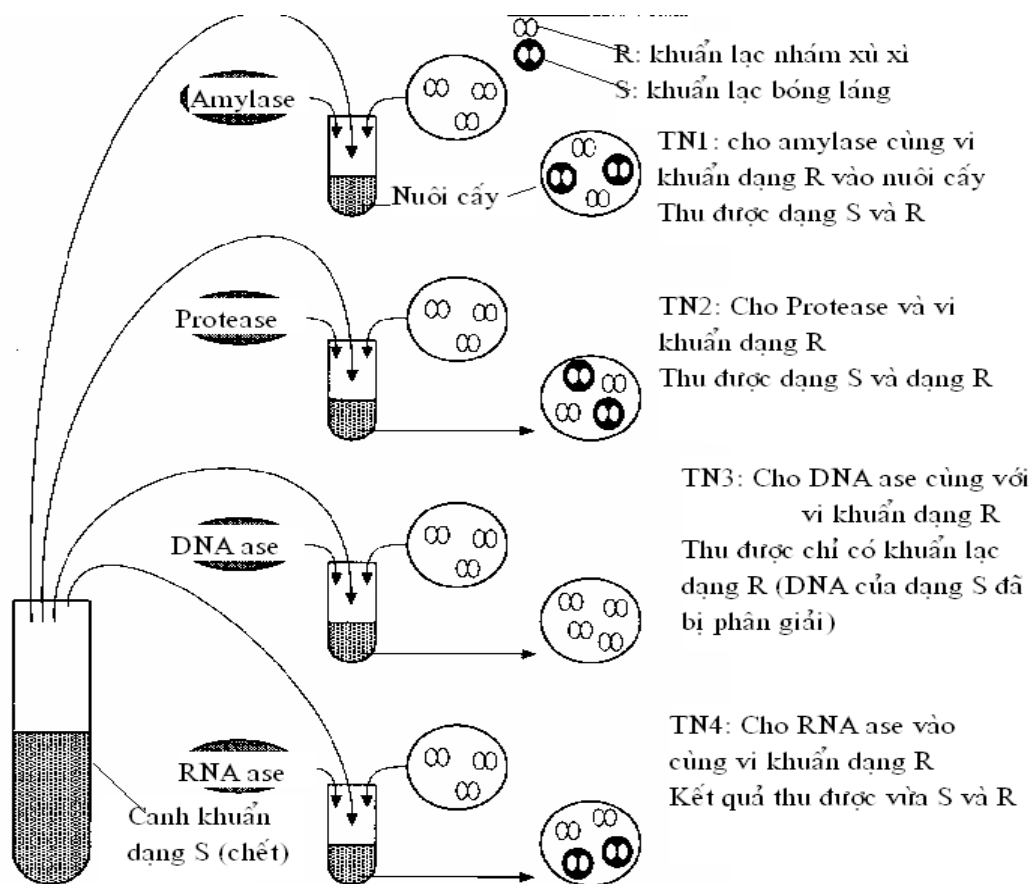
5.1.3. Bản chất của nhân tố chuyển nạp [5]

Bản chất của nhân tố chuyển nạp được Avery, MacLeod và McCarty làm sáng tỏ năm 1941. Trong những công trình nghiên cứu những chất có khả năng ức chế hoạt động của nhân tố chuyển nạp, họ đã chứng minh rằng nhân tố chuyển nạp chính là ADN.

Người ta dùng chất tinh chế từ ADN của vi khuẩn S cho tác động đến những vi khuẩn R thấy: một số ít vi khuẩn R biến thành vi khuẩn S nhưng nếu cho vào những tế bào rời ADN đã xử lý bằng deoxyribonuclease, enzyme làm tan rã ADN thì không thấy hiện tượng chuyển nạp.

Đây là một sự thay đổi đặc hiệu, nghĩa là một sự tổn thương của genotyp của những tế bào đã để thâm nhập những phân tử ADN của những tế bào thuộc một genotyp khác. Những thành phần phân tử lớn khác của vi khuẩn như protein, không có hoạt tính chuyển nạp. Như vậy ADN có một hoạt động di truyền đặc hiệu, nó là vật chất di truyền. Chỉ cần những nồng độ cực kỳ nhỏ (vài $\mu\text{g/ml}$ của ADN tinh khiết để tiến hành sự chuyển nạp. Người ta chứng minh rằng, số lượng vi khuẩn được chuyển nạp, tỷ lệ thuận với nồng độ của ADN cho đến khi có một nồng độ bão hòa.

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 của di truyền này ở trình tự các bazơ bố trí theo chiều dài của mạch ADN



5.1.4. Điều kiện để có chuyển nạp

-Vi khuẩn cần chuyển nạp, nó phải ở trong một tình trạng sinh lý đặc biệt, trạng thái tiếp thu (khoảng 10-15% tế bào của quần thể, thông thường ở giai đoạn sinh trưởng giảm). Đó là trạng thái sinh lý giao thời cần thiết cho sự kết hợp ADN để sau này xâm nhập vào hệ gen. Đó không phải là tính trạng di truyền, nó chỉ xuất hiện trong điều kiện nuôi cấy nhất định, thay đổi tùy theo loài vi khuẩn (pH, nhiệt độ, thăng bằng ion, khuấy lắc,...). Sự thay đổi của thành tế bào là điều kiện cần thiết cho sự xâm nhập của ADN.

-Kích thước và số lượng của ADN: hiện tượng chuyển nạp chỉ xảy ra với các đoạn ADN có trọng lượng phân tử vừa phải, từ 10^5 - 10^7 . Các đoạn nhỏ hơn 10^5 hoặc lớn hơn 10^7 đều không có khả năng chuyển nạp. Mỗi đoạn ADN chuyển nạp tương đương với một đoạn 1/200-1/500 hệ gen của tế bào cho. Có nghĩa là phải chia nhỏ chuỗi ADN của tế bào cho ra 200-500, đoạn nhỏ các đoạn này mới có khả năng chuyển nạp.

-Sự phân tích về hiện tượng chuyển nạp cho thấy độ 50 mảnh ADN được vi khuẩn kết hợp để biến nạp cho một tính trạng. Số lượng này tương đương với số lượng của những mảnh ADN có phân tử lượng 1×10^7 do nhân giải phóng khi vi khuẩn dung giải.

-Nghiên cứu về khả năng chuyển nạp của *Haemophilus* vi khuẩn này có khả năng tiếp nhận chừng 10 đoạn ADN chuyển nạp. Và như thế, người ta nghĩ rằng trên bề mặt của tế bào nhận có các thụ thể (receptor) tiếp nhận một cách chọn lọc. -Số lượng tính trạng truyền đi tùy thuộc vào sự bố trí của gen tương ứng 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 môi trường cũng ảnh hưởng đến tần số chuyển nạp. Ví dụ có albumin và phosphat trong môi trường làm tăng tần số chuyển nạp, trái lại casein làm giảm tần số chuyển nạp.

- Nhiệt độ thích hợp là 29-32 °C.

5.1..5. Các giai đoạn của quá trình chuyển nạp

Sự xâm nhập của các ADN ngoại lai vào những tế bào có thẩm quyền chuyển nạp, xảy ra vài phút sau khi tiếp xúc. Sự xâm nhập này được xác định bằng hiện tượng ADN trở nên không cảm ứng với deoxiribonucleasa cho thêm vào môi trường.

Nghiên cứu trực tiếp với ADN được đánh dấu bằng P³² cho thấy, chỉ một phần ADN được kết hợp, lúc đầu xảy ra một cách thuận nghịch sau đó theo một chiều. Ngay sau khi xâm nhập vào nhân tế bào, ADN ngoại lai trở thành một mạch duy nhất có tính chất trùng hợp cao, mạch kia bị tan rã ra thành một thành phần hòa tan trong acid. Sự tách riêng hai mạch này rất quan trọng, chỉ một mạch thôi được thu hút vào trong vi khuẩn, do đầu mút của nó gặp một phân tử deoxiribonucleasa, sự kết đôi đặc hiệu của khúc ngắn ADN đã xâm nhập với một vùng đồng đẳng của hệ gen của vi khuẩn tiếp nhận, tiến hành trên một đoạn kếp của nhiễm sắc thể, chứ không phải trên một đoạn bổ sung.

Sự xâm nhập của mạch ADN ngoại lai vào hệ gen của vi khuẩn tiến hành ngay trong vài phút (2-5 phút). Sự tái tổ hợp cũng diễn ra rất nhanh. Một phân tử chuyển nạp của ADN chỉ hoạt động một lần thôi. Nó không tan rã thành từng khúc trong quá trình tái tổ hợp. 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 enzyme thủy phân những mạch nối photphodiester trên hai mạch.

ADN sau khi lọt vào tế bào vi khuẩn có thể có ba khả năng xảy ra: ADN ngoại lai sẽ bị các enzyme của tế bào phân giải; tái tổ hợp với plasmid; tái tổ hợp vào nhiễm sắc thể của vi khuẩn. có hai cơ chế tái tổ hợp, tái tổ hợp tương đồng và tái tổ hợp đặc hiệu vị trí hay đặc hiệu thứ tư.

Tái tổ hợp tương đồng là quá trình tái tổ hợp trong đó ADN lạ lọt vào tế bào được liên kết với ADN của tế bào chủ qua việc ghép đôi đoạn tương đồng, bẻ vỡ và trao đổi chéo hai đoạn ADN có trình tự base giống nhau nhờ các enzyme.

Tái tổ hợp đặc hiệu vị trí hay đặc hiệu thứ tự, trái lại chỉ cần một đoạn ADN tương đồng rất nhỏ dùng để nhận biết.

Sự phân tách các phân tử nhân chuyển nạp, tiến hành qua các thế hệ liên tục.

Sự hình thành phenotyp của tính trạng chuyển nạp đòi hỏi sự tổng hợp những enzyme đặc hiệu dưới sự kiểm soát của ADN mới xâm nhập vào.

Streptococcus pneumoniae hấp thu và chế biến ADN bất kỳ nguồn nào chẳng hạn, ADN từ tinh trùng cá hồi hay từ một *Streptococcus pneumoniae* khác đều được hấp thu như nhau. Tuy nhiên, chỉ những ADN tương đồng với hệ gen của vi khuẩn thì nó mới được hợp nhất vào và làm thay đổi tính di truyền của loài này.

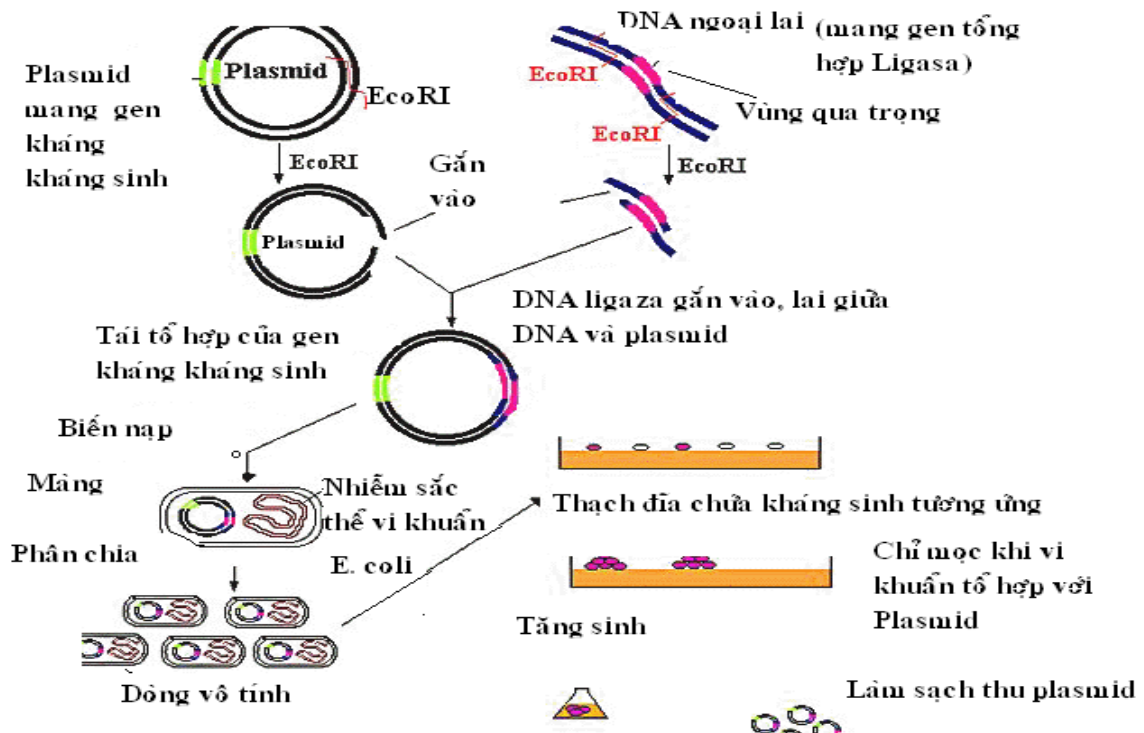
Chuyển nạp ở *Haemophilus* có những điểm khác với vi khuẩn Gram dương nói trên ở một số điểm cơ bản, chỉ những ADN tương đồng (từ cùng một loài hay những loài thân thuộc) mới được hấp thụ và xâm nhập vào tế bào, ADN này ở dạng sợi kếp cho tới khi hợp nhất vào hệ gen của vi khuẩn nhận.

Ở vi khuẩn tính trạng chuyển nạp tự nhiên thường xảy ra là tính kháng độc tố và tính nguyên dưỡng đối với acid amine. Sự chuyển nạp phụ thuộc vào điều kiện sinh lý tế bào và pha sinh trưởng. Tế bào chuyển nạp có bề mặt thay đổi, thành tế bào xốp và chúng có hoạt tính cao của các enzyme ngoại bào, đồng thời tạo thành các yếu tố cần thiết cho biến nạp vào môi trường.

Ở các vi khuẩn, bình thường không xảy ra chuyển nạp nhưng khi được cảm ứng trong phòng thí nghiệm nhờ xử lý tế bào bằng một trong các phương pháp thì sẽ xảy ra chuyển nạp. Chẳng hạn vi khuẩn *E. coli* khi xử lý bằng dung dịch CaCl₂ và bảo quản lạnh thì xảy ra chuyển nạp.

5.1.6. Ứng dụng chuyển nạp trong nghiên cứu di truyền học

Hiện tượng chuyển nạp là một phương tiện phân tích di truyền. Nó cho phép định vị trên bản đồ di truyền của một nòi vi khuẩn, trên những vùng rất nhỏ hoặc của một gen quyết định một tính trạng. Người ta có thể làm vô hoạt bằng cách gây đột biến nhiều enzyme của vi khuẩn và tái tổ hợp bằng cách chuyển nạp. Chuyển nạp nó có thể cho phép nghiên cứu những đặc tính chức năng của vi khuẩn mà không thể nghiên cứu bằng tiếp hợp được, hiện tượng chuyển nạp đã phát hiện và kiểm soát những gen hình thành giáp mô, sự đề kháng với kháng sinh, nghiên cứu quá trình hình thành nha bào, đặc tính cố định nitơ phân tử trong vi khuẩn *Rhizobium*,...



Hiện tượng chuyển nạp có 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 hóa học. Cho thấy rằng khi đột biến thì có một biến đổi ADN.

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

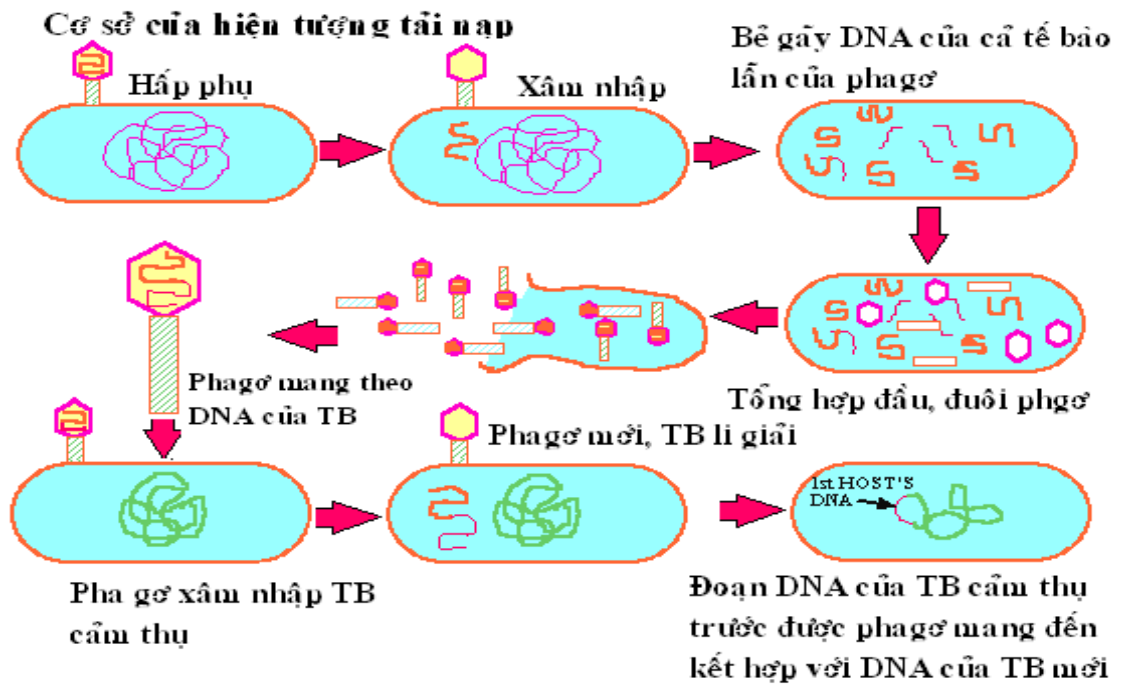
Với các vi khuẩn Gram dương thuộc chi *Bacillus* và *Streptomyces* việc sử dụng các thể nguyên sinh chất để chuyển nạp có ý nghĩa thực tế rõ rệt. Ở các vi khuẩn này sự hấp thụ ADN plasmid cảm ứng với polyetilenglicol được thực hiện qua các thể nguyên sinh chất thiếu vách, hay trong trường hợp chuyển ADN nhiễm sắc thể qua sự dung hợp trực tiếp của các thể nguyên sinh chất. Các thể nguyên sinh chất đã dung hợp kết hợp gen của hai tế bào bố mẹ, có thể tái sản thành các tế bào nguyên vẹn dưới các điều kiện thực nghiệm xác định. Các thể tái tổ hợp xuất hiện từ sự dung hợp như trên mang tính trạng cả hai bố mẹ nhờ quá trình tái tổ hợp tương đồng.

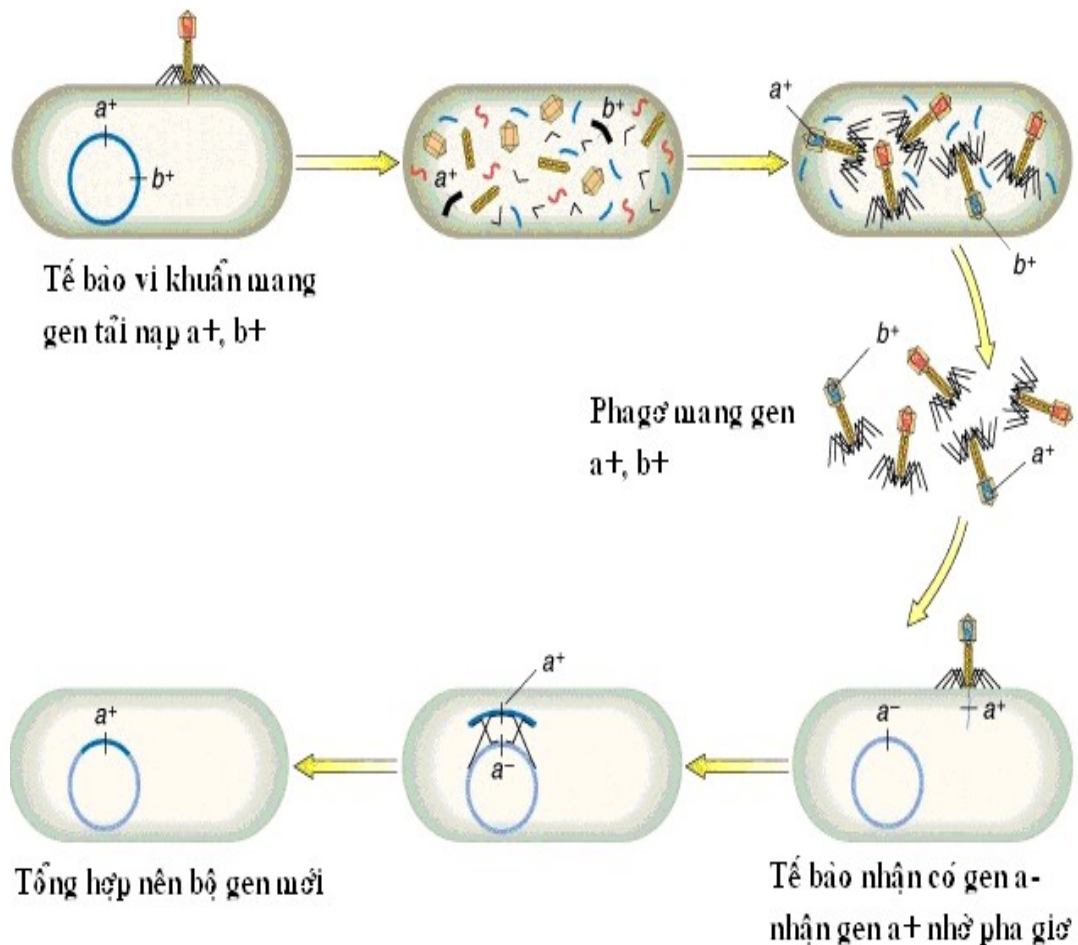
Gần đây, phương pháp xung điện có hiệu quả cao đã được đưa vào sử dụng. Phương pháp này tập cho các màng sinh học dễ thấm và dễ dung hợp nhờ sự kích thích của một điện trường, đã được ứng dụng đầu tiên cho các tế bào nhân thật như lai các tế bào thực vật. Tuy nhiên nhiều ADN plasmid của các vi khuẩn Gram dương cũng như gram âm cũng có thể được chuyển nạp nhờ xung điện.

Ngày nay hiện tượng chuyển nạp được ứng dụng nhiều trong sinh học phân tử, đặc biệt trong quá trình đưa vector tái tổ hợp vào tế bào vi khuẩn *E. coli* hiện tượng chuyển nạp giúp gắn kết một đoạn gen vào tế bào vi khuẩn để từ đó có thể phát hiện các tính chất của đoạn gen này.

Nhờ hiện tượng chuyển nạp nên đã phát hiện được bản chất của hiện tượng kháng kháng sinh trong vi khuẩn.

5.2. Tải nạp[9]





Tải nạp là sự truyền đi một mảnh nhỏ nguyên liệu di truyền, từ một vi khuẩn cho đến một vi khuẩn nhận qua một vài trung gian là một phage vi khuẩn (thực khuẩn thể: Bacteriophage) gọi là phage vector hoặc phage tải nạp. Muốn hiểu hiện tượng này cần phải biết bản chất và chu kỳ nhân lên của phage vi khuẩn và quá trình sinh tan, hoàn toàn khác quá trình tải nạp nhưng có khi kết hợp với nhau.

5.2.1. Khái niệm về phage của vi khuẩn và vi khuẩn sinh tan

Phage của vi khuẩn hoặc phage là những mảnh có tính chất của virus nhưng ở mức độ phân hóa sâu sắc hơn, có thể hòa tan vi khuẩn.

Phage được phân bố rộng rãi trong tự nhiên, trong nước cống, trong ruột, phân và những nơi có vi khuẩn sinh sôi nảy nở. Phage độc hay phage hoạt động, có khả năng hòa tan rất nhanh chóng những vi khuẩn non đang sống. Chúng hấp phụ trên bề mặt vi khuẩn một cách đặc hiệu.

Có thể quan sát sự dung giải vi khuẩn trên môi trường lỏng, bằng cách cho một hỗn dịch phage đặc hiệu vào một canh khuẩn nước thịt dinh dưỡng ủ được vài giờ. Môi trường trở nên trong sáng hoàn toàn. Trên môi trường đặc, sự dung giải của phage biểu hiện: có những vùng nhỏ sáng, những vết vô khuẩn, chứa hơn một triệu mảnh phage.

5.2.1.1. Phage độc- chu kỳ dung giải

Những phage độc như phage T_2 , T_3 , T_4 , T_5 phá hủy nhanh chóng cấu trúc của nhiễm sắc thể, trong đó ADN của chúng đã thâm nhập vào tế bào vi khuẩn, vỏ bọc protein của chúng rất độc cho vi khuẩn. Trộn phage ở những tỷ lệ thích hợp với một lượng canh khuẩn nước thịt

non, cây vi khuẩn cảm ứng và trong những điều kiện nhất định chúng có thể phát triển cho một chu kỳ dung giải hoàn toàn, bao gồm sự hình thành hàng trăm mảnh phage mới, dẫn tới sự dung giải tất cả những vi khuẩn mà chúng gây nhiễm.

Chu kỳ dung giải gồm các giai đoạn sau

a- Sự hấp thụ (đặc hiệu) của phage trên thành vi khuẩn qua đầu mút của đuôi. Sự hấp thụ này tiến hành khi có những điều kiện thuận lợi của môi trường, trong đó có một số yếu tố cần thiết như acid amine,...

b- Sự xâm nhập của phage vào trong vi khuẩn theo cơ chế sau đây của Lovop (A. Lwoff). Sau quá trình hấp thụ, endolizim của đầu mút đuôi phage, xuất hiện dây trùng hợp những mucopolysaccharit của thành vi khuẩn. Những sản phẩm thủy phân của mucopolysaccharit khởi động sự co giãn của ống ngoài cấu tạo bằng một loại protein co giãn gần miozin (mỗi phage có 110 phân tử ATP). Ống trong chọc thủng màng vi khuẩn và xâm nhập vào trong bào tương. ADN được truyền qua ống trong và thâm nhập vào trong vi khuẩn, nhưng màng của virion tồn tại bên ngoài và không đóng vai trò gì trong sự nhân lên của phage.

Phage mang thông tin di truyền của nó đến nhiễm sắc thể vi khuẩn, làm đứt và phá hủy nhiễm sắc thể của vi khuẩn, làm sai lệch sự chuyển hóa tế bào vi khuẩn và hướng tế bào này vào sự tổng hợp của ADN và những protein thuộc bản thân phage. Phage không có những hệ thống enzyme và năng lượng vì nó là vật ký sinh bắt buộc ở tế bào chủ.

c- Thời kỳ sinh dưỡng: đó là thời kỳ nhân lên của phage, gồm có hai giai đoạn:

- Giai đoạn (biến mất). Trong một vài phút đầu của thời kỳ sinh dưỡng, vi khuẩn không chứa virion (lõi ADN của phage), nếu người ta lấy lizozim để phá vỡ màng tế bào vi khuẩn thì thấy dịch dung giải không chứa những mảnh ADN gây nhiễm. Khi phage bắt đầu nhiễm vào, vi khuẩn ngừng sinh trưởng, sự tổng hợp ADN của vi khuẩn cũng ngừng lại. Sau khi nhiễm phage 2-3 phút, nhiễm sắc thể của vi khuẩn bị một deoxyribonuclease làm tan rã. Thông tin di truyền của vi khuẩn bị phá hủy. Những acid nucleic của phage không bị phá hủy chứng tỏ chúng có sự sai khác khác với acid nucleic của vi khuẩn.

Tỷ lệ = 0,55 đối với ADN của phage T₂. (5'H- 5-Hydroximetylxitozin bazơ không bình thường do virus đọc mã tổng hợp nên tương ứng Cytosin)

Trái lại tỷ lệ = 1 đối với ADN của *E. coli*.

Người ta có thể thấy rằng phân tử thứ nhất được tổng hợp trong hệ thống vi khuẩn-phage là một ARN của type phage có tỷ lệ = 0,55 chứ không phải bằng 1.

-Giai đoạn hình thành virion: đến phút thứ 12 sau khi xâm nhập, sợi ADN của phage mới được tổng hợp ngưng tụ lại. Protein của phage được sắp xếp xung quanh những sợi ADN này, làm hình thành những mảnh virus thành thực, vi khuẩn trở thành một cái túi nhỏ chứa 1-2g phage thành thực. Phage bài tiết ra một endolizin phá hủy thành tế bào.

d- Sự dung giải của vi khuẩn: sự phá hủy thành tế bào làm cho vi khuẩn vỡ ra và bị dung giải, phage được giải phóng và gây nhiễm những vi khuẩn khác. Phage độc giết tất cả những vi khuẩn mà chúng đã nhiễm vào.

- Sự ký sinh bắt buộc ở phage: phage hoàn toàn không có thông tin di truyền cho sự tổng hợp hệ thống enzyme cần thiết cho sự cung cấp năng lượng. Nó cũng không có thông tin di truyền với enzyme cần thiết cho sự tổng hợp của những chất chuyển hóa chủ yếu. Như thế phải sử dụng năng lượng và những chất chuyển hóa chủ yếu của vật chủ, trong đó những hệ thống enzyme tồn tại tiếp tục hoạt động sau khi bị nhiễm phage, nhưng những gen của vật chủ cần thiết cho sự tổng hợp những đại phân tử protein đều bị phá hủy. Như thế vi khuẩn không thể sinh sản những protein mới của vi khuẩn được nữa: hệ thống vi khuẩn phage sinh sản duy

nhất nguyên liệu của phage. Người ta thấy rằng phage cũng như tất cả virus là một vật ký sinh nội bào.

Như vậy tải nạp đóng vai trò trong:

- Lan truyền độc tính
- Lan truyền kháng nguyên thân
- Nâng cao khả năng tổng hợp các chất, yếu tố sinh trưởng.

5.2.1.2. Phage ôn hòa-sự sinh tan

Một phage "ôn hòa" không có đủ hoạt lực để làm dung giải ngay tất cả vi khuẩn được trộn với những mảnh phage này. Một số vi khuẩn sống sót, dưới tác động của những phage ôn hòa và trở thành vi khuẩn sinh tan. Nhóm phage này gồm có những phage P_1 và P_2 nhiễm vào vi khuẩn *E. coli*, *Shigella dysenteriae*, phage P_{22} của *Salmonella typhi murium*, phage λ của *E. coli* K₁₂. Như thế một vi khuẩn sinh tan có và truyền cho thế hệ của nó khả năng sinh sản những phage nhưng không có hiện tượng gây nhiễm. Một vi khuẩn sinh tan chứa một phage.

Quá trình sinh tan - Tiền phage: trong quá trình sinh tan, ADN của phage hoặc một đoạn sao lại của nó tái tổ hợp vào một vùng đặc hiệu trên NST của vi khuẩn. Sau khi hấp thụ trên vi khuẩn, đáng lẽ nó tự sao lại và nhanh chóng phân tán trong vi khuẩn để đi theo chu kỳ dung giải, thì ở đây hệ gen của phage lại tái tổ hợp vào NST của vật chủ hoặc thâm nhập vào và tồn tại ở dưới dạng **tiền phage** vài phút sau khi xâm nhập. Tiền phage (tiền thực khuẩn thể) không phải là một thực khuẩn thể hoàn chỉnh mà chỉ là một genotype của phage trong thành phần liên tục của NST vi khuẩn.

Tiền phage sao lại (nhân đôi) cùng một lúc với NST của vi khuẩn và truyền sang những tế bào con trong nhiều thế hệ liên tiếp. Những vi khuẩn đã tiếp thu đặc tính dung tủng một tiền phage trong NST của chúng và duy trì khả năng sản sinh phage cho các thế hệ sau gọi là sự sinh tan. Phần lớn những vi khuẩn sinh tan có thể nhân lên nhưng không sản sinh phage tự do và duy trì tính sinh tan. Chỉ có một số sản sinh những phage thành thực và bị dung giải (10^2 - 10^6 cho mỗi thế hệ).

Mỗi tiền phage có thể có trong một số trường hợp biến thành một phage sinh dưỡng và nhân lên trong vi khuẩn, sau đó giải phóng những phage hoàn toàn, nhưng sự cảm ứng tự phát này rất hiếm mà thường phải có các chất gây cảm ứng để tiền phage thành phage như: việc xử lý những vi khuẩn sinh tan bằng một tác nhân gây đột biến hóa học hoặc vật lý (tia tử ngoại, tia X,...).

Sự cảm ứng có thể do một sự tiếp hợp và hình thành một hợp tử giữa tế bào đực Hfr(λ)⁺ và những tế bào F(λ)⁻. Đó là cảm ứng của hợp tử.

5.2.1.3. Hiện tượng tải nạp và nhân tố tải nạp

Trong hiện tượng tải nạp, phage của vi khuẩn đóng vai trò vectơ. Nó chuyển ADN của nó vào tế bào vi khuẩn. Trong quá trình nhân lên của tế bào vật chủ, phage đã nuốt một mảnh nhỏ ADN của tế bào vật chủ. Do ảnh hưởng của mảnh nhỏ này trong gen của phage nên hệ gen vi khuẩn có những biến đổi đặc tính di truyền.

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 thủy tinh hình chữ U, có hai nhánh ngăn cách với nhau bằng một lọc bằng thủy tinh xốp. Cho vào nhánh thứ nhất canh khuẩn nước thịt cây *Salmonella* (A) nhánh thứ hai canh khuẩn cây *Salmonella* (B).

Vi khuẩn *Salmonella* (A) không bị đột biến mang ký hiệu 2A có genotype T⁺ (có khả năng tổng hợp Tryptophan).

Vi khuẩn *Salmonella* (B) đột biến mang ký hiệu 22A có genotype T⁻ (không có khả năng tổng hợp Tryptophan).

Sau một thời gian ủ chung, người ta mang vi khuẩn *Salmonella* (B) có genotíp T⁻ cấy trên môi trường không có Tryptophan. Nếu nó mọc được có nghĩa là nó đã tự tổng hợp được Tryptophan và genotype của nó từ T⁻ đã biến thành T⁺. Qua thời gian nuôi cấy trong tủ ẩm người ta đã nhận thấy ở các đĩa hộp lồng nuôi cấy *Salmonella* (B) 22A đã xuất hiện khuẩn lạc. Như vậy là có một số tế bào của 22A đã mang đặc điểm của 2A. Vậy thì nhân tố gì đã truyền đặc điểm 2A cho 22A? trong khi chúng không hề tiếp xúc với nhau (màng lọc ngăn cách vi khuẩn).

Người ta đã giả thiết rằng có thể do đột biến tự nhiên, nhưng ta thấy đột biến tự nhiên ở *Salmonella* thường xảy ra với tần số thấp (10^{-9}) mà những tế bào có khả năng tổng hợp Tryptophan 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) cao hơn so với đột biến tự nhiên 10.000 lần như vậy hiện tượng này không phải là do đột biến.

Người ta lại giả thiết rằng nhân tố đó là nhân tố chuyển nạp. Nhưng điều này cũng không đúng vì trong ống hình 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. Đó chính là nhân tố tải nạp. Thực khuẩn thể ôn hòa PTL 22 (hay P22) có khả năng làm tan các tế bào nòi 2A. Sau khi lọt qua màng lọc thủy tinh, thực khuẩn thể này làm tan các tế bào nòi 2A và giải phóng ra một tác nhân FA, tác nhân này lại 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 mà từ đó FA được tiết ra.

5.2.2. Các kiểu tải nạp

Tải nạp được tiến hành theo các kiểu sau đây

a, Tải nạp chung hay tải nạp không đặc hiệu

Là kiểu tải nạp do những phage tải nạp có thể truyền đi các tính trạng rất khác nhau từ vi khuẩn này sang vi khuẩn khác cùng loài. Như khả năng tổng hợp acid amin, đặc tính lên men, sự di động, sự đề kháng với chất kháng sinh,... Phage tải nạp P₂₂ của *Salmonella typhimurium* có khả năng tải nạp bất kỳ tính trạng di truyền nào trong số rất nhiều tính trạng riêng lẻ hay liên kết mang các chức năng khác nhau của *Salmonella*, do ADN của nó có thể đính vào bất kỳ đoạn nào của hệ gen vi khuẩn. ADN của vi khuẩn cho và ADN của phage tải nạp có thể có sự trao đổi chéo nhưng cũng có thể ADN của vi khuẩn cho chỉ liên kết tạm thời với ADN của phage.

Tải nạp hoàn toàn: là trường hợp tải nạp khi ADN vi khuẩn cho vào vi khuẩn nhận thì nó sẽ có sự liên kết chéo với đoạn ADN tương đương và gắn hẳn vào hệ gen của vi khuẩn nhận, do đó ADN được truyền cho các thế hệ con cháu, đây là sự tải nạp hoàn toàn.

Tải nạp hạn chế: là trường hợp ADN của vi khuẩn cho không gắn vào hệ gen của vi khuẩn nhận nên không có sự sao chép cùng do đó ADN này chỉ còn tồn tại trong một tế bào duy nhất mà không phải là tất cả các tế bào của thế hệ con cháu, đây là sự tải nạp ngừng trệ chiếm tỷ lệ lớn trong các trường hợp tải nạp: Tỷ lệ giữa tải nạp ngừng trệ và tải nạp hoàn toàn là 10/1.

Quá trình xâm nhập của vào vi khuẩn và sinh sản được tóm tắt như sau đầu tiên phage bám trên bề mặt tế bào vi khuẩn, sau 4 phút bơm ADN của nó vào tế bào, sau đó chúng sinh sản và khoảng 30 phút sau thì làm tan vi khuẩn giải phóng các phage con mới.

Khi phage xâm nhập vào vi khuẩn A chúng cắt ADN của vi khuẩn A thành nhiều đoạn, đồng thời ADN của phage được sao chép thành nhiều phân tử con và các vỏ của phage cũng được tạo thành. Sau đó các vỏ được lắp ráp ruột ADN vào, phá vỡ tế bào vi khuẩn ra ngoài và tiếp tục xâm nhập các vi khuẩn mới. Trong quá trình lắp ráp khoảng 1-2% phage vỏ

tính mang đoạn ADN của vi khuẩn có chứa gen. Phage mang gen của vi khuẩn A xâm nhập vào vi khuẩn B, quá trình tái tổ hợp xảy ra làm gen A gắn vào bộ gen B.

b, Tải nạp đặc hiệu

Đó là sự tải nạp do phage chỉ có khả năng tải nạp một tính trạng di truyền, do ADN của phage tải nạp chỉ kết hợp với một đoạn xác định của hệ gen vi khuẩn. Ví dụ: phage λ của *E. coli* K₁₂, phage này làm tan những nòi đại của *E. coli* K₁₂ và nhân lên trong vi khuẩn này dưới dạng tiên phage, trừ khi một tác nhân gây đột biến như tia tử ngoại hoặc những tác nhân cảm ứng, sự biến đổi của nó thành phage thành thực hoàn toàn là cảm ứng sau đó là sự dung giải vi khuẩn. Đây là một phage đặc hiệu dính vào NST. Tiên phage λ luôn luôn dính trên NST của locus bên cạnh locus gal (galactose)- phage λ thành thực của *E. coli* gal (+) chỉ có thể truyền cho một nòi *E. coli* gal (-) locus duy nhất của gal (+), nghĩa là khả năng tổng hợp một enzyme chuyển hóa galactosa. Nó không có khả năng truyền các tính trạng di truyền khác (khả năng tải nạp hạn chế hay tải nạp đặc hiệu).

Hiện tượng này được giải thích trong sự phân tích di truyền của những vi khuẩn (*E. coli*) gal(-) bị nhiễm một phage tải nạp λ và biến thành những vi khuẩn gal(+). Hệ gen trở thành những dị hợp tử gal(+), gal(-) hay đồng hợp tử nếu hai vùng gal tương tự về mặt di truyền học. Một vi khuẩn tạm thời là sông bội đối với locus gal.

5.2.3. Cơ chế chung của tải nạp

Từ nhân tố và các kiểu loại tải nạp, ta có thể rút ra được cơ chế chung của tải nạp như sau:

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

+Phage và vi khuẩn tiếp xúc với nhau. Phage phá vỡ tế bào vi khuẩn và đi vào tế bào chất của vi khuẩn, lấy cắp ADN của vi khuẩn và chui ra. Đem ADN cho vi khuẩn thể nhận khác.

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

+Đoạn ADN của tế bào cho được gắn lên ADN của phage thông qua hiện tượng trao đổi chéo. Nghĩa là khi ADN của phage gắn lên hệ gen của vi khuẩn thì xảy ra tái tổ hợp giữa đoạn gen của vi khuẩn và một phần ADN của phage.

5.2.4. 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 gọi là gen, tức là những vùng riêng biệt kiểm soát một tính trạng (hay nói đúng hơn là kiểm soát việc hình thành một enzyme).

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

+ Phát hiện được những hiện tượng như hiện tượng 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.

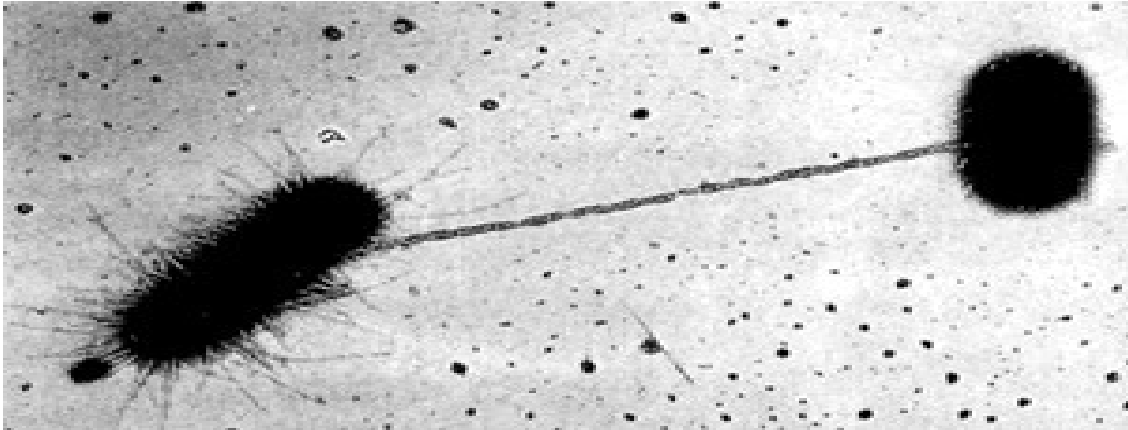
+ Trong tải nạp ngừng trệ, có tính trạng giống như trạng thái dị hợp tử ở sinh vật bậc cao, nghĩa là trong cùng một tế bào, có thể có những gen giống hệt nhau mang những biến đổi khác nhau.

5.3. Giao nạp (tiếp hợp)

Giao nạp ở vi khuẩn là sự kết hợp nhất thời của hai tế bào có kiểu bắt cặp đối nhau, được tiếp nối bằng cách chuyển một phần vật chất di truyền từ tế bào cho sang tế bào nhận qua cầu tế bào chất và sau đó các tế bào tách nhau ra.

Kiểu sao chép sigma (σ) được vi khuẩn sử dụng trong giao nạp để truyền phân tử ADN dạng thẳng sang tế bào khác. Về thuật ngữ trong các tài liệu cũ người ta dùng khái niệm

“tiếp hợp” để chỉ quá trình này, song theo (Nguyễn Lộc - Trịnh Bá Hữu, 1975) dùng giao nạp tốt hơn vì nó phản ánh được bản chất của quá trình và cũng tránh nhầm lẫn với tiếp hợp của nhiễm sắc thể.



5.3.1. Chứng minh có hiện tượng lai ở vi khuẩn

Năm 1946, J.Lederberg và E. Tatum đã sử dụng các dòng **đột biến khuyết dưỡng** khác nhau ở *E. coli* để chứng minh có tái tổ hợp giữa các dòng vi khuẩn khác nhau. Cụ thể dòng A có kiểu gen **met⁻bio⁻thr⁺leu⁺thi⁺** (có khả năng tổng hợp threonin, leucine và vitamin B1 (thiamin) và không có khả năng tổng hợp methionin và biotin). Còn dạng B thì ngược lại có kiểu gen **met⁺bio⁺thr⁻leu⁻thi⁻** (có khả năng tổng hợp methionin và biotin không có khả năng tổng hợp threonin, leucine và thiamin). Trộn A vào B trong ống nghiệm, sau đó cấy lên một môi trường tối thiểu. Các khuẩn lạc mọc trên môi trường tối thiểu chứng tỏ có các dạng lai, chúng chỉ mọc lên được nhờ sự bù đắp cho nhau các nhu cầu dinh dưỡng. Dạng lai có kiểu gen **met⁺bio⁺thr⁺leu⁺thi⁺** trong khi đó dạng A và dạng B riêng lẻ không mọc được trên môi trường tối thiểu.

5.3.2. Sự phân hóa giới tính

Năm 1953, Hayes đã phát hiện ở vi khuẩn có dạng khác nhau tương tự giống đực và giống cái ở sinh vật bậc cao. Các dạng đó được ký hiệu là F⁺ và F⁻ (fertility-hữu thụ). F⁺ tương tự giống đực ở sinh vật bậc cao, nó truyền gen sang F⁻. Tần số lai F⁺ F⁻ khoảng 10⁻⁶ tức lai 1 triệu tế bào sẽ có một tế bào lai.

Tiếp hợp là sự truyền ADN qua tiếp xúc trực tiếp giữa hai tế bào vi khuẩn, sự truyền là định hướng từ tế bào cho (đực) sang tế bào nhận (cái).

5.3.3. Episome và plasmid

Khi tiếp xúc với F⁺ một thời gian, F⁻ biến thành F⁺. Về sau dạng *Hfr* (High frequency of recombination) được phát hiện, dạng này có tần số lai với F⁻ cao hơn F⁺ có thể lên đến 10⁴ lần.

Khi tiếp xúc với F⁺ một thời gian, F⁻ biến thành F⁺ do nó nhận được một phân tử di truyền gọi là *episome*. *Episome* F⁺ là phân tử di truyền ngoài nhiễm sắc thể, có thể tồn tại hoặc ở dạng phân tử ADN vòng tròn *tự sao chép* hoặc gắn vào từng phân tử ADN của tế bào chủ (ví dụ phage λ) *episome* F⁺ được coi là nhân tố giới tính (sex factor).

Plasmid: lúc đầu được định nghĩa là ADN vòng tròn nhỏ có khả năng sao chép độc lập với nhiễm sắc thể tế bào chủ và không có khả năng gắn vào nhiễm sắc thể. *Plasmid* có thể mang một số gen đề kháng thuốc (*Plasmid* R đề kháng nhiều thuốc kháng sinh),... Hiện nay *Plasmid* được dùng cho cả hai nghĩa là *episome* lẫn *Plasmid*. **Các plasmid có thể tồn tại độc lập hoặc gắn vào bộ gen vi khuẩn.** Về sau người ta phát hiện ở vi khuẩn còn có nhiều Plasmid khác (*Plasmid* bám dính, *Plasmid* độc tính,...).

5.3.4. Nhân tố F'

Sự cắt rời nhân tố F từ nhiễm sắc thể của dòng Hfr nhiều khi không chính xác và lúc đó một đoạn bộ gen của vi khuẩn thay thế một phần của F. Trong trường hợp này nhân tố F' được tạo thành và nó có khả năng chuyển gen của vi khuẩn một cách độc lập, nhưng với các tính trạng của tế bào cho. Hiện tượng này được gọi là tính nạp, nghĩa là sự chuyển gen kèm theo nhân tố giới tính. Nhờ tính nạp có thể nhận được các thể lưỡng bội từng phần theo các gen được gắn vào F'.

5.3.5. Tái tổ hợp

Muốn xảy ra tái tổ hợp thì hai dòng vi khuẩn phải tiếp xúc với nhau (F' x F') hoặc (Hfr x F'). Dòng tế bào mang nhân tố F' được coi là tế bào đực và có khả năng tạo protein pilin, từ protein này tạo ống giao nạp gọi là pilus. Sự co lại của pilus đang nối hai tế bào làm chúng tiến lại gần nhau. Tế bào F' được gọi là cái sau khi giao nạp tế bào F' biến thành F'.

Việc chuyển gen chỉ thực hiện khi plasmid gắn vào bộ gen của vi khuẩn. Trong quá trình chuyển vật chất di truyền sang F' thì ADN của mạch chủ sao chép và mạch mới có ori đi đầu và F' ở cuối. Quá trình chuyển ADN từ F' sang F' có thể bị ngắt quãng. Các gen được chuyển một chiều từ Hfr sang F'.

Các dòng Hfr có tần số lai cao hơn nhiều vì plasmid đã nằm sẵn trong bộ gen. Còn F' phải qua giai đoạn plasmid gắn vào bộ gen rồi mới chuyển gen. Trong điều kiện thí nghiệm ở 37°C nguyên bộ gen của vi khuẩn *E. coli* được chuyển sang tế bào nhận trong vòng 90 phút. Thường thì sự giao nạp bị ngắt giữa chừng do các pilus bị gãy, nên ít khi bộ gen được chuyển nguyên vẹn vào tế bào nhận. Lúc đó tế bào F' vẫn là F'.

2.3. Biến dị ở vi khuẩn

2.3.1. Sự thích nghi

Vi sinh vật cũng như những sinh vật khác, không phải tất cả những thế hệ con cái sinh ra đều giống hoàn toàn bố mẹ, trái lại nhiều trường hợp các thế hệ con xuất hiện các đặc tính mới. Ở vi sinh vật thường quan sát thấy hiện tượng biến đổi kiểu trao đổi chất như chuyển từ hô hấp yếm khí sang hiếu khí, từ sử dụng nguồn C vô cơ sang hữu cơ,...

Những biểu hiện nêu trên thể hiện sự thích nghi của vi sinh vật đối với ngoại cảnh, đó chính là sự biến dị vi sinh vật. Khả năng biến dị của vi sinh vật rất lớn, hơn hẳn nhiều so với các sinh vật khác. Sự thay đổi của chúng không phải là ở ngoại hình bên ngoài mà là sự thay đổi hoạt tính sinh lý tạo ra sự biến dị có thể di truyền. Nhưng sự biến dị có phải là kết quả của sự thích nghi?

Lewis dùng phương pháp nghiên cứu tách riêng từng tế bào đã nhận thấy vi khuẩn *E. coli* (bình thường không có khả năng lên men galactose) sau khi nuôi cấy trong môi trường có nguồn C duy nhất là galactose đã xuất hiện khả năng lên men đường là do sự biến đổi thích ứng của các tế bào trong quần thể nhưng không phải do đã tồn tại từ trước một tế bào có khả năng lên men loại đường này. Sự xuất hiện một số tế bào có sự biến đổi về sinh lý như thế này người ta gọi đó là đột biến. Theo Lewis thì tỷ lệ đột biến dinh dưỡng này ở *E. coli* là 1/100.000. Và khi nuôi cấy *E. coli* trong môi trường galactose thì các tế bào đột biến này sẽ phát triển rất nhanh còn các tế bào khác sẽ bị tiêu diệt dần. Galactose trong môi trường chỉ đóng vai trò là nhân tố chọn lọc, nó là điều kiện để cho một tế bào có thể phát triển thành một tập đoàn. Như vậy sự thích nghi là dứt khoát chỉ có thể thực hiện được khi xuất hiện những thể đột biến hoặc ít ra thì hầu hết là các thể đột biến cố định.

Tuy vậy chúng ta cũng chứng kiến có những đặc tính tính mới ở thế hệ con không di truyền gọi là biến dị không di truyền.

2.3.2. Các loại biến dị

Có thể xảy ra hai loại biến dị là biến dị kiểu hình (phenotyp) và biến dị kiểu gen (genotyp)

2.3.2.1. Biến dị phenotyp

Là những biến dị về các tính trạng bên ngoài, tạm thời thuận nghịch không ổn định trong toàn bộ quần thể vi sinh vật. Biến dị xuất hiện do sự tác động của những nhân tố ngoại cảnh (môi trường, điều kiện nuôi cấy,...). Biến dị xuất hiện chậm và biến mất khi điều kiện tác động bị mất do đó đây là biến dị không di truyền.

Một số dạng điển hình của biến dị phenotyp

-Biến dị hình thái vi sinh vật :

Hình thái vi sinh vật có thể thay đổi do ảnh hưởng của những yếu tố khác nhau có liên quan đến tuổi tế bào và điều kiện của môi trường, có thể thấy đó là sự biến dị về kích thước tế bào thường xảy ra trong quá trình sinh trưởng như ở giai đoạn đầu tế bào thường to và kích thước nhỏ hoặc điển hình khi ở giai đoạn sinh trưởng logarit. Ngoài ra còn thấy sự biến dị sinh nha bào của một số vi khuẩn.

Biến dị về hình thái chịu ảnh hưởng của điều kiện ngoại cảnh.

+Thành phần hóa học cấu tạo của môi trường

+Điều kiện nuôi cấy như pH, nhiệt độ, áp suất,...

+Chất độc như sát khuẩn, chất kháng sinh.

+Biến dị về hình dạng khuẩn lạc

Khuẩn lạc là một dòng tế bào thuần khiết được sinh ra từ một tế bào.

Do những tổn thương trong cấu trúc của một tế bào vi khuẩn có thể tạo nên sự biến dạng của khuẩn lạc, bình thường trên môi trường đặc, vi khuẩn tạo thành hai dạng khuẩn lạc cơ bản đó là dạng S và dạng R. Những biến dị về hình dạng khuẩn lạc phát triển trên môi trường đặc, từ những vi khuẩn cùng loài (khuẩn lạc ướt, nhầy, bóng láng, nhám) hiện nay được coi như là những biến dị gây ra do ngoại cảnh. Những tổn thương trong cấu trúc của vi khuẩn, hình thành những khuẩn lạc riêng biệt này. Khi một canh khuẩn thuần khiết được đem nuôi cấy trên 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 còn có dạng trung gian 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 (dwarf: lùn nhỏ) khuẩn lạc G hình thành trên mặt hoặc ở rìa khuẩn lạc bình thường. Ngoài ra một số vi sinh vật trên một số môi trường xuất hiện khả năng sinh sắc tố làm biến đổi màu sắc của môi trường nuôi cấy.

+Biến dị hình thái dưới ảnh hưởng của ngoại cảnh

Tất cả những điều kiện sống đều có thể làm thay đổi hình thái của vi khuẩn:

- Cấu tạo hóa học của môi trường làm cho vi khuẩn có những dạng khuẩn lạc khác nhau, tùy theo sự nuôi cấy trong môi trường nước thịt giàu dinh dưỡng, môi trường tổng hợp hay bệnh phẩm.

- pH, sức căng bề mặt của môi trường tăng, làm hình thành những khuẩn lạc mập hơn, ngắn hơn. *Brucella* ở nhiệt độ 37°C có hình rất ngắn, hình thoi, cầu khuẩn và ở 21°C có hình trục khuẩn nhỏ. Tốc độ phân chia của tế bào sẽ chậm đi ở nhiệt độ thấp. Những điều kiện không thuận lợi khác cũng làm thay đổi hình thái vi khuẩn.

- Canh khuẩn già thường có những dạng thoái hóa, những hình thái này ít nhiều khác với vi khuẩn bình thường như kéo dài hình sợi (ở trục khuẩn) hoặc những dạng phân nhánh giữa hoặc hai đầu.

- Những tác nhân ức chế, kìm khuẩn hoặc diệt khuẩn ở nồng độ thấp có khả năng biến đổi hình thái của vi khuẩn. Vi khuẩn có thể thay đổi hình dạng, hình thành những vi khuẩn dạng L (không có thành tế bào sinh ra do đột biến).

2.4. Biến dị genotyp sự - đột biến

a, *Khái niệm*

Cũng như sinh vật bậc cao, vi khuẩn cũng có sự đột biến. Cùng một genotype, sự biểu hiện của phenotype phụ thuộc vào các điều kiện môi trường. Sinh vật bậc cao đột biến thường xuất hiện trong tế bào mầm, ít chịu ảnh hưởng của môi trường, thì ở vi khuẩn môi trường ảnh hưởng trực tiếp gây nên những biến đổi trong genotype. Như vậy đột biến là sự sai khác của con cái với bố mẹ về kiểu gen liên quan đến vật chất di truyền.

b, *Bản chất của đột biến*

Bộ nucleotit của ADN thuộc một gen là một mã thông tin, nó tương ứng với cấu trúc một protein đặc hiệu. Mọi thay đổi của bộ nucleotit này dẫn đến sự thay đổi cấu trúc và chức năng của protein đó, hình thành một tính trạng đột biến. Như vậy đột biến là những thay đổi cơ sở vật chất di truyền ở mức phân tử.

c, *Tính chất của đột biến*

Đột biến mang tính chất di truyền, gián đoạn, hiếm, ngẫu nhiên, độc lập, đặc hiệu.

d, *Biểu hiện của đột biến*

Mọi đột biến dù là ngẫu nhiên hay cảm ứng thì sự thay đổi của bộ nucleotit có thể xảy ra theo hai kiểu:

- + Thay thế một đôi base khác (đột biến điểm)
- + Cắt bộ khung pentose-phosphat của ADN sẽ gây tổn hại, hoặc đảo ngược đoạn giữa hai điểm cắt (đột biến đoạn). Đột biến này thường không biến đảo.

Ví dụ:

Sợi (-)	T	A	G	C	A	C	T	G
Sợi (+)	A	T	C	G	T	G	A	C
ARN _t	A	U	C	G	U	G	A	C

Nếu đột biến điểm xảy ra tại vị trí bộ ba mã thứ nhất T thay thế bằng C thì bộ ba thứ nhất đáng lẽ mã hóa cho ra AUC (izoloxin) thì sau khi đột biến cho ra GUC (valin).

e, *Nguyên nhân gây đột biến*

+Ngẫu nhiên: chưa biết rõ nguyên nhân này, có lẽ do sai sót ngẫu nhiên khi liên kết giữa các nu bị thay đổi một cách ngẫu nhiên.

+Vật lý (tia tử ngoại (UV) gây đột biến điểm),...

+Hóa học: ethidium bromide, acid, các hóa chất khác,...

+Sinh học:

2.4.2. Các dạng đột biến thường gặp

2.4.1. Đột biến ngẫu nhiên

Trong một quần thể vi khuẩn, luôn luôn xuất hiện các đột biến mà không cần có sự can thiệp của thực nghiệm. Đó là các đột biến ngẫu nhiên. Một trong những nguyên nhân của đột biến ngẫu nhiên có lẽ là do sự sai sót ngẫu nhiên khi liên kết nucleotit bị thay đổi một cách ngẫu nhiên. Chẳng hạn bình thường T tồn tại ở trạng thái keto và ghép đôi với A, nhưng khi sao chép T chuyển sang dạng enol và ghép đôi với G. Hậu quả: sợi ADN mới sẽ mang một cặp CG lẽ ra là vị trí của AT.

-Tần số đột biến và tốc độ đột biến:

Tần số đột biến (tức là số lượng cá thể đột biến trong một quần thể tế bào) khác nhau đối với các tính trạng cá thể, đạt từ 10^{-4} - 10^{-14} và phụ thuộc vào tốc độ đột biến, điều kiện môi trường cũng như tuổi của huyền dịch. Xác suất của đột biến đối với mỗi tế bào và mỗi thế hệ

gọi là tốc độ đột biến, tốc độ đột biến ngẫu nhiên đối với một gen khoảng 10^{-5} , với một cặp nucleotit khoảng 10^{-8} .

- Đột biến yên lặng

Nhiều acid amine có >1 codon tương ứng nên cũng có > 1 ARN tương ứng. Do sự thoái hóa mã này mà không phải mỗi đột biến đều được biểu hiện ở phenotype. Với nhiều bộ ba, sự thay đổi base thứ ba không gây hậu quả gì (đột biến yên lặng hay đột biến nguyên nghĩa). Ngay sự thay đổi base thứ nhất hay thứ hai cũng vậy.

Mặc dù các cấu trúc bậc cao của một phân tử protein được quy định từ cấu trúc bậc một nhưng từng acid amine riêng rẽ cũng có ý nghĩa khác nhau đối với cấu trúc của protein. Ví dụ đột biến AUC (izoloxin) → GUC (valin) dẫn đến sự thay thế một nhóm ưa lipit này thành một nhóm ưa lipit khác. Trái lại CUU (loxin) → CCU (prolin) khiến cho chuỗi polypeptide bị sai lệch và có thể làm thay đổi sâu sắc các cấu trúc bậc cao.

Vì vậy trong một loạt thể đột biến có cùng một gen cấu trúc đối với một enzyme bị thay đổi, sẽ xuất hiện nhiều mức độ hoạt tính khác nhau, từ mất hoạt tính không đáng kể đến mất hoàn toàn.

Hồi biến và sự hoàn tổ

Đột biến điểm, có thể thuận nghịch, nghĩa là các thể đột biến có thể đột biến trở lại và phục hồi các đặc tính trước đây. Có hai loại hồi biến:

Loại thứ nhất, hồi biến ở vị trí đột biến phục hồi hoạt tính, diễn ra ở cùng một vị trí đối với đột biến ban đầu.

Loại thứ hai, vị trí đột biến xảy ra một vị trí khác trên phân tử ADN, nhưng có thể phục hồi phenotype của dạng hoang dại. Một số đột biến át chế thuộc loại đột biến này.

Ví dụ: đột biến ở một vị trí khác trong cùng một gen có thể phục hồi chức năng của enzyme, đột biến trong gen khác có thể phục hồi phenotype của loài hoang dại.

4.2.2. Đột biến cảm ứng

Có thể nâng cao tần số đột biến bằng cách xử lý tế bào bằng các tác nhân gây đột biến. Đó là sự cảm ứng đột biến và tế bào sinh ra gọi là thể đột biến cảm ứng. Tác nhân gây đột biến có thể là lý, hóa hay sinh học.

6. ỨNG DỤNG KỸ THUẬT DI TRUYỀN TRONG CHẨN ĐOÁN BỆNH TRUYỀN NHIỄM

Quy trình thường quy để chẩn đoán bệnh do vi sinh vật

Bệnh truyền nhiễm là bệnh gây ra bởi một trong những tác nhân như: vi khuẩn, virus, nấm, nguyên trùng (protozoa).

1- Lấy mẫu: lấy đúng, bảo quản thích hợp, vận chuyển nhanh, mẫu phải có ghi chép thông tin đầy đủ.

2- Nuôi cấy phân lập (nuôi cấy khởi đầu)

Mục đích: nuôi cấy khởi đầu để tạo sự phát triển của vi khuẩn, tạo được lúá cấy thuần khiết.

Bệnh phẩm → Môi trường nuôi cấy khởi đầu

Nuôi cấy vào môi trường tăng sinh

Phân lập (cấy chuyển vi khuẩn từ những khuẩn lạc đặc trưng vào các môi trường khác, thu được lúá cấy thuần khiết)

3- Nghiên cứu hình thái, sinh lý, sinh hóa

- 4- Nghiên cứu tính gây bệnh
- 5- Nghiên cứu type huyết thanh học
- 6- Thử kháng sinh đồ
- 7- Kết luận: - Căn nguyên, loài, type vi khuẩn gây bệnh
 - Khả năng sử dụng kháng sinh
 - Nguồn gốc dịch (nếu có dịch)

Những trở ngại trong chẩn đoán vi khuẩn học.

Có những loại vi khuẩn có thể phát triển nhanh trong khoảng 18-24 giờ nhưng cũng có những loại phát triển được phải mất vài tháng (trực khuẩn lao 2 tuần-2tháng). Cũng có những loại vi khuẩn nuôi cấy mà không mọc (vi khuẩn gây bệnh phong).

Chú ý: Trong quá trình lấy mẫu: mẫu phải lấy ở những con vật chưa chết, sắp chết, bởi nếu con vật chết thì con vật mất khả năng miễn dịch, khi đó vi khuẩn đường ruột xâm nhập vào tất cả các cơ quan.

Phương pháp nhân bản ADN (PCR: polymerase chain reaction) [4]

Phản ứng PCR được phát hiện vào năm 1980 và đã đưa lại một cuộc cách mạng trong di truyền học phân tử. Đây là phương pháp hoàn toàn mới trong việc nghiên cứu về gen và hệ gen. Khó khăn lớn nhất trước đây trong việc phân tích hệ gen là ở chỗ, chúng là những mục tiêu riêng rẽ và rất nhỏ trong một hệ gen khổng lồ. Chẳng hạn hệ gen của động vật bậc cao chứa 100.000 gen. Kỹ thuật PCR ra đời đã làm thay đổi tất cả, giúp chúng ta có thể tạo ra một số lượng lớn các bản sao ADN mong muốn.

Nguyên lý: PCR là một phản ứng sinh hóa phụ thuộc nhiệt độ, sử dụng đặc điểm của quá trình sao chép ADN với sự tham gia của một loại ADN-polymerase chịu nhiệt, có hai đoạn ngắn ADN một sợi làm mồi, và dùng các đoạn ADN mạch đơn làm khuôn để tổng hợp nên sợi mới bổ sung với nó. Vì vậy để khởi đầu cho quá trình tổng hợp, ADN cần cung cấp đoạn mồi oligonucleotit (có độ dài khoảng 6-30 nucleotid). Đoạn này gắn kết với ADN khuôn tại điểm khởi đầu sao chép, và được enzyme ADN-polymerase điều khiển để tổng hợp nên một sợi ADN đặc thù. Các sợi ADN làm khuôn được tạo ra theo cách đơn giản là nâng nhiệt độ lên 90°C (92-98°C) mà thường là 94°C cho chuỗi ADN xoắn kép bung ra.

Cả hai sợi ADN đều được dùng làm khuôn cho quá trình tổng hợp nếu các đoạn mồi (oligonucleotit hay primer) được cung cấp để bám vào vị trí tương ứng cho cả hai sợi. Trong kỹ thuật PCR, các đoạn mồi được chọn nằm ở hai đầu đoạn ADN cần nhân lên, sao cho các sợi ADN tổng hợp mới được bắt đầu tại mỗi đoạn mồi kéo dài về phía đoạn mồi nằm trên sợi kia, cho sản phẩm có độ dài nằm giữa hai đoạn mồi này. Độ dài của sản phẩm PCR có thể vài trăm đến hàng ngàn thậm chí hàng chục ngàn nucleotit. Như vậy, sau mỗi chu kỳ các điểm bám cho các đoạn mồi lại xuất hiện trên mỗi sợi ADN mới được tổng hợp. Hỗn hợp phản ứng lại được nâng nhiệt độ lên thích hợp sao cho các sợi ban đầu tách khỏi sợi mới tổng hợp, các sợi này sau đó được dùng làm khuôn cho chu kỳ tiếp theo, bao gồm các bước: gắn mồi, tổng hợp ADN và tách rời các đoạn.

Kết quả cuối cùng của phản ứng PCR là sau n chu kỳ phản ứng, tính theo lý thuyết, ta sẽ có 2^n bản sao các phân tử ADN mạch kép nằm giữa hai đoạn mồi. Như vậy, kết quả là một đoạn ADN định trước được nhân lên với một lượng rất lớn. Ví dụ: sau 30 chu kỳ số lượng bản sao ADN của PCR sẽ là 1.073.741.842.

Do những ưu điểm tuyệt đối trong nghiên cứu sinh học phân tử, kỹ thuật PCR được nhanh chóng ứng dụng rộng rãi để chẩn đoán các bệnh về virus, vi khuẩn, các bệnh ký sinh trùng cho kết quả chính xác. Mặt khác việc xác định thành phần trật tự nucleotit trên phân tử ADN trong hệ gen có giá trị lớn trong phân loại các loài vi sinh vật.

Tiến hành phản ứng: vật liệu khởi đầu cho PCR là ADN có chứa đoạn cần nhân lên, gọi là khuôn ADN, hàm lượng ADN cần cho phản ứng rất nhỏ trong thí nghiệm bình thường chỉ cần 1-100ng ADN tổng số của hệ gen là đủ.

Thành phần chủ yếu của phản ứng PCR:

- 1- ADN làm khuôn (tức là bệnh phẩm nghi)
- 2- Hai đoạn enzyme để xác định các điểm bắt đầu tổng hợp ADN
- 3- Enzyme chịu nhiệt ADN-polymerase (phổ biến là Taq, chiết xuất từ vi khuẩn chịu nhiệt *Thermus aquaticus*).
- 4- Hỗn hợp dung dịch đệm 4 loại deoxynucleotit (A, T, G, C)
- 5- Môi trường đệm cung cấp ion Mg^{2+} và nước tinh khiết (không có ADNase; ARNase,...)

Các giai đoạn của phản ứng PCR

Phản ứng PCR có 3 giai đoạn (ba bước điều chỉnh nhiệt) cho một chu kỳ. [4]

1- Bung liên kết ADN: được thực hiện ở nhiệt độ 90-98°C trong vài giây đến vài phút. Tại nhiệt độ này các phân tử ADN mạch kép sẽ bị tách ra, tạo thành các sợi đơn dùng để làm khuôn cho các đoạn mới bám vào và enzyme ARN-polymerase xúc tác tổng hợp.

2- Gắn mới (hay còn gọi là ủ với mới): Sau bước một, ngay lập tức nhiệt độ được hạ xuống 37-68°C để các đoạn mới bám vào với trình tự bổ sung tương ứng trên các phân tử ADN làm khuôn.

3- Tổng hợp (hay còn gọi là kéo dài): Nhiệt độ ngay lập tức được nâng lên 68-72°C trong vài chục giây đến vài phút để các ADN mới tổng hợp xoắn vào với nhau tạo thành các sợi ADN kép, chính là sản phẩm PCR.

Cứ như vậy, phản ứng xảy ra trong 25-40 chu kỳ và tiếp tục cho đến chu kỳ cuối cùng, nhiệt độ được duy trì ở 72°C trong 5-10 phút sao cho tất cả các sợi đơn có trong phản ứng xoắn lại tạo nên sản phẩm PCR, cuối cùng nhiệt độ hạ xuống 4°C để bảo quản sản phẩm.

Sản phẩm của phản ứng PCR là đoạn ADN mà ta cần nhân lên. Sản phẩm được kiểm tra bằng cách chạy điện di trong thạch agarose nồng độ 0,8-2%, và ADN của PCR sẽ được nhìn rõ dưới tác dụng của tia cực tím sau khi được nhuộm bằng Ethidium Bromid, một loại hóa chất có khả năng bám và làm hiển thị ADN. Độ dài của ADN sản phẩm được tính bằng cách so sánh với chỉ thị ADN (ADN Marker) sử dụng thông dụng nhất là ADN của thực khuẩn thể Lambda cắt bằng enzyme giới hạn HindIII.

Phương pháp PCR không cần đòi hỏi ADN với lượng lớn, nên có thể sử dụng trực tiếp ADN mẫu vật để làm khuôn, mà không cần phải nuôi cấy, do vậy có thể loại trừ được ảnh hưởng của vật chủ và môi trường nuôi cấy với đối tượng nghiên cứu.

-Câu hỏi ôn tập:

1. Biến nạp được thực hiện với những điều kiện nào?
2. Nồng độ ADN ảnh hưởng đến biến nạp như thế nào?
3. Biến nạp và tải nạp, giống nhau ở những điểm nào?
4. Tải nạp chung và tải nạp chuyên biệt khác nhau và giống nhau ở những điểm nào?
5. Tế bào F⁻ có thể biến thành F⁺ và Hfr không? bằng cách nào?

-Tài liệu tham khảo:

1. Nguyễn Lâm Dũng, Nguyễn Đình Quyển, Phạm Văn Ty (2000). Nhà xuất bản giáo dục Hà Nội.
2. Lê Thành Hòa (2004). Sinh học phân tử: Nguyên lý ứng dụng. Viện công nghệ sinh học.
3. Phạm Thành Hồ (1999). Di truyền học. Nhà xuất bản giáo dục, trang 320-422.

4. Biên Văn Minh, Phạm Văn Ty, Kiều Hữu ảnh, Phạm Hồng Sơn, Phạm Ngọc Lan, Nguyễn Thị Thu Thủy (2006). Giáo trình vi sinh vật học. Nhà xuất bản Đại học Huế.
5. Hoàng Thủy Nguyên, Đặng Đức Trạch, Ninh Đức Dự, Nguyễn Hồng Điệt, Nguyễn Thị Kê, Nguyễn Thị Oanh (1974). Vi sinh y học tập I. Nhà xuất bản Y học Hà Nội.
6. Nguyễn Vĩnh Phước(1976). Vi sinh vật học Thú y tập III. Nhà xuất bản đại học và trung học chuyên nghiệp Hà Nội.
7. Nguyễn Khắc Tuấn(1999). Vi sinh vật học, nhà xuất bản nông nghiệp Hà Nội.

Giải thích thuật ngữ:

1. **Transformation:** sự truyền thông tin si truyền thông qua ADN tự do
2. **Temperat virus:** Virus khi nhiễm vào tế bào không gây tan tế bào nhưng genom của chúng cũng được sao chép theo genom của tế bào chủ.
3. **Shine-Dagarno sequence:** đoạn nucleotit ngắn nằm trước vị trí khởi đầu dịch mã của phân tử mARN ở prokaryote giúp nó bám vào vị trí 3' rARN 16S(vì mARN ở prokaryote không có mũ)
4. **Receptor:** điểm tiếp nhận trên bề mặt tế bào nơi virus bám vào .
5. Replicon: đoạn ADN tính từ điểm khởi đầu theo cả hai phía đến hai điểm kết thúc sao chép.
- 6.**Ribozyme:** Phân tử ARN có thể xúc tác phản ứng hóa học như một enzyme.
7. **Primer:** đoạn nucleotit (thường là ARN) có trình tự bổ trợ với đoạn đầu của ADN.
8. Phenotype: các đặc điểm có thể quan sát được của một cơ thể
- 9.**Okazaki fragment:** các đoạn ADN đoen được tổng hợp gián đoạn trên khuôn sợi muộn sau đó được nối với nhau bằng ligaza.
- 10.**Oligonucleotit:** một đonạ nucleotit ngắn

CHƯƠNG VII-NHÂN TỐ KHÁNG KHUẨN VÀ CHẤT KHỬ TRÙNG, TIÊU ĐỘC (4 TIẾT)

-Giảng viên: BSTY. Nguyễn Xuân Hòa-PGS.TS.Phạm Hồng Sơn

-Tóm tắt:

Mục tiêu: Trong quá trình nghiên cứu về vi sinh vật bên cạnh các vi sinh vật có ích chúng ta cần phát triển nhân rộng còn có những vi sinh vật có hại cần loại bỏ. Nghiên cứu trong phòng thí nghiệm để loại bỏ các tác nhân vi sinh vật ngoại lai đảm bảo cho môi trường nuôi cấy không bị tạp nhiễm, chương VII với 15 trang phục vụ cho 3 tiết giảng nhằm giới thiệu cho người đọc biết rõ phương pháp vô trùng dụng cụ và các tác nhân ảnh hưởng đến vô trùng. Giới thiệu một số phương pháp tiêu độc khử trùng hiện đang được sử dụng trong các phòng thí nghiệm.

-Mục tiêu: sinh viên sau khi học chương này biết cách sát trùng dụng cụ trong phòng thí nghiệm, biết cách sử dụng các hóa chất, các tác nhân vật lý trong tiêu độc chuồng trại. Ngoài ra trong chương còn giới thiệu cho sinh viên về kháng sinh và các yếu tố hóa trị liệu nhằm giúp sinh viên hiểu và lựa chọn đúng kháng sinh trong điều trị bệnh học.

I. CÁC NHÂN TỐ KHÁNG KHUẨN [1]

1.1. Nhân tố vật lý

1. Độ ẩm

Hoạt động sống của vi sinh vật đều liên quan đến nước và tỷ lệ nước trong tế bào của chúng rất cao. Nấm men 73-82%, nấm mốc 84-90%, vi khuẩn 75-85%. Vi vậy thiếu nước tế bào có thể bị chết do hiện tượng loại nước ra khỏi tế bào.

Sự đề kháng của vi sinh vật với trạng thái khô phụ thuộc vào:

Nguồn gốc vi sinh vật: vi sinh vật trong không khí chịu khô tốt hơn vi sinh vật trong đất, nước.

Loại hình vi sinh vật: sự đề kháng với trạng thái khô của nhóm xạ khuẩn > vi khuẩn > nấm mốc.

Trạng thái tế bào: tế bào già, tế bào có nha bào đề kháng đề kháng tốt hơn tế bào khô, tế bào không có nha bào.

Do vi khuẩn cần độ ẩm nhất định để sinh trưởng nên bằng cách phơi khô hoặc sấy khô, ta có thể bảo quản được lâu dài nhiều loại sản phẩm (hoa quả khô, cỏ khô, ruốc thịt khô,...).

2. Nhiệt độ

Hoạt động trao đổi chất của vi khuẩn có thể coi là kết quả của các phản ứng hóa học. Vì các phản ứng này phụ thuộc chặt chẽ vào nhiệt độ, nên yếu tố nhiệt độ rõ ràng ảnh hưởng sâu sắc đến các quá trình sống của tế bào. Tế bào thu được nhiệt độ chủ yếu từ môi trường bên ngoài, một phần cũng do cơ thể thải ra, do kết quả của hoạt động trao đổi chất.

Như đã nói trên, hoạt động của vi sinh vật bị giới hạn trong môi trường chứa nước ở dạng có thể hấp thụ. Vùng này của nước nằm từ 2⁰ đến khoảng 100⁰ gọi là vùng sinh động học. Hầu hết tế bào sinh dưỡng của vi sinh vật bị chết ở nhiệt độ cao protein bị biến tính, một hoặc hàng loạt enzyme bị bất hoạt. Các enzyme hô hấp đặc biệt là các enzyme trong chu trình Krebs rất mẫn cảm với nhiệt độ. Sự chết của vi khuẩn ở nhiệt độ cao cũng có thể còn là hậu quả của sự bất hoạt hóa ARN và sự phá hoại màng tế bào chất (nói chung các acid nucleic ít mẫn cảm với nhiệt độ so với các enzyme).

2.1. Nhiệt độ thấp (Dưới vùng sinh động học) có thể làm bất hoạt các chất vận chuyển các chất hòa tan qua màng tế bào chất, do thay đổi cấu hình không gian của permease chứa

trong màng hoặc ảnh hưởng đến việc hình thành và tiêu thụ ATP cần cho quá trình vận chuyển chủ động các chất dinh dưỡng.

Vi khuẩn thường chịu đựng được nhiệt độ thấp. Ở nhiệt độ dưới điểm băng hoặc thấp hơn chúng không thể hiện hoạt động trao đổi chất rõ rệt. Nhiệt độ thấp có thể coi là yếu tố chế khuẩn nếu làm lạnh quá nhanh. Trong trường hợp làm lạnh dần dần xuống dưới điểm băng, cấu trúc tế bào bị tổn hại do các tinh thể băng được tạo thành nhưng kích thước nhỏ, do tế bào không bị phân hủy. Nếu làm lạnh trong chân không, các tinh thể băng sẽ thăng hoa, đó là phương pháp đông khô vi sinh vật.

2.2. Nhiệt độ cao

Nhiệt độ cao trên 65°C sẽ gây tác hại cho vi sinh vật và ở nhiệt độ 100°C hoặc hơn vi sinh vật sẽ bị tiêu diệt gần hết trong một thời gian nhất định. Đó là do nhiệt độ cao đã làm biến tính protein tế bào, enzyme bất hoạt, màng tế bào bị phá hủy và có thể tế bào bị đốt cháy hoàn toàn.

Tác dụng của nhiệt độ cao đối với vi sinh vật còn có quan hệ với các nhân tố khác như thời gian tác động, sức chịu nhiệt của vi sinh vật, sức chịu nhiệt phụ thuộc vào bản chất tế bào đó là tính di truyền, tuổi và có hay không có nha bào và sau cùng là sự tồn tại của chúng trong môi trường có độ pH, thẩm áp và hợp chất hữu cơ khác nhau. Đây chính là cơ sở của việc khử trùng nhiệt độ cao có hiệu quả.

Giới hạn giữa nhiệt độ cực tiểu và nhiệt độ cực đại là vùng nhiệt sinh trưởng của vi sinh vật. Giới hạn này rất khác nhau giữa các loài vi khuẩn: tương đối rộng ở các vi khuẩn hoại sinh nhưng rất hẹp ở các vi khuẩn gây bệnh. Tùy theo quan hệ với vùng nhiệt có thể chia vi khuẩn thành một số nhóm.

a, Vi khuẩn ưa lạnh: sinh trưởng tốt nhất ở nhiệt độ dưới 20°C thường gặp trong nước biển, các hồ sâu và suối nước lạnh, chẳng hạn vi khuẩn phát quang, vi khuẩn sắt, hoạt tính trao đổi chất ở các vi khuẩn này thấp. Trong điều kiện phòng thí nghiệm, nhiều vi khuẩn ưa lạnh dễ dàng thích ứng với nhiệt độ cao hơn.

b, Vi khuẩn ưa ấm: chiếm đa số, cần nhiệt độ trong khoảng 20-40°C. Ngoài các dạng hoại sinh ta còn gặp các dạng ký sinh gây bệnh cho người và động vật, chúng sinh trưởng tốt nhất ở 37°C (trùng ứng với nhiệt độ cơ thể người và động vật).

c, Vi khuẩn ưa nóng: giới hạn nhiệt độ sinh trưởng là 30-70°C, thích hợp 55-60°C gồm các vi sinh vật sinh trưởng trong đất, phân rác, suối nước nóng.

Các vi khuẩn ưa nóng gồm chủ yếu là các xạ khuẩn, các vi khuẩn sinh bào tử. Thường gặp chúng trong suối nước nóng, trong phân ủ. Các giới hạn nhiệt độ cực tiểu, tối thích và cực đại được trình bày trong bảng sau.

Nhóm vi khuẩn	Nhiệt độ sinh trưởng (°C)		
	Cực tiểu	Tối thích	Tối đa
Ưa lạnh	0-5	5-15	15-20
Ưa ấm	10-20	20-40	40-45
Ưa nóng	25-45	45-60	60-80

Các loài *Bacillus* sống trong đất, thường có nhiệt độ sinh trưởng khá rộng (15 - 40°C). Vi khuẩn *E. coli* có nhiệt độ sinh trưởng 10 - 47,5°C. Vi khuẩn gây bệnh lậu *gonococcus* phát triển ở nhiệt độ 36 - 40°C. Năm 1983 J. A. Baross đã phát hiện có một loài vi khuẩn ưa nhiệt, sinh trưởng thích hợp ở 250 - 300°C.

3. Áp lực

Áp suất thẩm thấu và áp lực thủy tĩnh cũng ảnh hưởng đến sự phát triển của tế bào vi khuẩn.

Màng tế bào vi khuẩn là màng bán thấm và việc điều chỉnh thẩm áp qua các hệ thống permease đều có liên quan đến màng này. Trong môi trường ưu trương tế bào mất khả năng hút nước và các chất hòa tan, tế bào chịu trạng thái khô sinh lý, bị co nguyên sinh chất và có thể chết nếu kéo dài. Trong thực tế người ta áp dụng hiện tượng này để bảo quản cá bằng muối, muối dưa, bảo quản trái cây. Ngược lại khi đưa vi khuẩn vào dung dịch nhược trương nước sẽ xâm nhập vào tế bào, áp lực bên trong tế bào tăng lên.

Đa số vi khuẩn sinh trưởng tốt hơn trong môi trường chứa ít hơn 20% muối. Nồng độ muối cao hơn có hại cho tế bào, nhưng cũng có loại vi khuẩn sinh trưởng tốt trong môi trường chứa 30% muối, ta gọi chúng là vi khuẩn ưa muối, nhiều vi khuẩn ở biển thuộc nhóm này. Chúng có thể phát triển tốt trong môi trường có nồng độ đường cao gọi là vi khuẩn ưa đường.

4. Âm thanh

Sóng âm thanh đặc biệt là trong vùng siêu âm có ảnh hưởng lớn đến sự phát triển của vi khuẩn. Với tần số 8.800-8.900Hz xử lý trong 40-60 phút sẽ giảm 99% vi khuẩn. Các tế bào sinh dưỡng bị chết nhanh chóng, tế bào non mẫn cảm hơn nhiều so với tế bào già. Mẫn cảm nhất là tác dụng của sóng siêu âm lên các tế bào hình sợi, ít mẫn cảm nhất là các tế bào hình cầu. Nhưng sóng siêu âm hầu như không có tác dụng với các bào tử và các tế bào vi khuẩn kháng acid.

Do tác dụng của siêu âm mà độ nhớt của môi trường tăng lên, xuất hiện các chất nâng cao sức căng bề mặt và trong nguyên sinh chất hình thành bọt khí nhỏ. Kết quả là tế bào bị hủy hoại.

Hiện nay người ta ứng dụng siêu âm để thu nhận các chế phẩm vô bào hoặc để tách các enzyme nội bào, phân lập một số thành phần của tế bào, riboxom, thành tế bào và màng tế bào chất.

5. Sức căng bề mặt

Khi sinh trưởng trong môi trường dịch thể, vi khuẩn chịu ảnh hưởng của sức căng bề mặt của môi trường. Đa số các môi trường dịch thể dùng trong phòng thí nghiệm có sức căng bề mặt trong khoảng 5,7-0,63 mN/cm. Những thay đổi mạnh mẽ của sức căng bề mặt có thể làm ngừng sinh trưởng và làm chết tế bào. Khi sức căng bề mặt thấp, các thành phần tế bào bị tách khỏi tế bào. Điều này chứng tỏ thành tế bào bị tổn thương. Các chất nâng cao sức căng bề mặt, hầu hết là các muối vô cơ, các chất làm giảm sức căng bề mặt hầu hết là các acid béo, ancol, các chất này được gọi là các chất có hoạt tính bề mặt. Tác dụng của chúng thể hiện trong việc làm thay đổi các đặc tính của bề mặt tế bào vi khuẩn, trước hết là nâng cao tính thấm của tế bào. Trong thực tế người ta ứng dụng hiện tượng này trong nuôi cấy vi khuẩn kháng acid. Khác với các vi khuẩn khác, vi khuẩn kháng acid, có bề mặt kỵ nước và giảm sức căng bề mặt của môi trường sẽ kích thích sinh trưởng của chúng. Sức căng bề mặt còn ngăn cản vi khuẩn gắn vào bề mặt cứng, tránh cho chúng khỏi cạnh tranh sinh trưởng.

6. Tia bức xạ

Ánh sáng có thể gây ra những biến đổi hóa học và tổn thương sinh học, nếu tế bào hấp thụ. Mức độ gây hại tùy thuộc vào mức năng lượng trong lượng tử ánh sáng hay tùy thuộc vào chiều dài bước sóng ánh sáng. Các tia bức xạ gây nên những biến đổi hóa học của các nguyên tử và phân tử có chiều dài sóng khoảng 10000 Å. Thuộc loại sau: ánh sáng mặt trời, tia tử ngoại, tia X, tia Gamma và tia vũ trụ, các tia sáng này có năng lượng rất lớn. Khi được vật chất hấp phụ chúng có thể làm bắn ra các electron từ vật chất đó. Vì vậy các tia này được gọi là tia bức xạ ion hóa. Những bức xạ với chiều dài bước sóng lớn hơn có năng lượng quá nhỏ,

không đủ gây nên những biến đổi hóa học và tác dụng biểu hiện chủ yếu là nhiệt như tia hồng ngoại.

6.1. Ánh sáng mặt trời

Là nguồn tia sáng chiếu tự nhiên và có tác dụng phá hủy tế bào vi khuẩn (ngoại lệ vi khuẩn quang hợp sử dụng ánh sáng mặt trời làm nguồn năng lượng). Tác dụng này bị yếu đi nếu vi khuẩn chứa sắc tố hay vỏ nhầy.

Ánh sáng mặt trời cũng có thể gián tiếp tác động lên tế bào làm biến đổi môi trường. Chẳng hạn, các tụ cầu khuẩn *Staphylococcus* không sinh trưởng được trong môi trường thạch bị chiếu tia sáng mặt trời vài giờ.

Ảnh hưởng của ánh sáng mặt trời lên tế bào vi khuẩn được tăng cường khi xử lý tế bào bằng một số thuốc nhuộm (metylen,...). Người ta gọi hiện tượng này là có tác dụng quang động học ánh sáng.

6.2. Tia tử ngoại (tia cực tím -UV) [2]

So với các bức xạ ion thì tia tử ngoại có năng lượng nhỏ hơn. Khi bị vật chất hấp phụ, tia tử ngoại không gây nên hiện tượng ion hóa nhưng kích thích các phân tử, nghĩa là chuyển điện tử đến một mức cao hơn. Tác dụng mạnh nhất của tia tử ngoại là vùng có chiều dài bước sóng khoảng 254-260 nm nghĩa là vùng hấp thụ cực đại của acid nucleic và nucleoprotein. Dưới ảnh hưởng của tia tử ngoại, vi khuẩn bị chết hoặc bị đột biến theo loại vi khuẩn và liều lượng chiếu, bào tử của mốc có sức đề kháng cao.

Điều đáng chú ý là những hư hại do tia tử ngoại gây ra cho tế bào phần nào có tính đảo ngược. Nếu sau khi chiếu tia tử ngoại, ta lại cho vi khuẩn chịu tác dụng của ánh sáng ban ngày, thì nhiều vi khuẩn có khả năng sống sót và tiếp tục phân chia. Hiện tượng này gọi là hiện tượng quang tái hoạt. Trong quá trình quang tái hoạt một số enzyme gọi là enzyme sửa chữa được tổng hợp hoặc được hoạt hóa. Enzyme xúc tác trong việc phá hủy các liên kết dime-timin xuất hiện trong thời gian chiếu tia tử ngoại

Hiện tượng sửa chữa ADN bị tổn hại sau khi chiếu tia tử ngoại cũng xảy ra trong bóng tối. Trước hết các endonuclease tách rời các dime-timin nguyên vẹn ra, sau đó men ADN-polymerase tiến hành sửa chữa bằng cách tổng hợp các đoạn ADN bị thiếu, cuối cùng enzyme polynucleotidase liên kết các đoạn ADN mới tổng hợp lại.

Tia tử ngoại cũng ảnh hưởng đến các acid nucleic (đặc biệt với mARN) trong tế bào sinh vật. Cystein và các hợp chất chứa nhóm SH gần với nó có khả năng hấp phụ tia tử ngoại, do đó có tác dụng bảo vệ vi sinh vật khỏi tác hại của tia này.

Tia sáng mặt trời tuy có chứa một phần tia tử ngoại nhưng phần lớn những tia này bị khí quyển (mây, ozon,...) giữ lại. Vì vậy ánh nắng có tác dụng diệt khuẩn nhỏ hơn so với tia tử ngoại dùng trong phòng thí nghiệm.

Do lực xuyên sâu của tia tử ngoại kém, chỉ xuyên qua lớp nước trong và thủy tinh mỏng nên thường được sử dụng trong khử trùng không khí, như buồng cấy vi sinh vật, phòng mổ.

III. ẢNH HƯỞNG CỦA CÁC YẾU TỐ HÓA HỌC

Trong các yếu tố hóa học ảnh hưởng đến chức phận sống của tế bào, trước hết phải kể đến, nồng độ ion hydro (pH), thế oxy hóa khử của môi trường, các chất sát trùng và các chất hóa trị liệu.

1. Ảnh hưởng của pH môi trường

pH môi trường có ý nghĩa quyết định đối với sự phát triển của vi sinh vật. Các ion H^+ và OH^- là hai ion hoạt động lớn nhất trong tất cả các ion, những biến đổi dù nhỏ trong chúng cũng ảnh hưởng mạnh mẽ. Cho nên việc xác định pH thích hợp ban đầu và pH duy trì trong quá trình nuôi cấy là việc làm hết sức quan trọng. Giới hạn hoạt động của vi sinh vật trong

khoảng pH= 4-10. Đa số vi sinh vật sinh trưởng tốt trong môi trường có pH =7, nhưng nhiều vi khuẩn gây bệnh trên cơ thể người và động vật thì pH của máu, huyết thanh là 7,4. Các vi khuẩn nitrat hóa, vi khuẩn nốt sần, vi khuẩn phân giải ure lại ưa môi trường kiềm, một số khác lại ưa acid như *Acetobacter acidophilus*, *Thiobacillus thioxydans* (oxy hóa lưu huỳnh thành SO_4 có thể sinh trưởng ở pH <1).

pH của môi trường không những ảnh hưởng mạnh mẽ đến sinh trưởng mà còn tác động sâu sắc đến quá trình trao đổi chất.

Màng tế bào chất của vi khuẩn ít thấm đối với các ion H^+ và OH^- . Mặc dù pH bên ngoài môi trường dao động trong giới hạn rộng, nồng độ của hai ion trong tế bào chất nói chung tương đối ổn định. Ảnh hưởng của pH môi trường lên hoạt động của vi sinh vật có thể do kết quả của sự tác động qua lại giữa ion H^+ và men chứa trong màng tế bào chất và thành tế bào.

Để duy trì pH trong quá trình nuôi cấy, đối với các vi khuẩn sinh acid nhưng lại không chịu được acid (*Lactobacillus*, *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas*) người ta thêm các chất đệm, thường là các muối của các acid yếu (phosphat, acetat, carbonat).

2. Thế oxy hóa khử (Eh)

Mức độ thoáng khí, nói cách khác là độ oxy hóa khử của môi trường có quan hệ chặt chẽ với hoạt động sống của vi sinh vật, được biểu thị bằng đại lượng rH: $rH = -\log(H_2)$, ở đây H_2 là nồng độ nguyên tử của H trong dung dịch hay trong khí quyển. Dung dịch bão hòa hydro có rH=0, bão hòa oxy có rH=41. Thang rH từ 0-41 biểu thị mức độ thoáng khí của môi trường, pH có ảnh hưởng đến giá trị rH của môi trường, sự phụ thuộc này biểu thị bởi phương trình:

$rH_2 = +2pH$ (Eh: thế oxy hóa khử (điện thế dung dịch) tính ra volt).

Các vi sinh vật kỵ khí tuyệt đối sinh trưởng ở $rH < 8 - 10$.

Vi sinh vật hiếu khí bắt buộc rH_2 từ 10-30.

Các giá trị $rH_2 > 30$ không có lợi ngay cả vi sinh vật hiếu khí bắt buộc.

Vi sinh vật kỵ khí hay hiếu khí tùy tiện thích ứng ở $rH_2 = 0 - 30$.

Ứng dụng: trong nuôi cấy vi sinh vật hay trong bảo quản, chế biến có thể khống chế lượng oxy để tăng cường hay ức chế sự tăng trưởng của vi sinh vật. Trong điều kiện cần thiết có thể điều chỉnh độ pH như làm giảm pH môi trường thì Eh sẽ giảm (rH giảm) để có thể nuôi cấy được vi khuẩn yếm khí bắt buộc trong môi trường có oxy.

Oxy có vai trò hết sức quan trọng trong hoạt động sống của vi sinh vật. Trong không khí, O_2 chiếm 20,95% thể tích và 23,14% khối lượng.

Tùy thuộc vào nhu cầu đối với oxy mà người ta chia vi sinh vật thành các nhóm sau đây.

-Hiếu khí bắt buộc: thuộc nhóm này là các vi sinh vật chỉ có thể sinh trưởng được khi có mặt oxy phân tử. Chúng có chuỗi hô hấp hoàn chỉnh, dùng O_2 làm thể nhận hydro cuối cùng.

-Hiếu khí không bắt buộc: thuộc nhóm này là các vi sinh vật có thể sinh trưởng được cả trong điều kiện có oxy lẫn trong điều kiện không có oxy, có oxy chúng sinh trưởng tốt hơn. Ví dụ: *E. coli*, *Proteus*,...

-Vi hiếu khí: thuộc nhóm này là các vi sinh vật chỉ sinh trưởng được trong điều kiện áp lực oxy rất thấp, các loại như *Vibrio cholerae*, *Zyomonas*,...

-Kỵ khí chịu đựng: đó là những vi khuẩn kỵ khí nhưng tồn tại được khi có mặt của oxy. Chúng không sử dụng oxy, không có chuỗi hô hấp, nhưng sự có mặt của oxy không có hại cho chúng. *Streptococcus lactic*, *S. faecalis*.

-Kỵ khí: với các vi sinh vật thuộc nhóm này sự có mặt của oxy là có hại với chúng, chúng chỉ sinh trưởng được trong môi trường dịch thể sâu, nơi không có oxy.

3. Các chất diệt khuẩn (sát trùng)

Các chất diệt khuẩn thường dùng nhất là phenol và các hợp chất của phenol, các ancol, halogen, kim loại nặng, H₂O₂ các thuốc nhuộm, xà phòng và các chất tẩy rửa tổng hợp của các muối amon bậc bốn.

3.1. Phenol

Được dùng ở dạng các dung dịch để sát trùng các dụng cụ bị nhiễm bẩn. Tùy theo nồng độ của phenol có tác dụng ức khuẩn hay diệt khuẩn. Hoạt tính của phenol bị giảm trong môi trường kiềm và có mặt chất hữu cơ, trái lại tăng lên khi có mặt muối. Bào tử của vi sinh vật kháng lại tác dụng của phenol.

Một dẫn xuất của phenol như crezol có hoạt tính mạnh hơn phenol.

Phenol và crezol tác dụng chủ yếu lên lớp màng tế bào, phá hoại tính bán thấm của màng tế bào chất và làm biến tính protein.

3.2. Ethanol

Dùng để sát trùng da, nhưng cũng như phenol ethanol không có tác dụng với bào tử. Chẳng hạn, bào tử của *Bacillus subtilis* có thể sống trong ethanol 9 năm, *B. anthracis* 20 năm.

Alcohol tác dụng bằng cách gây đông tụ protein và dung giải cấu trúc màng phospholipid. Nhưng alcohol có nồng độ cao khử nước mạnh, do đó rút nước khỏi tế bào, cản trở sự xâm nhập của ancol vào tế bào vì vậy chỉ có tác dụng ức khuẩn, cố định vi khuẩn (ethanol 70% có tác dụng sát trùng mạnh hơn 90%).

3.3. Các halogen tác dụng độc với vi khuẩn

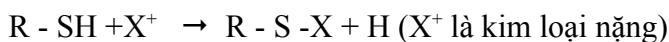
Khí Cl₂ được dùng để sát trùng nước, các hợp chất của Cl được dùng để khử trùng nước.

Một chất quan trọng trong nhóm halogen là iot. Iot dễ hòa tan trong ancol và trong dung dịch nước của ioduua kali hoặc natri. Iod có tác dụng sát trùng mạnh với tất cả các loài vi khuẩn và bào tử, thường dùng để sát trùng da tẩy và không khí (I+iodua kali, khử trùng không khí).

3.4. Kim loại nặng

Đa số kim loại nặng dù ở dạng nguyên chất hay hợp chất đều có tác dụng đầu độc với vi khuẩn, đáng kể nhất là bạc, thủy ngân, đồng, asen,...

+**Bạc** thường sử dụng để làm sạch nước uống và điều chế các hợp chất kháng khuẩn. Tác dụng của bạc cũng như các ion kim loại nặng khác là làm bất hoạt các nhóm -SH trong phân tử enzyme và permease.



+**Thủy ngân** là chất có tác dụng mạnh nhất trong nhóm kim loại nặng, người ta thường dùng HgCl để sát trùng ở nồng độ 1/1000 đã có khả năng sát khuẩn mạnh. Tác dụng chủ yếu của thủy ngân là kìm hãm sự lên men của các acid amin có nhóm -SH và gây kết tủa protein tế bào (có tác dụng tương đối với các cơ thể bậc cao, nên dùng để sát trùng da).

+**Đồng** và các muối đồng cũng có tác dụng diệt khuẩn mạnh nhưng tác dụng mạnh hơn đối với nấm. CuSO₄ và CuCl₂ gây đông vón protein.

+**Arsen** ít độc với các cơ thể sinh vật bậc cao ở liều lượng nhỏ nhưng có tác dụng diệt khuẩn, chế phẩm của arsen như salyarsan, neosalvarsan dùng khử trùng, điều trị bệnh giang mai.

+**Peroxit hydro (H₂O₂)** và permanganat kali (KMnO₄) là những chất oxy hóa mạnh tác dụng kìm hãm nhóm -SH trong enzyme



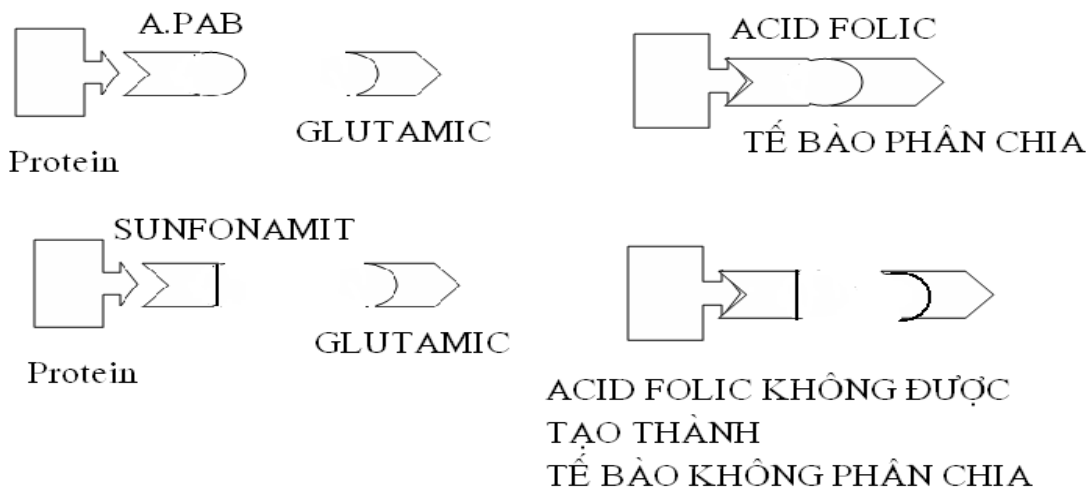
Hiện nay ngoài việc dùng một số hóa chất để sát trùng da, các dụng cụ dược phẩm, thực phẩm, nước uống,... Người ta dùng các dung dịch như brom 1%, HgCl 0,1%, cồn, AgNO₃ để sát trùng bề mặt hạt giống.

+**Xà phòng**: chủ yếu là loại bỏ một cách cơ học khỏi bề mặt da một số vi khuẩn gây bệnh. Xà phòng làm giảm sức căng bề mặt, hòa tan và tẩy đi các vết bẩn qua đó cũng loại bỏ các vi sinh vật.

+**Các chất hóa trị liệu**: đó là các chất có tác dụng độc đối với vi khuẩn nhưng không gây hại cho cơ thể bậc cao (khác với chất sát trùng).

Cơ chế tác dụng của các chất hóa trị liệu là dựa vào sự tương tự về cấu trúc của các chất này với các hợp chất mà vi khuẩn cần để tạo thành các coenzyme, protein và các acid nucleic. Các chất hóa trị liệu cạnh tranh vị trí gắn với các hợp chất đó trên phân tử enzyme và kìm hãm nhiều phản ứng sinh hóa quan trọng. Đa số các chất hóa trị liệu được dùng để điều trị các bệnh khác nhau. Các chất hóa trị liệu quan trọng nhất là các sulfonamid dẫn xuất từ acid p-aminosulfonic. Đó là những chất đối kháng của acid p-aminobenzoic (P. ABA) do vậy cạnh tranh trên phân tử enzyme với PABA, các sulfonamid kìm hãm việc tạo thành acid folic là tiền chất của coenzyme tham gia vào quá trình tổng hợp một số acid amin và purin (base nitơ hai vòng Adenin và Guanin).

Các hợp chất của sulfonamid có phổ kháng khuẩn mạnh nên thường được dùng điều trị bệnh nhiễm khuẩn.



IV. ẢNH HƯỞNG CỦA CÁC YẾU TỐ SINH HỌC HAY TƯƠNG TÁC GIỮA VI SINH VẬT VỚI VI SINH VẬT VÀ VỚI VI SINH VẬT KHÁC [4]

4.1. Kháng sinh

4.1.1. Khái niệm và phân loại chất kháng sinh

Năm 1928 A. Fleming phát hiện thấy sự ức chế của nấm penicilium đối với *Staphylococcus aureus* khi chúng mọc cạnh nhau. Ông đã nghiên cứu kỹ về nấm này và chất tiết của nó, phát hiện ra kháng sinh penicilin đầu tiên vào 1940. Các nhà khoa học đã tách chiết penicillin và dùng chữa bệnh do vi trùng gây ra, ngày nay có nhiều kháng sinh mới được chiết xuất để chữa bệnh.

Trước đây người ta có xu hướng định nghĩa thuốc kháng sinh là mọi chất do cơ thể sống sinh ra (hầu hết là vi sinh vật) và nói chung chất đó có tác dụng ngăn cản và phá hoại sự phát triển của vi khuẩn. Các chất này có thể chiết xuất và tinh chế, có thể dùng để chữa bệnh.

Nhưng đến nay sản phẩm do vi sinh vật tạo ra đã được xác định thành phần hóa học. Người ta có thể sản xuất chất kháng sinh bằng cách tổng hợp (Chloramphenicol). Mặt khác các nhà hóa học đã thay đổi chất đầu tiên để tạo ra nhiều chất khác. Những phân tử bán tổng hợp này có nhiều tính chất tốt hoặc chọn lọc hơn chất chiết xuất ban đầu như penicillin, xerospirin, tetracyclin,... Vì vậy định nghĩa trên phải thay đổi phải mang tính khái quát hơn, phải bao gồm một số sản phẩm hóa học, phần lớn là do tổng hợp, có tác dụng chống vi khuẩn.

Trước khi đề cập đến định nghĩa thuốc kháng sinh ta cần phân biệt các chất sát khuẩn thường dùng với các nhân tố hóa học dùng để chữa bệnh.

Thuốc sát khuẩn: là những chất hóa học rất khác nhau, có tác dụng mạnh đối với vi khuẩn, làm phá hủy vi khuẩn. Bằng quá trình lý, hóa học chúng có tác dụng một cách toàn bộ và trực tiếp lên tế bào hoặc màng tế bào làm cho vi khuẩn bị ly giải hay làm biến tính toàn bộ, hoặc phối hợp cả hai hiện tượng này ở mức độ khác nhau.

Các thuốc sát khuẩn khác kháng sinh ở chỗ, **tác động hóa học và ít đặc hiệu** (tất cả các vách tế bào mà thuốc ngấm vào đều bị tác dụng, đều nhạy cảm), do đó liệu có hiệu quả với chúng gần với liều độc.

Tác dụng phổ biến của chúng là ức chế vi khuẩn, vì vậy vi khuẩn có thể phục hồi trở lại.

Trong ứng dụng thực tế, thuốc sát khuẩn nguy hại đến cơ thể sống.

Định nghĩa thuốc kháng sinh hay nhân tố hóa học liệu pháp: Với những đặc điểm khác nhau trên ta có thể định nghĩa (theo nghĩa rộng): **Kháng sinh là mọi chất có tác động chống vi khuẩn, ngăn cản vi khuẩn nhân lên hoặc phá hủy vi khuẩn ở liều thấp (tầm phân tử) một cách đặc hiệu, vào một hay nhiều giai đoạn chuyển hóa cần thiết cho sự sống của vi khuẩn, hoặc tác động vào sự sống của vi khuẩn, hoặc tác động vào sự cân bằng hóa lý.**

Kháng sinh tác động đặc hiệu có nghĩa là một loại kháng sinh chỉ tác động lên một hay một số nhóm vi khuẩn nhất định. Tính đặc hiệu của kháng sinh càng cao thì hoạt phổ của nó càng hẹp. Hoạt phổ của một kháng sinh là phạm vi các loại vi khuẩn mẫn cảm với kháng sinh đó đối với toàn bộ giới vi khuẩn. Người ta chia kháng sinh thành: kháng sinh hoạt phổ rộng và kháng sinh hoạt phổ hẹp.

Theo nghĩa hẹp: Kháng sinh (antibiotic) là chất đặc hiệu do sinh vật sinh ra trong quá trình sống, ngay ở nồng độ thấp cũng có khả năng ức chế hoặc tiêu diệt các vi sinh vật một cách chọn lọc.

Phân loại kháng sinh

Có nhiều cách phân loại kháng sinh khác nhau: có thể căn cứ vào nguồn gốc, tính chất hóa học, tính chất chữa bệnh, theo hiệu quả tác động lên vi khuẩn. Xét phương diện vi sinh vật chúng tôi chỉ giới thiệu phân loại theo nguồn gốc còn các cách phân loại khác sẽ được giới thiệu trong phần dược lý.

-Căn cứ vào nguồn gốc

Có thể sản xuất bằng cách, tổng hợp hóa học hoàn toàn, bán tổng hợp, nghĩa là hóa tổng hợp từ một nhân cơ bản do vi sinh vật sản xuất ra, nguyên liệu lấy hoàn toàn từ vi sinh vật (từ vi khuẩn, xạ khuẩn, nấm mốc).

+ Kháng sinh từ vi khuẩn

Kháng sinh có nguồn gốc từ vi khuẩn không nhiều, trong đó chỉ có một vài loại được sử dụng rộng rãi.

Vi khuẩn	Kháng sinh	Phổ tác dụng
<i>Bacillus licheniformis</i>	Bacitdraxin	Gram +
<i>Ba. polymixa</i>	Polimycin	Gram- và Gram+
<i>Bac. brevis</i>	Tirotricin	Tụ cầu, liên cầu

+ Kháng sinh từ xạ khuẩn

Kháng sinh từ xạ khuẩn chiếm một lượng lớn

Xạ khuẩn	Kháng sinh	Phổ tác dụng
<i>Streptomyces griceus</i>	Strepstomycin (A, B, C)	Gram âm
<i>Actinomyces fradiae</i>	Neomycin	Gram + và Gram-
<i>Act. kanamyceticus</i>	Kanamycin	Gram -

+ Kháng sinh từ nấm mốc

Kháng sinh từ nấm mốc có số lượng lớn, có độ độc cao nên ít dùng trong thực tiễn.

Loại nấm	Kháng sinh	Phổ kháng sinh
Penixillium Chrysogenum	Penecilin, G, F, K, X,V, O	Gram +

+ Kháng sinh từ thực vật

Nhiều loại thực vật có chứa trong thân, lá, quả, những chất có khả năng gây ức chế hoặc tiêu diệt vi sinh vật. Những chất này gọi là kháng sinh thực vật.

Alicin (có trong tỏi), Lactuxin (bò công anh), Ocubin (có trong lá mã đề),...

+ Kháng sinh từ động vật

Cơ thể động vật cũng có khả năng tiết ra những chất có tính kháng sinh.

Lyzozim: có trong nước bọt, nước mắt, niêm dịch, huyết thanh, lòng trắng trứng (phá vỡ thành vi khuẩn).

Eritrin: từ hồng cầu động vật

Kháng thể: có trong huyết thanh của động vật, trong sữa đầu của động vật, có vai trò vô cùng quan trọng trong miễn dịch học.

4.1.2.. Một số vấn đề về kháng sinh

Trên đây chúng ta đã tìm hiểu về nguồn gốc, đặc tính, tác dụng của kháng sinh. Qua đó có thể thấy bản chất hóa học của chất kháng sinh quyết định đặc tính, tác dụng của chúng. Các chất có bản chất hóa học khác nhau thì hoạt động của chúng cũng khác nhau. Và ngược lại những chất có bản chất hóa học tương tự sẽ có sự hoạt động tương tự.

- Cơ chế tác động của kháng sinh

Thuốc kháng sinh tác động ở tầm phân tử, nó tác động vào tế bào vi khuẩn theo hai cơ chế sau đây:

+Cơ chế che phủ: Thuốc kháng sinh gắn lên một phân tử nhất định và ngăn cản hoạt động của enzyme trên phân tử.

+Cơ chế cạnh tranh: Do gần giống cấu trúc phân tử, chất kháng sinh chiếm được chỗ của một chất khác. Đặc biệt nó có thể chiếm chỗ một phân tử cần thiết cho sự chuyển hóa của vi khuẩn. Hai phân tử này giống nhau, cạnh tranh với enzym, làm rối loạn hoạt động của tế bào: các sulfamid, β -Lactamin.

Acid paraminobenzoic là chất cần thiết để tổng hợp nên acid folic. Acid folic là một vitamin rất quan trọng cho sự tổng hợp nên các bazơ purin và pyrimidin, các acid amin: methionin và serin, Sulfamid cạnh tranh với P. ABA làm cho tế bào không thể tổng hợp được acid folic và sau đó là các purin và pirimidin tương ứng. Hai cơ chế trên tác động vào 4 hướng sau:

-Làm ngừng tổng hợp vách tế bào, kháng sinh ngăn trở murein (thành phần có trong cấu tạo màng vi khuẩn). Ví dụ: penicilin.

-Tác động vào màng, làm cho màng tế bào chất thay đổi tính thấm, hoặc phá vỡ màng tế bào chất, làm ngưng quá trình trao đổi chất.

-Ức chế quá trình tổng hợp acid nucleic, đó là tổng hợp ARN hay ADN của tế bào. Ví dụ: Actinomycin

-Làm ngưng quá trình tổng hợp protein, hoặc xúc tiến tổng hợp protein nhưng không có quan hệ khăng khít với quá trình sống của tế bào. Ví dụ: Chloramphenicol, Streptomycin.

- Hiện tượng kháng thuốc của vi sinh vật

Sự xuất hiện các dạng vi khuẩn kháng thuốc có ý nghĩa đặc biệt trong hóa học trị liệu. Một số vi khuẩn khi chịu tác động của những liều nhỏ kháng sinh, thường mất hoặc giảm tính mẫn cảm với kháng sinh loại đó. Quá trình này được gọi là quá trình phát triển sự đề kháng hay sự phát triển tính không mẫn cảm.

Hiện tượng kháng thuốc đang là mối lo ngại lớn, gây ra khó khăn trong việc dùng kháng sinh điều trị bệnh nhiễm khuẩn. Vấn đề kháng thuốc được phát hiện ra khi dùng kháng sinh trong điều trị một cách rộng rãi như penicillin, streptomycin, sulfonamid.

Khoảng 20 năm sau khi sử dụng rộng rãi kháng sinh, penicillin, streptomycin, người ta đã phát hiện thấy ngày càng có nhiều vi khuẩn có khả năng chống lại tác dụng hóa trị liệu của các kháng sinh như penicilin, streptomycin và sau đó là của tetracyclin và chlormphenicol,...của trực khuẩn mủ xanh và sự kháng thuốc của các vi khuẩn như *E. coli*, *Salmonella*, *Shigella*, nấm mốc, nấm men,...

Trước năm 1955 streptomycin diệt được tất cả các vi khuẩn lao, nhờ đó mà bệnh lao được kiềm chế. Ngày nay đã có hơn 40% vi khuẩn lao đã kháng lại kháng sinh này, làm mất hiệu quả của kháng sinh. Khi dùng tetracyclin hiệu quả điều trị rất cao nhưng sau đó vi khuẩn lao lại trở với tetracilin, tiếp đến penicilin cũng mất hiệu lực luôn.

-Cơ chế hình thành tính kháng thuốc của vi sinh vật

Trước hết phải thấy rằng quá trình hình thành tính kháng thuốc của vi sinh vật phụ thuộc vào nhiều yếu tố:

- Nồng độ và bản chất kháng sinh

-Thời gian tác động

- Cơ chế tác dụng của kháng sinh

-Đặc tính của vi sinh vật và nhiều nhân tố khác

Mặc dù có sự tác động khác nhau giữa các loại kháng sinh lên vi sinh vật, nhưng cơ chế hình thành tính kháng thuốc thì chủ yếu do hai cơ chế sau:

***Kháng thuốc do biến đổi về bộ máy di truyền của vi sinh vật**

Cấu trúc ADN bị thay đổi do tác động của kháng sinh làm thay đổi thứ tự của các bazơ kiềm, làm xuất hiện các chức năng khác thường của tế bào tạo nên sự kháng thuốc, đó là.

-Làm cho kháng sinh bị giữ lại ở bề mặt tế bào, không xâm nhập vào bên trong. Tế bào ở trạng thái kém mẫn cảm với kháng sinh.

-Làm tế bào tăng cường tổng hợp các men cảm ứng có khả năng phân hủy chất kháng sinh trước khi chất này gây tác hại.

-Làm cho quá trình trao đổi chất của tế bào không mẫn cảm với chất kháng sinh, quá trình này có liên quan đến sự biến đổi về acid nucleic và protein và có sự giảm thấp quá trình sinh hóa học của tế bào. Kết quả là chất kháng sinh không gây nên sự tổn thương sâu sắc đến trao đổi chất tế bào.

- Có thể bằng cách khác nữa, vi sinh vật đã tạo cho nó khả năng kháng thuốc, trong nhiều trường hợp đặc tính kháng thuốc được củng cố vững chắc và truyền lại cho thế hệ sau hoặc tế bào khác bằng con đường biến nạp và tải nạp.

***Cơ chế kháng thuốc gây nên bởi nhân tố kháng thuốc**

Tính kháng nhiều thuốc của cùng một chủng vi khuẩn, mặc dù nó chưa hề tiếp xúc trực tiếp với các loại thuốc đó đã được xác định bởi Kitamoto (1956) đối với *Shigella*. Nhân tố kháng thuốc, plasmid-R được phát hiện ra 1960 với đặc điểm:

- Cấu tạo ADN xoắn kép, khép vòng nên quan sát có hình tròn.
- Tồn tại tách biệt NST, gắn vào thành trong màng tế bào.
- Một vi khuẩn có từ một đến nhiều plasmid, có khoảng 30 loại plasmid kháng kháng sinh.

Nhân tố R là một phức hợp gồm hai thành phần:

1- Gen chủ trì việc đối kháng kháng sinh, gồm một bộ gen có thể đối kháng với nhiều loại kháng sinh, mỗi gen chịu trách nhiệm đề kháng với một loại kháng sinh, nhưng cũng có một gen có thể kháng hai loại.

2- Gen chỉ đạo và quy phạm hóa sự tái sinh các nhân tố R

Trong tế bào vi khuẩn kháng thuốc, hai thành phần trên có thể kết hợp với nhau hoặc tách rời nhau, mỗi phần đều ở dạng xoắn kép và có khả năng nhân đôi độc lập.

Khi có sự tiếp xúc với một kháng sinh nào đó, gen tương ứng trong bộ gen R của nhân tố R sẽ đọc mã cho sự tổng hợp lại một gen chống lại kháng sinh này như men β -lactamase chống ampicilin, men axetinasferase chống lại Chloramphenicol,....

Hiện tượng kháng nhiều thuốc được truyền qua lại bằng con đường tiếp hợp, không kèm theo sự truyền NST của tế bào, đó là con đường truyền ngoài nhân, nhờ những nhân tố di truyền tế bào chất. Khi một vi khuẩn không hoặc chưa có nhân tố di truyền R-plasmid thì nó là vi khuẩn trần, rất có thể bị kháng sinh tiêu diệt, khi vi khuẩn trần được các vi khuẩn plasmid truyền cho vũ khí bí mật này thì nó có khả năng chống đối lại kháng sinh.

-Biện pháp đối với tính kháng thuốc

Trước hết phải đề cập đến một vấn đề là việc sử dụng rộng rãi thuốc kháng sinh có quan hệ gì đến tính kháng thuốc của vi khuẩn.

Việc dùng thuốc kháng sinh rộng rãi để chữa bệnh, tất nhiên sẽ dẫn đến một hiện trạng là sẽ tạo ra những tế bào thích ứng, sự thích ứng nhanh hay chậm phụ thuộc vào nồng độ và phương pháp sử dụng. Các tế bào này cũng có tính thích ứng một cách bền vững và có thể di truyền. Qua nghiên cứu cho thấy các vi khuẩn mang plasmid tồn tại khắp nơi, kể cả những nơi không bao giờ sử dụng đến chất kháng sinh, như tách vi khuẩn từ phân của động vật hoang dại, hoặc các vi khuẩn có trong các mẫu hóa thạch đều tách được các plasmid kháng kháng

sinh, nhưng hiển nhiên việc dùng kháng sinh rộng rãi sẽ làm cho nhân tố kháng thuốc được lan truyền rộng nhờ chọn lọc.

Để đối phó với tính kháng thuốc của vi sinh vật người ta có những biện pháp:

- Hạn chế tối đa sử dụng kháng sinh trong điều trị và phòng ngừa (bổ sung vào trong thức ăn cho gia súc).

- Tìm kiếm các loại kháng sinh mới và nghiên cứu sử dụng phối hợp nhiều loại kháng sinh trong điều trị, khi sự kết hợp mất hiệu lực mới nghĩ đến chuyện tăng liều lượng nhưng không phải tăng mãi được mà phải tìm ra loại kháng sinh mới. Tránh dùng liều thấp và kéo dài.

- Làm thay đổi các bản chất của các plasmid hoặc ngăn ngừa sự tái sinh và sự truyền plasmid giữa các tế bào. Hiện nay bằng kỹ thuật hiện đại người ta có thể tách các mảnh plasmid và ghép các mảnh này lại thành một plasmid hoàn chỉnh. Điều này cho phép lai tạo giữa các plasmid của các tế bào khác nhau, hoặc ghép các mảnh ADN lấy từ virus, tế bào động vật, tế bào ung thư,... để ghép thành những plasmid có chức năng định hướng theo ý muốn, việc làm này có triển vọng trong điều trị bệnh ung thư và chống lại hiện tượng kháng thuốc.

4.2. Tế bào diệt tự nhiên và các yếu tố hòa tan

Tế bào diệt tự nhiên hay tế bào NK (Natural killer cell) khi tế bào bị nhiễm virus lại lần thứ hai. Bạch cầu có khả năng nhận biết các thay đổi trên bề mặt một tế bào bị nhiễm virus. Tế bào NK sẽ gắn vào các tế bào đích và có thể diệt chúng. Tế bào NK được hoạt hóa bởi interferon, interferon được sản xuất bởi các tế bào nhiễm virus và cũng có khi bởi tế bào lympho. Ngoài tác động trên tế bào NK ra, interferon còn có khả năng tạo ra tình trạng đề kháng virus cho những tế bào chưa bị nhiễm virus ở các mô. Interferon được sản xuất ra có thể chống lại nhiều loại virus khác nhau.

Trong huyết thanh của cơ thể bị nhiễm trùng, nồng độ của nhiều loại protein đã gia tăng nhanh chóng. Các protein này được gọi chung là "protein pha cấp tính" (acute phase protein). Nồng độ các protein pha cấp có tăng từ 2-100 lần so với mức bình thường và chúng tiếp tục giữ ở mức độ cao trong suốt quá trình nhiễm trùng.

Bổ thể là một chuỗi khoảng 20 protein huyết thanh tác dụng nối tiếp nhau theo một phản ứng chuỗi, đồng thời chúng cũng tác dụng với những thành phần khác của hệ thống miễn dịch bẩm sinh và thu được. Sau khi được hoạt hóa một số thành phần bổ thể có tác dụng opsonin hóa vi khuẩn và giúp cho quá trình thực bào, trong khi đó một số thành phần khác đóng vai trò thu hút các tế bào thực bào đến hiện trường nhiễm trùng. Một nhóm thành phần bổ thể khác tạo ra sự ly giải trực tiếp đối với màng tế bào vi khuẩn.

4.3. Kháng thể

Kháng thể là những phân tử được sản xuất bởi tế bào lympho B, một loại tế bào của hệ thống miễn dịch thu được. Kháng thể hoạt động với tư cách là cầu nối giữa vi sinh vật gây bệnh với tế bào thực bào.

Từ đó chúng ta có định nghĩa kháng thể: **Kháng thể là các globulin trong máu của động vật, có khả năng liên kết đặc hiệu với kháng nguyên đã kích thích sinh ra nó.** Kháng thể chủ yếu được tìm thấy trong huyết thanh của động vật, do vậy huyết thanh chứa kháng thể đặc hiệu kháng nguyên được gọi là kháng huyết thanh.

Kháng thể cũng có thể được tìm thấy trong các dịch thể khác của cơ thể, như sữa. Những kháng thể có sẵn trong sữa hay huyết tương của người, động vật từ trước khi có sự tiếp xúc với kháng nguyên gọi là kháng thể tự nhiên hay kháng thể không đặc hiệu.

Kháng thể đặc hiệu là kháng thể được sinh ra do kích thích của kháng nguyên (vi sinh vật) và kết hợp đặc hiệu với kháng nguyên ấy.

Khi kháng nguyên và kháng thể tương ứng kết hợp với nhau sẽ xảy ra phản ứng ngưng kết.

4.4. Tiêu độc và khử trùng

Công tác tiêu độc, khử trùng đặc biệt quan trọng trong nhiều lĩnh vực như công nghệ sinh học, chế biến, dự trữ thức ăn, phòng và trị bệnh và trong nhiều lĩnh vực nghiên cứu khác nữa.

4.4.1. Tiêu độc và phương pháp tiêu độc

Tiêu độc là tên chung để chỉ các biện pháp sử dụng hóa chất để hủy hoại vi sinh vật, tuy nhiên có thể sử dụng các biện pháp vật lý và sinh học.

Khi có mặt của các chất tiêu độc, vi sinh vật sẽ ngừng sinh trưởng và chết. Quá trình tiêu độc không phải phát sinh ngay một lúc mà diễn ra tuần tự theo một qui luật nhất định. Trong một số đơn vị thời gian số lượng vi sinh vật chết lúc bắt đầu nhiều, tiếp theo tùy theo sự tăng dần về thời gian mà sự giảm dần được thể hiện qua đường cong tử vong.

Như vậy số lượng vi khuẩn trong môi trường càng lớn thì thời gian tiêu độc càng dài, điều này có ý nghĩa trong thực tiễn tiêu độc để đạt hiệu quả cao nhất.

Các nhân tố ảnh hưởng đến tiêu độc

Tác dụng của tiêu độc phụ thuộc vào nhiều yếu tố:

+Trước hết phụ thuộc vào loại hình các nhân tố tác động và cường độ tác động của chúng, đó là nhân tố vật lý hay hóa học, hóa chất loại gì,...

+Đặc tính của tế bào: loài giống trạng thái sinh lý tế bào, tuổi tế bào, có hình thành nha bào, giáp mô hay không, hàm lượng muối của từng loại tế bào.

+Tính chất của môi trường mà vi sinh vật tồn tại: trạng thái môi trường rắn, lỏng, thành phần môi trường, nồng độ ion, pH môi trường, sự tồn tại các chất hữu cơ và nhiệt độ môi trường.

+Thời gian tác động của từng nhân tố.

Những nhân tố này có quan hệ và tác động qua lại lẫn nhau.

Phương pháp tiêu độc

Những hóa chất vừa có thể là chất ức chế, chất phòng thối hay chất tiêu độc, khử trùng khi có sự thay đổi về nồng độ hoặc có những tác động khác. Tùy theo mục đích yêu cầu công việc mà sử dụng các hóa chất hợp lý đạt hiệu quả cao.

Để ngăn ngừa sự lên men thối trong các chế phẩm, sản phẩm chế biến để cho con người và gia súc ta phải sử dụng các hóa chất với nồng độ không gây độc trong chế biến bảo quản. Hóa chất này gồm hai nhóm:

Nhóm chất hữu cơ: các acid hữu cơ: lactic, citric, acetic, beoic, salicilic, muối: benzoat, salixilat, tiophosphat metin, etilic, khói củi và gia vị.

Nhóm chất vô cơ: acid boric, muối borat, acid sunfuaric, kiềm, muối kiềm, NaCl, nitrat, halogen, peoxit, các khí.

4.4.2. Khử trùng và phương pháp khử trùng

Khử trùng là một phương pháp loại trừ hoàn toàn vi sinh vật có trong môi trường nào đó bằng cách tiêu diệt hay loại bỏ chúng.

* Ý nghĩa của khử trùng:

Tránh lây truyền, gây nhiễm vi sinh vật từ nơi này sang nơi khác, vật này sang vật khác, từ vật thể nào đó sang cơ thể động vật.

Đảm bảo độ chính xác của thí nghiệm, sự thuần khiết trong công tác vệ sinh như nuôi cấy, phân lập, giữ giống.

Đảm bảo sự bảo quản lâu dài của các môi trường dinh dưỡng, thuốc, thực phẩm và các dụng cụ tinh xảo khác.

Những nhân tố có quan hệ đến khử trùng có nhiều và cũng tương tự như đã trình bày trên phần tiêu độc.

+Khử trùng bằng hóa chất

Có nhiều chất có tác dụng khử trùng nhưng tùy theo mục đích, đối tượng mà dùng các chất hóa học cho có hiệu quả.

Acid phenic: 5% đun sôi để khử trùng đồ vật chế vaccin. Bơm vào buồng cấy 10-15 phút khử trùng.

Crezin: dùng dung dịch 5% khử trùng chuồng trại, nhà vệ sinh.

HgCl: 0,1% ngâm dụng cụ, 0,05-0,2% khử trùng chuồng trại.

Focmon: 40% pha với thuốc tím để sát trùng buồng cấy.

Khử trùng bằng tia bức xạ

Tia tử ngoại: dùng đèn tử ngoại để phát ra tia có chiều dài bước sóng 2300-2700Å⁰, thường dùng là đèn hơi thủy ngân thạch anh có độ dài bước sóng 2537Å⁰, khử trùng phòng cấy bằng cách duy trì thời gian chiếu 30 phút-1 giờ.

Nhân tố ảnh hưởng đến chiếu tia tử ngoại khử trùng: thời gian chiếu, cường độ chiếu, tính chất của môi trường (môi trường chứa muối khoáng làm giảm, khả năng khử trùng, môi trường mở, chất béo tăng khả năng khử trùng).

Tia tử ngoại được dùng phổ biến rộng rãi trong công nghiệp thực phẩm hiện nay. Nó có khả năng diệt hoàn toàn vi khuẩn và nấm mốc.

+ Tia phóng xạ

Hiện nay người ta sử dụng tia γ , X để khử trùng, các tia phóng xạ này do máy phóng xạ phát ra. Đặc điểm của khử trùng bằng phóng xạ:

- Khử trùng khá hoàn thiện, diệt trừ vi sinh vật và sâu bệnh khác

- Bảo đảm xử lý sản phẩm đồng đều, chỉ cần xử lý một lần, thời gian bảo quản kéo dài.

- Độ xuyên sâu của tia cao, đảm bảo khử trùng ở độ dày 20-30cm cho phép xử lý sản phẩm bao bì.

- Có ảnh hưởng đến màu sắc, mùi vị của sản phẩm.

+Khử trùng bằng nhiệt độ

Như chúng ta đã biết vi sinh vật có thể sinh trưởng trong giới hạn 0-90°C. Ngoài giới hạn này hầu hết vi sinh vật không hoạt động, do nhiệt độ cao làm biến tính protein và phá hủy các men, dẫn đến phá hủy tế bào.

Khử trùng nhiệt độ khô

Đốt: sử dụng khi khử trùng que cấy, dao kéo và những vật liệu không cháy. Hoặc đốt xác chết, bông băng, có thể dùng đèn cồn hay đèn xì, xăng đốt.

Sấy khô: sử dụng lò hấp có nguồn nhiệt là điện.

Khử trùng bằng nhiệt ướt

Khử trùng Pasteur: sử dụng nhiệt độ thấp dưới 100°C để khử trùng; 63-65°C/30phút,...dùng để khử trùng sữa, hoa quả, phương pháp này không diệt được các vi khuẩn chịu nhiệt và nha bào nhưng chất lượng không bị ảnh hưởng.

Đun sôi: dùng phương pháp đun sôi trực tiếp 30 phút-1 giờ.

Hấp ngắt quãng: hấp ở nhiệt độ hơi đun sôi 100°C tránh hồng cho môi trường khi hấp ở nhiệt độ cao, như môi trường huyết thanh, lòng trắng trứng, sinh tô, đường,...

Khử trùng bằng hơi nước cao áp: nha bào thường bị diệt ở nhiệt độ ẩm là 120°C. Muốn vậy phải sử dụng các nồi hấp cao áp.

Khử trùng bằng lọc

Một số dung dịch không thể khử trùng bằng nhiệt độ do bị thay đổi đặc tính vật lý, hóa học, như môi trường huyết thanh có thể ngưng kết, men trong dung dịch có thể bị phá hủy,...Như vậy đối với những môi trường dịch thì dùng phương pháp lọc khử trùng là tốt nhất.

Hiện nay có nhiều loại ống lọc khác nhau, muốn lọc trước hết phải dùng ống có kích thước lớn để loại bỏ các hạt có kích thước lớn. Sau đó mới dùng ống lọc khử trùng. Khi lọc phải sử dụng máy áp lực chân không, thường dùng để khử trùng huyết thanh, hồng cầu, thuần khiết các giống virus, lọc ADN.

-Câu hỏi ôn tập:

1. Trình bày phương pháp khử trùng bằng tác nhân vật lý?
2. Trình bày phương pháp khử trùng bằng tác nhân hóa học?
3. Trình bày phương pháp khử trùng bằng pháp sinh học?
4. Cơ chế tác động điểm tác động của chất kháng sinh?
5. Phân loại kháng sinh căn cứ vào nguồn gốc.

-Tài liệu tham khảo:

1. Nguyễn Lâm Dũng, Nguyễn Đình Quyến, Phạm Văn Ty (2000). Nhà xuất bản giáo dục Hà Nội.
2. Vũ Thị Minh Đức (2001). Thực tập vi sinh vật học. Nhà xuất bản Đại Học Quốc Gia Hà Nội.
3. Hoàng Thủy Nguyên, Đặng Đức Trạch, Ninh Đức Dự, Nguyễn Hồng Điệt, Nguyễn Thị Kê, Nguyễn Thị Oanh (1974). Vi sinh y học tập I. Nhà xuất bản Y học Hà Nội.
4. Nguyễn Vĩnh Phước(1976). Vi sinh vật học Thú y tập III. Nhà xuất bản đại học và trung học chuyên nghiệp Hà Nội.
5. Phạm Hồng Sơn(2006), Giáo trình bệnh truyền nhiễm thú y. Nhà xuất bản nông nghiệp Hà Nội.
6. Nguyễn Khắc Tuấn(1999). Vi sinh vật học, nhà xuất bản nông nghiệp Hà Nội.

Giải thích thuật ngữ:

Natural killer cell: tế bào diệt tự nhiên, tế bào lympho có khả năng nhận diện và tiêu diệt các tế bào lạ hoặc tế bào chủ nhiễm virus theo cách không đặc hiệu.

Antigen: là protein mà khi đi vào cơ thể động vật kích thích hệ miễn dịch sinh ra đáp ứng miễn dịch.

Antibiotic : Chất kháng sinh, có tác dụng tiêu diệt vi khuẩn.

