

## CHƯƠNG III

# NGHIÊN CỨU HÌNH THÁI TẾ BÀO VI SINH VẬT

## Bài 4. QUAN SÁT HÌNH THÁI TẾ BÀO VI SINH VẬT

### A. MỤC TIÊU

Sau khi học xong chương này sinh viên cần thành thạo các kỹ năng sau:

- + Kỹ năng làm tiêu bản và quan sát hình thái một số loại VSV thông thường dưới KHV quang học.
- + Sử dụng thành thạo KHV quang học để quan sát hình thái VSV.
- + Quan sát, phân biệt và vẽ được hình thái một số loại VSV như vi khuẩn, nấm men, nấm mốc, xạ khuẩn.

### B. NỘI DUNG

#### I. LÀM TIÊU BẢN VI SINH VẬT SỐNG

##### 1.1. Làm tiêu bản vi sinh vật sống không nhuộm màu

Các tiêu bản sống thuận tiện cho việc quan sát hình dạng tự nhiên của các VSV, sự sắp xếp các tế bào, khả năng hình thành bào tử, sự chuyển động và sự sinh sản của VSV... Xem các tiêu bản VSV sống trên KHV, sử dụng vật kính ( $\times 10$ ,  $\times 20$ ,  $\times 40$ ,  $\times 60$ ), các loại tiêu bản này không giữ được lâu.

\* Chuẩn bị dịch huyền phù VSV:

- Nếu VSV nuôi trên môi trường đặc: Dùng que cấy vòng lấy một ít tế bào VSV, đưa vào thành trong của ống nghiệm chứa 5ml nước cất vô trùng, vừa mài nhẹ vào thành ống nghiệm vừa châm vào mặt nước để phân tán đều các tế bào vào nước tạo ra dịch huyền phù VSV.

Cũng có thể tạo dịch huyền phù nhanh bằng cách: Lấy một giọt nước sạch vô trùng lên lam kính rồi dùng que cấy vòng đưa một ít tế bào VSV vào giọt nước đó. Mài nhẹ que cấy trong giọt nước để phân bố đều VSV trong giọt nước.

- Nếu VSV nuôi trong môi trường dịch thể chỉ cần lắc đều dịch môi trường lỏng (có thể pha loãng bằng nước cất vô trùng nếu dịch nuôi đậm đặc).

\* Một số phương pháp làm tiêu bản VSV sống thường dùng trong thực hành như sau:

##### *c. Phương pháp làm tiêu bản “giọt ép”*

Loại tiêu bản này dùng để xem hình dạng, kích thước và sự sắp xếp các tế bào, khả năng hình thành bào tử, chuyển động của một số loại VSV.

### *Cách tiến hành:*

- + Dùng lam kính khô và sạch đặt trên cầu rửa trong chậu rửa.
- + Dùng pipet hoặc que cấy lấy mẫu lên lam làm thành một giọt dịch huyền phù VSV.
- + Đẩy lamen lên giọt dịch huyền phù VSV, tránh tạo bọt khí.
- + Thấm nhẹ lớp dịch trào ra xung quanh lamen bằng giấy thấm.
- + Quan sát tiêu bản ở hệ kính khô ( $\times 10$ ;  $\times 20$ ;  $\times 40$ ;  $\times 60$ ). Nếu cần soi ở hệ kính dầu thì nhỏ lên lá kính một giọt dầu set. Khi cần quan sát lâu có thể dùng vazolin bôi xung quanh bờ kính để giọt dịch không bị khô nhanh.

### ***b. Phương pháp làm tiêu bản “giọt treo”***

Loại tiêu bản này dùng để theo dõi sự sinh sản, sự sắp xếp tế bào, sự nảy mầm, sự di động... của VSV. Khi quan sát VSV bằng tiêu bản giọt treo cần cường độ ánh sáng yếu hơn bình thường (chú ý đóng bớt màn chắn sáng trên tụ quang kính).

### *Cách tiến hành:*

- + Dùng que cấy hoặc pipet nhỏ một giọt dịch huyền phù VSV (khoảng 10--20 $\mu\text{m}$ ) lên mặt lamen sạch vô trùng.
- + Lật ngược lá kính sao cho giọt dịch huyền phù VSV treo ở mặt dưới lamen.
- + Úp lamen vào lam đặc biệt, có lỗ lõm ở giữa, quanh lỗ đã được bôi Vazolin. Lúc này ta được giọt dịch huyền phù treo lơ lửng trong khoang kính do lamen và phiến lõm lam kính tạo ra.

\* Chú ý: Nếu cần theo dõi các VSV trong giọt treo nhiều ngày thì pha dịch huyền phù VSV bằng môi trường dinh dưỡng vô trùng. Tất cả các thao tác làm tiêu bản phải được tiến hành trong điều kiện vô trùng gần ngọn đèn cồn như đã hướng dẫn.

### ***c. Phương pháp làm tiêu bản “ép lam”***

Tiêu bản này thường được dùng để nghiên cứu sự sắp xếp của tế bào một cách tự nhiên trong khuẩn lạc như hình dạng cuống sinh bào tử, chuỗi bào tử của xạ khuẩn hay nấm mốc. Có thể ép lam theo một số cách thông dụng sau:

#### *\* Phương pháp Henrici (hình 4.1):*

- + Nhỏ lên lam vô trùng 2ml môi trường thạch vô trùng, để nguội.
- + Dùng dao vô trùng cắt bỏ một nửa miếng môi trường rồi dùng que cấy vòng cấy lên nấm mốc (hoặc xạ khuẩn) lên mặt vừa cắt của môi trường.
- + Dùng kẹp vô trùng úp lamen vô trùng lên tiêu bản.
- + Đặt tiêu bản lên que thủy tinh bé cong trong đĩa petri vô trùng ẩm.

Cách chuẩn bị đĩa petri vô trùng âm: Miếng giấy lọc được thấm nước và đặt ở đáy hộp, trên miếng giấy đặt một thanh thủy tinh bẻ cong, thanh trùng ở nồi áp suất ở 121°C trong 30 phút.

+ Gói đĩa Petri vào túi nilon vô trùng, để vào tủ âm ở nhiệt độ và thời gian thích hợp.

Bào tử của nấm hoặc xạ khuẩn khi sinh trưởng sẽ lan sang mép lam. Khi quan sát lấy tiêu bản ra khỏi đĩa Petri, đặt lên bàn kính và quan sát dưới hệ kính khô.

\* *Phương pháp xẻ rãnh thạch:*

+ Cây bào tử của VSV lên môi trường dinh dưỡng đặc trong đĩa petri bằng phương pháp cấy zíc zắc, hoặc trải dày bằng que trang.

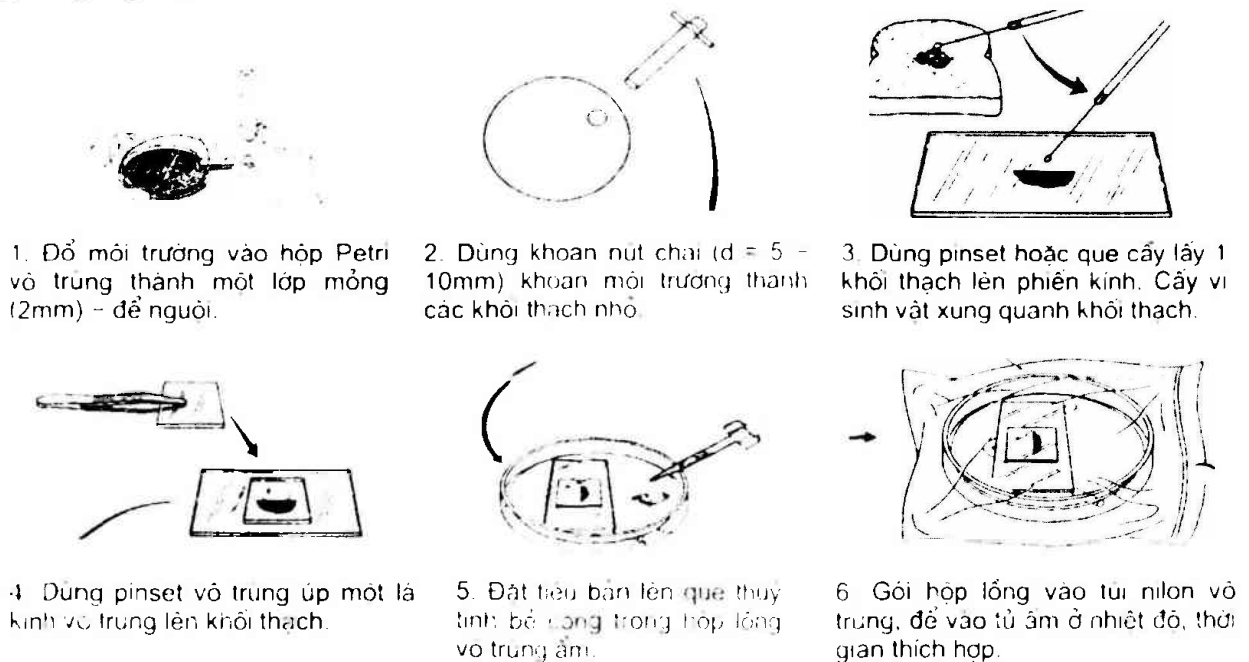
+ Dùng dao vô trùng xẻ một rãnh thạch trong đĩa Petri.

+ Đặt lá kính vô trùng lên bờ của rãnh thạch vừa xẻ.

+ Đậy đĩa Petri và để vào tủ âm ở nhiệt độ và thời gian thích hợp.

Có thể cải tiến phương pháp trên như sau: Sau khi cấy bào tử VSV trên bề mặt môi trường, cài chéo góc 45° một lá kính vô trùng vào mặt thạch. Đậy đĩa Petri và để vào tủ âm ở nhiệt độ và thời gian thích hợp.

Hình dạng tự nhiên của nấm mốc hoặc xạ khuẩn cũng có thể quan sát trực tiếp khi nuôi cấy trên lớp môi trường đặc mỏng và không màu ở đĩa Petri hay ống nghiệm.



Hình 4 1. Phương pháp làm tiêu bản ép theo Henrici

1. Môi trường Sabouraud đặc nóng chảy.
2. Lấy môi trường lên lam.
3. Cắt bỏ một nửa môi trường bằng dao vô trùng.
4. Cây nấm mốc bánh mì lên mặt vừa cắt.
5. Đẩy lam lên môi trường: Để hộp Petri vào nơi có độ ẩm cao.
6. Giữ đĩa Petri trong túi nilông.

## II. LÀM TIÊU BẢN VI SINH VẬT NHUỘM MÀU

Để quan sát hình thái của các tế bào VSV được rõ hơn người ta thường dùng các phương pháp nhuộm đơn hoặc nhuộm kép tế bào bằng thuốc nhuộm. Hầu hết các thuốc nhuộm là các loại muối, trong đó có một ion mang màu.

Nếu ion mang màu là ion dương của muối thì thuốc nhuộm được gọi là thuốc nhuộm kiềm. Ngược lại, ion màu là ion âm thì tên gọi là thuốc nhuộm axit. Các thuốc nhuộm kiềm thường dùng là xanh metylen, tím gentian, tím kết tinh. Chúng thường liên kết với các thành phần mang điện tích âm của tế bào. Trong môi trường trung tính, điện tích của tế bào vi khuẩn thường âm cho nên nó bắt màu mạnh với các thuốc nhuộm bazơ. Bởi vậy, trong thực hành VSV thường sử dụng các thuốc nhuộm bazơ.

Các thuốc nhuộm axit thường dùng là eozin, ertrozin, nigrozin, fuchsin ixit... thường liên kết với các thành phần mang điện tích dương của tế bào.

*Nhuộm đơn là nhuộm tế bào bằng một loại thuốc nhuộm. Toàn bộ tế bào bị bắt màu đậm của thuốc nhuộm đó. Bởi vậy, cách nhuộm này thường dùng để quan sát hình dạng tế bào vi sinh vật.*

*Nhuộm kép là nhuộm tế bào bằng hai hay nhiều loại thuốc nhuộm. Phương pháp nhuộm kép thường dùng trong nghiên cứu cấu tạo tế bào vi sinh vật.*

### 2.1. Nhuộm màu tế bào sống

Thường nhuộm tế bào bằng các dung dịch loãng như xanh metylen hay fuchsin (1 : 100) hoặc đỏ côngô 3%, hay đỏ trung tính 0,001%.

*Cách nhuộm:*

Nhỏ 1 giọt thuốc nhuộm lên lam → dùng que cấy đưa vào đó một ít VSV → trộn đều → đặt lam → giữ khoảng 1 – 2 phút → quan sát.

Muốn nhuộm màu nấm mốc trước hết phải nhỏ 1 – 2 giọt Lactôphenol lên tiêu bản để thấm ướt sợi nấm → nhỏ tiếp 1 – 2 giọt thuốc nhuộm → đặt lá kính → giữ 1 – 2 phút → quan sát.

### 2.2. Làm tiêu bản cố định nhuộm màu

Thực chất đây là phương pháp nhuộm tế bào sau khi đã giết chết chúng. Ưu điểm của phương pháp này là VSV được cố định tại vùng nhất định trên phiến kính nên ít bị rửa trôi khi rửa hoặc tẩy màu. Hơn nữa, tế bào đã chết bắt màu nhanh và rõ, thuận tiện khi soi ở hệ kính dầu và có thể giữ được thời gian lâu hơn tiêu bản nhuộm sống. Quy trình nhuộm gồm các bước sau:

– *Bước 1:* Làm vết bôi vi sinh vật.

+ Chuẩn bị giọt huyền phù VSV trên lam như đã hướng dẫn ở trên.

+ Dùng que cấy hoặc lá kính dàn mỏng giọt dịch huyền phù thành một vùng nhất định trên lam.

- *Bước 2:* Làm khô vết bôi: hong khô vết bôi trong không khí. Để vết bôi có thể khô nhanh trong không khí, khi làm vết bôi chỉ nên lấy một giọt nhỏ dịch huyền phù (khoảng 30 – 50  $\mu$ l).

- *Bước 3:* Cố định vết bôi: Thường cố định bằng cách hơi nhẹ trên ngọn đèn cồn: đưa vết bôi nhanh qua ngọn đèn cồn 2 – 3 lần. Tránh hơi quá nóng vì sẽ làm biến dạng hình thái và cấu trúc của tế bào VSV (hình 4.2).

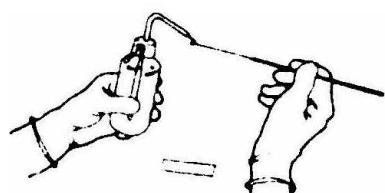
\* *Chú ý:* Tùy vào tính chất của thí nghiệm có thể cố định vết bôi bằng một số các dung dịch hoá chất như trong bảng 1 ở cuối bài.

- *Bước 4:* Nhuộm tiêu bản: Dùng pipet nhỏ lên vết bôi một vài giọt thuốc nhuộm, giữ trong khoảng 1 – 2 phút.

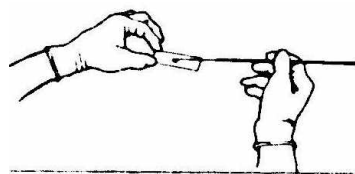
- *Bước 5:* Rửa tiêu bản: Dùng bình rửa có vòi hoặc pipet, dội nước từ một đầu phiến kính cho trôi qua tiêu bản đến khi nước rửa không còn màu thuốc nhuộm là được.

- *Bước 6:* Thâm khô tiêu bản: Thâm khô tiêu bản bằng giấy thấm. Soi tiêu bản ở hệ kính dầu.

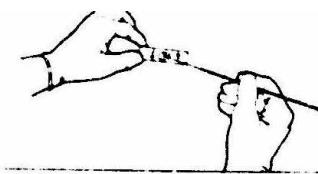
Nếu tiêu bản nhuộm đúng thì khi quan sát chỉ thấy các tế bào VSV bắt màu.



1. Lấy 1 giọt nước sạch (50 – 100  $\mu$ l) đặt lên phiến kính



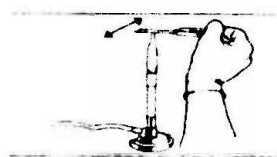
2. Chuẩn bị giọt huyền phù vi sinh vật trên phiến kính như đã hướng dẫn ở trên



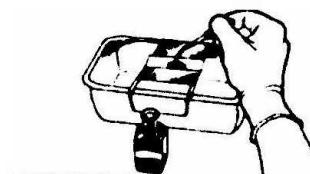
3. Dùng que cấy hoặc là kính đàn mỏng giọt dịch huyền phù thành một vùng nhất định trên phiến kính



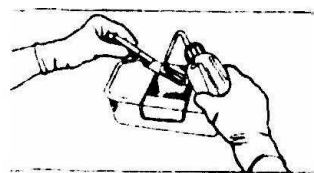
4. hong khô vết bôi trong không khí.



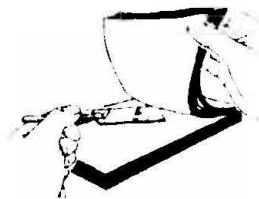
5. Cố định vết bôi bằng cách hơi nhẹ trên ngọn đèn cồn, đưa vết bôi nhanh qua ngọn đèn cồn 2 - 3 lần (Hoặc bằng một số các dung dịch hoá chất như trong phân phụ lục.)



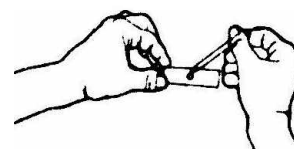
6. Dùng pipet nhỏ lên vết bôi một vài giọt thuốc nhuộm, giữ trong khoảng 1 – 2 phút



7. Dùng bình rửa có vòi hoặc pipet dội nước từ một đầu phiến kính cho trôi qua tiêu bản đến khi nước rửa không còn màu thuốc nhuộm



8. Thâm khô tiêu bản



9. Nhỏ 1 giọt dầu set lên tiêu bản, soi kính dầu

Hình 4.2. Các bước cố định vết bôi

### III. HƯỚNG DẪN THỰC HIỆN

#### 3.1. Quan sát hình dạng của nhóm vi khuẩn

Để dễ dàng quan sát được hình dạng vi khuẩn nên dùng phương pháp nhuộm tiêu bản cố định. Ở đây nêu ra nhiều loại VSV, tùy theo điều kiện ở địa phương có thể chọn đại diện của từng nhóm.

##### 3.1.1. Vật liệu, dụng cụ hóa chất

\* Các loài vi khuẩn:

– Quan sát cầu khuẩn: *Streptococcus lactis*, *Staphylococcus*.

– Quan sát các trực khuẩn: *Acetobacter*, *B. subtilis*, *E. coli*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas*, *B. subtilis*,...

– Quan sát các xoắn khuẩn: *Spirillum* hoặc *Vibrio*...

– Quan sát hình dạng các loại VSV trong cao răng: Khu hệ vi khuẩn trong cao răng rất đa dạng và phong phú, dễ dàng quan sát bằng nhuộm tiêu bản cố định.

\* Dụng cụ:

– Que cấy vòng, lam kính, lamén.

– Bình nước sạch.

– Bình cồn 70°C.

– Chậu rửa.

– Các loại thuốc nhuộm: đỏ fueshin, xanh metylen, tím gentian.

##### 3.1.2. Phương pháp tiến hành

Để dễ dàng quan sát được hình dạng vi khuẩn nên dùng phương pháp nhuộm tiêu bản cố định như trình bày ở phần 1.

Quan sát hình dạng các loại VSV trong cao răng:

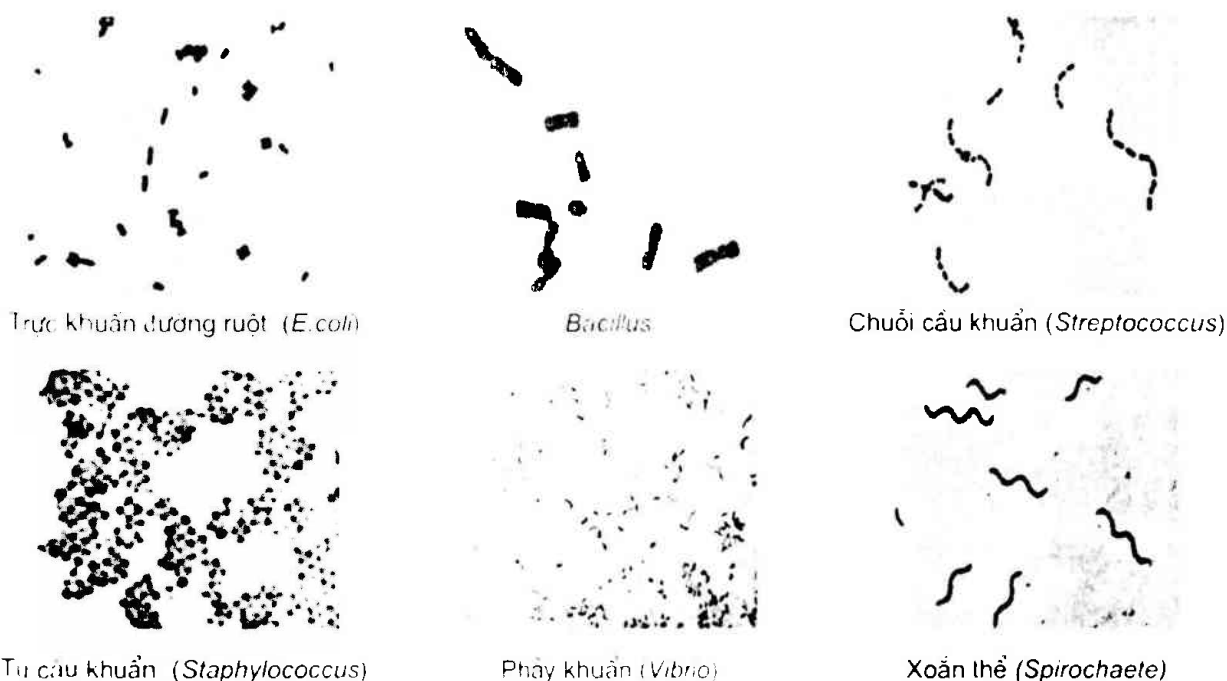
\* Cách làm:

– Lấy một giọt nước cho lên phiến kính, dùng tăm vô trùng lấy một ít cao răng hoà vào giọt nước

– Làm tiêu bản theo phương pháp nhuộm tiêu bản cố định.

– Quan sát ở hệ kính dầu.

Hình dạng của một số loài vi khuẩn thông thường được mô tả ở hình 4.3.



Hình 4.3. Hình dạng một số loại vi khuẩn thường gặp (nguồn từ internet)

### 3.2. Quan sát hình thái nấm men *Saccharomyces*

Hình thái tế bào và kiểu sinh sản nảy chồi của nấm men rất dễ quan sát bằng tất cả các phương pháp trên, nhất là phương pháp nhuộm tiêu bản cố định.



Hình 4.4. Hình dạng tế bào nấm men

### 3.3. Quan sát hình thái nấm mốc và xạ khuẩn

Nên dùng phương pháp ép lam để quan sát hệ sợi dinh dưỡng và cơ quan sinh bào tử vô tính của các VSV này.

#### 3.3.1. Quan sát hình thái nấm mốc *Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor* hoặc *Rhizopus*

Yêu cầu thấy rõ hệ sợi của chúng (sự phân nhánh, sợi có vách ngăn hay không có vách, nguyên sinh chất có chuyển động hay không), cuống sinh bào tử (tế bào gốc nơi xuất phát cuống, hình dạng, kích thước cuống sinh bào tử, có vách ngăn

hay không có, có màu sắc hay trong suốt...), hình dạng của tế bào sinh bào tử (hình dạng, xuất phát trực tiếp từ cuống sinh bào tử hay từ bong dính giá hình dạng của bong dính giá, tế bào sinh bào tử mọc trực tiếp trên bong dính giá hay qua một lớp cuống (melatue), hình dạng bào tử, bề mặt bào tử...).

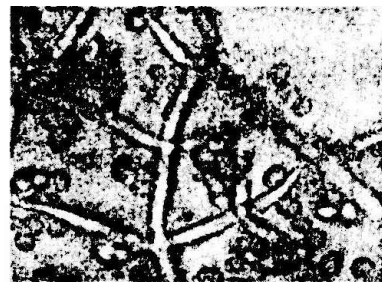
Để quan sát rõ hơn hình thái cuống sinh bào tử của *Aspergillus* và *Penicillium* có thể làm như sau:

+ Lấy lá kính đã chuẩn bị bằng phương pháp ép lam (hoặc dùng que cấy vòng lấy một khóm nấm mốc có đủ hệ sợi cơ chất, hệ sợi khí sinh và cơ quan sinh bào tử dính lên phiến kính).

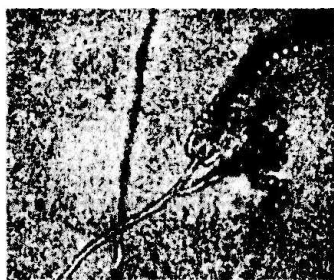
+ Nhỏ một vài giọt Lactôphenôl lên nấm mốc → dùng que cấy đập nhẹ, kĩ cho bào tử của nấm mốc tách ra khỏi cuống sinh bào tử của chúng → đẩy lá kính → soi ở hệ kính khô (×40).



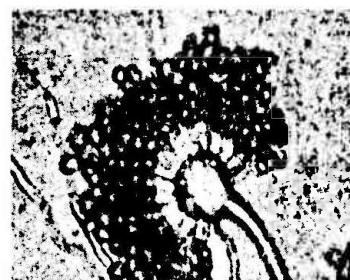
Cơ quan sinh bào tử kín ở *Mucor*



Cơ quan sinh bào tử trần ở *Trichoderma*



Cơ quan sinh bào tử trần ở *Penicillium* (× 400)



Cơ quan sinh bào tử trần ở *Aspergillus* (× 400)

Hình 4.5. Hình dạng cơ quan sinh bào tử ở nấm mốc

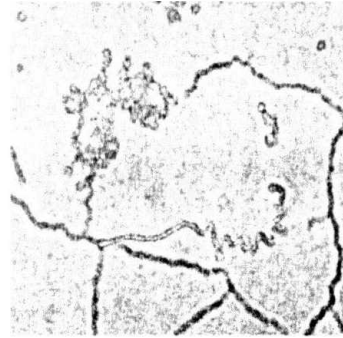
### 3.3.2. Quan sát hình dạng xạ khuẩn

Yêu cầu: Quan sát phân biệt được các sợi dinh dưỡng và các dạng cuống sinh bào tử của xạ khuẩn (cuống sinh bào tử thẳng, lượn sóng hay xoắn, đơn hay chùm...), bào tử xạ khuẩn (hình cầu, oval, hay trụ...) (hình 4.6).





Hình vẽ mô tả các dạng cuống sinh bào tử của xạ khuẩn



Dạng cuống sinh bào tử xoắn



Dạng cuống sinh bào tử thẳng *Streptomyces*



Bào tử dưới kính hiển vi điện tử

Hình 4.6. Hình dạng một số xạ khuẩn

*Lưu ý:* Cũng có thể cho sinh viên quan sát các VSV gây bệnh trên thực vật hoặc quan sát hình dạng các tế bào nguyên sinh động vật trong nước cỏ khô bằng một trong các phương pháp trên.

## Bài 5. NGHIÊN CỨU CẤU TẠO TẾ BÀO VI SINH VẬT

### A. MỤC TIÊU

Sau khi học xong bài này sinh viên cần thành thạo các kỹ năng:

– Sử dụng các phương pháp, thiết bị hỗ trợ để quan sát một số cấu tạo tế bào VSV. Nắm được nguyên tắc của các phương pháp nghiên cứu cấu tạo tế bào. Có thể sử dụng một trong số các phương pháp nêu trong bài để quan sát các cấu trúc mong muốn.

– Nghiên cứu một số cấu tạo cơ bản, đặc biệt là sử dụng các phương pháp nhuộm kép để quan sát các cấu trúc đặc thù của VSV. Làm được tiêu bản để quan sát được một số cấu trúc của tế bào VSV (ở đây chỉ đề cập đến một số cấu trúc để quan sát với điều kiện thí nghiệm). Thành thạo kỹ năng nhuộm đơn, nhuộm kép tế bào VSV. Phân biệt tế bào Gram âm ( $G^-$ ) và Gram dương ( $G^+$ ).

### B. NỘI DUNG

#### I. PHƯƠNG PHÁP NHUỘM GRAM

##### 1.1. Nguyên lý của các bước nhuộm Gram

Nhuộm Gram là phương pháp nhuộm kép để phân biệt hai nhóm vi khuẩn  $G^+$  và  $G^-$  do Christian Gram (Đan Mạch) đề xướng năm 1884. Khi cùng nhuộm và tẩy màu tế bào theo một phương pháp: Vi khuẩn  $G^+$  vẫn giữ được màu của thuốc nhuộm tím, còn vi khuẩn  $G^-$  bị mất màu. Cơ sở khoa học của các bước nhuộm Gram như sau:

– Bước nhuộm màu cơ bản bằng thuốc nhuộm tím (gential violet hoặc Cristal violet). Tất cả các vi khuẩn đều bắt màu tím.

– Nhuộm tăng cường: cũng có màu bằng dung dịch Lugol ( $KI + I_2$ ). Thuốc nhuộm này kết hợp với thuốc nhuộm Gential violet thành phức hợp bền màu hơn ở các vi khuẩn  $G^+$ .

– Tẩy màu: dùng chất tẩy màu (thường là cồn 90%) tổ hợp Gential violet và dung dịch Lugol. Ở thành tế bào  $G^-$  thì liên kết giữa tổ hợp thuốc nhuộm này lỏng lẻo hơn ở vi khuẩn  $G^+$  nên dễ bị rửa trôi.

– Nhuộm phân biệt bằng thuốc nhuộm khác (thường dùng là Safranin, cũng có thể thay bằng Fuchsin bazơ loãng) nhằm nhuộm các tế bào đã bị tẩy màu thành một màu tương phản với màu tím để dễ phân biệt.

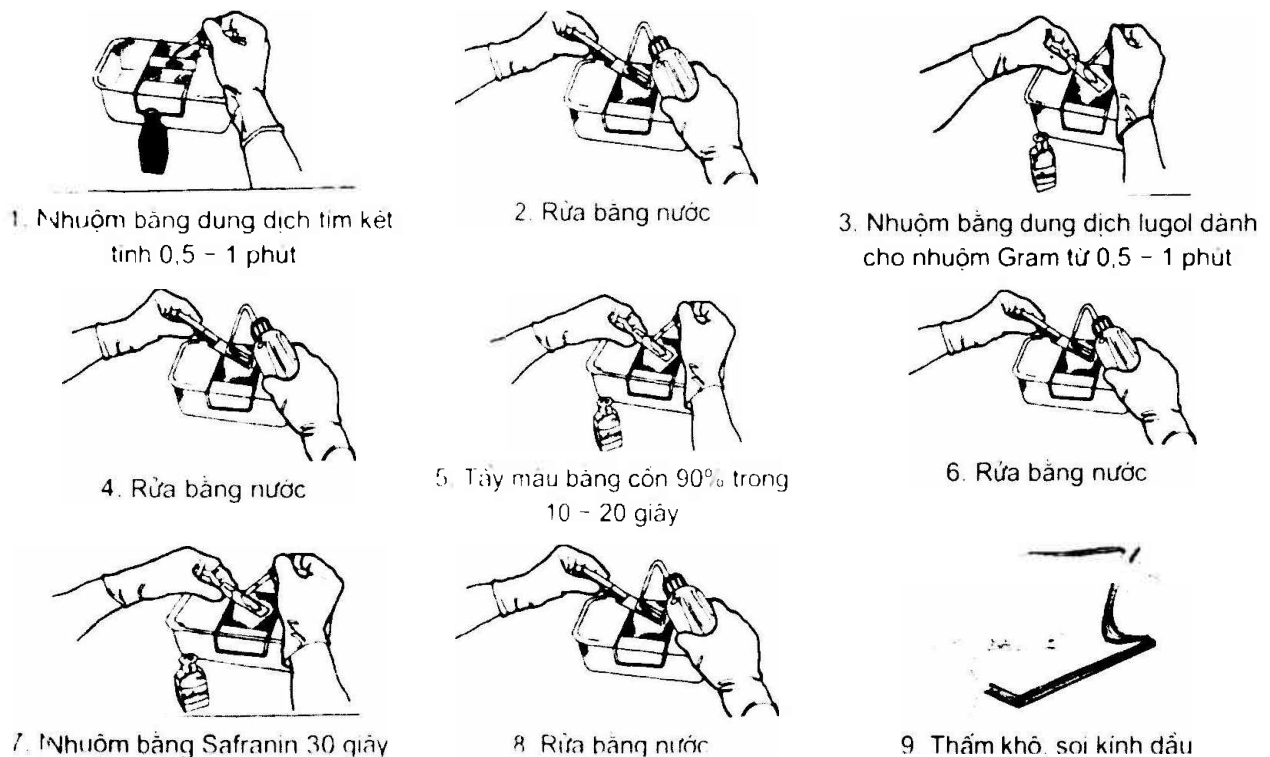
## 1.2. Các vật liệu cần thiết

\* Chuẩn bị các vi khuẩn *B. subtilis* ( $G^+$ ), *E. coli* ( $G^-$ ) và ống VSV nghiên cứu (chưa rõ  $G^+$  hay  $G^-$ ) có độ tuổi 18 – 24 giờ nuôi cấy ở môi trường dịch thể.

\* Thuốc nhuộm:

- + Dung dịch tím ket tinh.
- + Dung dịch lugol dành cho nhuộm Gram.
- + Dung dịch cồn 90%.
- + Dung dịch Safranin.

## 1.3. Cách tiến hành nhuộm (xem hình 5.1.)



Hình 5.1. Các bước nhuộm Gram

– Làm hai vết bôi trên cùng một lam: Vết bên trái là hỗn hợp *B. subtilis* ( $G^+$ ) và *E. Coli* ( $G^-$ ) vết bên phải là vi khuẩn chưa rõ  $G^-$  hay  $G^+$ .

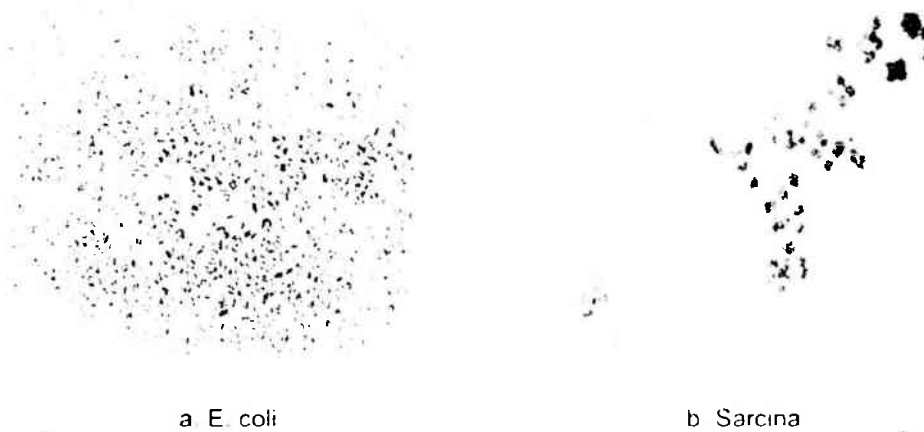
– Cố định các vết bôi trên ngọn lửa đèn cồn.

– Nhuộm bằng dung dịch tím gentian trong 1 phút và dung dịch lugol dành cho nhuộm Gram từ 0,5 – 1 phút → rửa nước.

– Tẩy màu bằng cồn 95% trong 10 – 20 giây → rửa sạch cồn bằng nước.

– Nhuộm bằng Safranin hoặc fuesin.

Khi nhuộm đúng, *B. subtilis* có màu tím, *E. coli* có màu hồng đỏ, dựa vào đó để định loại VSV đang nghiên cứu là G<sup>-</sup> hay G<sup>+</sup> dựa vào sự bắt màu của chúng (hình 5.2).



Hình 5. 2. Vi khuẩn nhuộm theo phương pháp Gram (Nguồn: internet )

## II. NHUỘM MÀNG NHÀY

Đặc điểm của màng nhày là không bắt màu với bất kì thuốc nhuộm nào, đó chính là cơ sở để xây dựng các phương pháp quan sát màng nhày. Muốn quan sát màng nhày nên sử dụng VSV có lớp màng dày (*Macrocapsule*) với kích thước lớn hơn  $0,2\mu$  như nấm men, *Azotobacter* hay *Klebsiella pneumoniae*.

### 2.1. Phương pháp làm tiêu bản âm

+ Nhỏ một giọt huyền phù VSV lên lam → thêm vào đó một giọt mực tàu (có thể thay mực tàu bằng các loại thuốc nhuộm bazơ bão hòa rượu etylic).

+ Đậy lamen → thấm sạch dịch thuốc nhuộm thừa quanh lamen.

+ Giữ 1 – 2 phút → nhỏ một giọt dầu lên tiêu bản → quan sát ở hệ kính dầu.

*Kết quả:* Màng nhày không màu, trong suốt, tế bào màu đen, nền tiêu bản màu đen (hình 5.3).

### 2.2. Nhuộm kép theo phương pháp Maneval

– Dùng que cấy đưa 5 – 6 vòng thuốc nhuộm 3% Congo đỏ lên phiến kính.

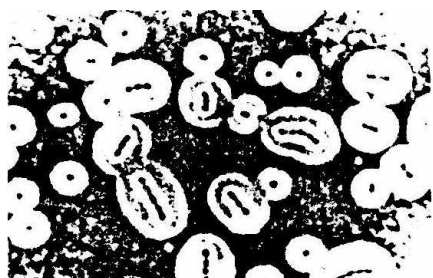
– Giỏ một giọt dịch huyền phù VSV vào thuốc nhuộm → trộn đều.

– Dùng que cấy dàn mỏng giọt hỗn dịch này trên lam.

– Để khô tự nhiên trong phòng. Không được cố định tiêu bản trên ngọn lửa đèn cồn. Có thể cố định tiêu bản bằng hơi phoocmon 40%.

- Nhuộm bằng thuốc nhuộm Maneval trong 1 – 4 phút → rửa bằng nước → thấm khô tiêu bản → soi dưới hệ kính dầu.

*Kết quả:* Màng nhày không màu, trong suốt, tế bào màu nâu đỏ, nền tiêu bản màu xanh hoặc xanh đen (hình 5.3).



1. *Azotobacter agile*



2. *Klebsiella pneumonia*



3. *Azotobacter*



4. *B. subtilis*

Hình 5.3. Màng nhày của một số VSV

Màng nhày không màu, trong suốt và tế bào màu đen (mẫu 1 làm tiêu bản bằng mực tàu, các mẫu khác dùng thuốc nhuộm)

### III. NHUỘM NỘI BÀO TỬ CỦA VI KHUẨN

Nội bào tử vi khuẩn là một hình thức tiềm sinh của tế bào. Thường gặp ở các VK họ Bacillaceae (*Bacillus*, *Clostridium*) và một vài loại VK khác.

Bào tử VK có đặc điểm là khó bắt màu hơn tế bào dinh dưỡng, song khi bắt màu rồi lại rất khó bị tẩy màu, trong khi đó tế bào dinh dưỡng sau khi bắt màu rồi lại bị tẩy màu nhanh chóng. Đây chính là cơ sở của các phương pháp nhuộm nội bào tử.

\* Để dễ dàng quan sát được bào tử nên cấy các VK trên môi trường dinh dưỡng có chứa 0,005%  $MnCl_2$  (5mg/l).

#### 3.1. Phát hiện bào tử trong tế bào sống

Bào tử có độ chiết quang cao vì vậy khi nhìn dưới KHV thì bào tử có hình cầu hay hình trái xoan, sáng hơn các phần xung quanh.

### 3.2. Phát hiện bào tử bằng phương pháp nhuộm đơn tế bào

Khi nhuộm tế bào bằng các phương pháp nhuộm đơn, tế bào chết sẽ bắt màu còn bào tử không bắt màu. Dưới kính hiển vi có thể nhận thấy bào tử không bắt màu, trong suốt, nằm trong phần nguyên sinh chất bắt màu.

Cả hai phương pháp trên có ưu điểm là nhanh, song cần phải cẩn thận khi quan sát vì nhiều khi có sự nhầm lẫn giữa bào tử với các thành phần không bắt màu khi nhuộm đơn tế bào (như giọt mỡ, các thể bèn...).

### 3.3. Quan sát bào tử bằng phương pháp nhuộm kép

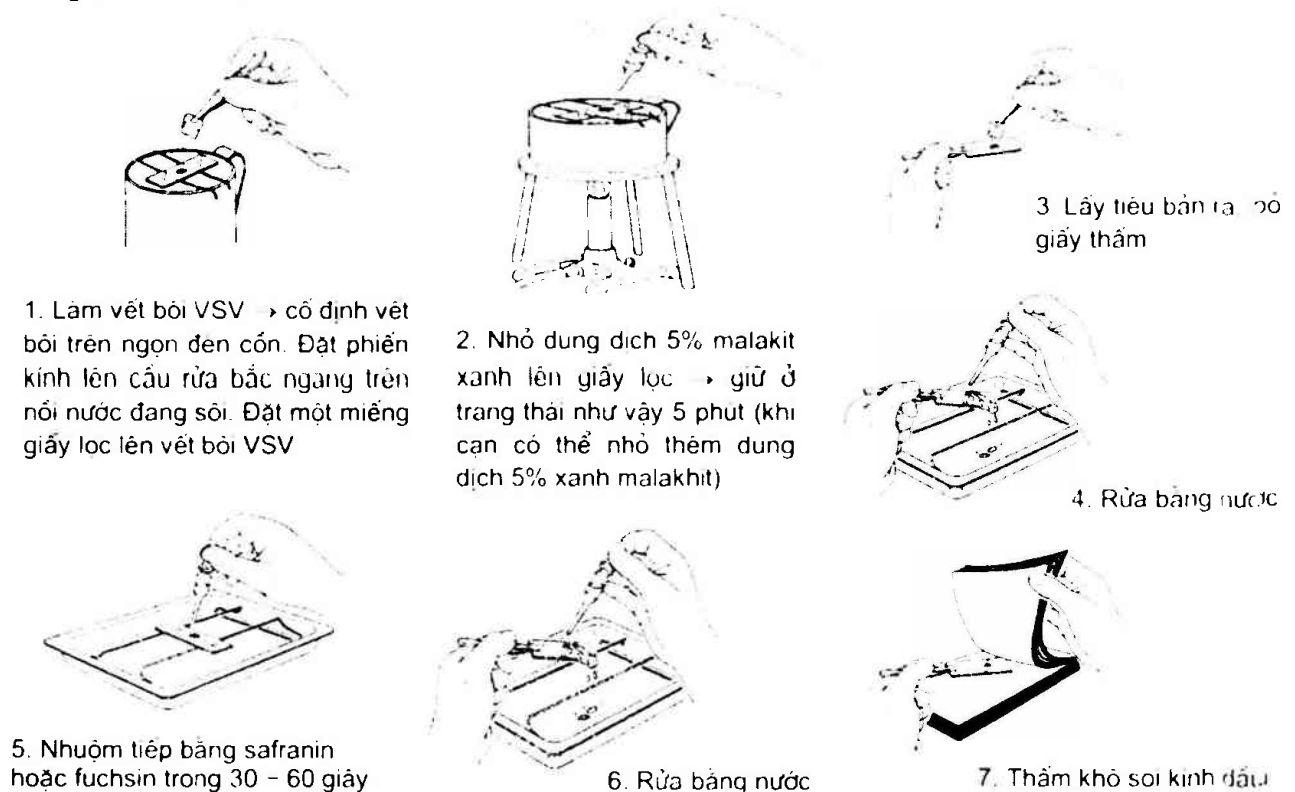
#### Phương pháp Schaeffer và Fulton

Phương pháp nhuộm bào tử theo Schaeffer và Fulton (hình 5.4)

+ Làm vết bôi VK trên phiến kính → Cố định vết bôi trên ngọn đèn.

+ Đặt phiến kính lên cầu rửa bắc ngang trên nồi nước đang sôi. Đặt một miếng giấy lọc lên vết bôi VK → nhỏ dung dịch 5% malakit xanh (có thể thay malakit bằng xanh metylen) lên giấy lọc → giữ ở trạng thái như vậy 5 phút (khi cần có thể nhỏ thêm dung dịch 5% xanh malakit) → rửa bằng nước → nhuộm tiếp bằng safranin hoặc fuesin trong 30 – 60 giây → rửa bằng nước → thấm khô → soi kính dầu.

Tiêu bản nhuộm đúng thì bào tử sẽ bắt màu xanh lá cây, tế bào chết bắt màu hồng (hình 5.5).



Hình 5.4. Phương pháp nhuộm bào tử theo Schaeffer và Fulton



a. *Clostridium*

b. *Bacillus*

c. *Clostridium* (ảnh Trần Thị Thủy)

(a. Nhuộm bào tử theo phương pháp Schaeffer – Fulton)

(b và c: Nhuộm bào tử bằng phương pháp nhuộm đơn)

Hình 5.5. Các dạng bào tử của vi khuẩn bằng phương pháp Schaeffer và Fulton

## IV. NHUỘM CÁC HẠT ẮN NHẬP

### 4.1. Nhuộm hạt volutin (*Metachromatin*)

Cơ sở của các phương pháp nhuộm hạt volutin dựa trên đặc điểm của hạt này là bắt màu khác với màu của tế bào khi nhuộm với thuốc nhuộm kiềm.

Ví dụ: nếu nhuộm với xanh metylen thì tế bào chất bắt màu xanh còn hạt volutin nhuộm thành màu đỏ (bởi vậy có tên là hạt dị nhiễm sắc). Để quan sát hạt volutin có thể sử dụng *Azotobacter*, *Bacillus* hoặc nấm men

#### a. Nhuộm tế bào sống (phương pháp Löffler)

Nhỏ lên lam giọt huyền phù VSV → thêm vài giọt xanh metylen Löffler → Đậy lamen → thấm khô dịch thừa xung quanh lamen → nhỏ một giọt dầu set lên lamen → quan sát ở hệ kính dầu. Tiêu bản nhuộm đúng thì hạt volutin bắt màu đỏ nằm trong tế bào chất màu xanh.

#### b. Nhuộm tiêu bản cố định

- Làm vết bởi VSV → cố định trên ngọn đèn cồn → nhuộm bằng dung dịch xanh Löffler trong 3 phút → rửa tiêu bản bằng nước → thấm khô → soi dưới hệ kính dầu.

- Tiêu bản sẽ nhìn rõ hơn nếu tẩy bột màu của tế bào bằng cồn 33% hoặc 1% HCl. Tế bào bắt màu xanh nhạt, hạt volutin màu đỏ.

### 4.2. Nhuộm hạt glicôgen hoặc hạt granuloza

Hạt glicôgen có bản chất gần giống với amylopectin nhưng phân nhánh mạnh hơn, còn hạt granuloza có bản chất gần giống tinh bột. Khi nhuộm với iốt, glicôgen bắt màu nâu tối, hạt granuloza màu xanh lam tối. Để quan sát hạt glicôgen hoặc hạt granuloza thường dùng *Saccharomyces* và *Clostridium*.

Nhuộm hạt glicôgen: Làm vết bôi → cố định trên ngọn lửa đèn cồn → nhỏ 1 → 2 giọt lugol II giữ trong 2 – 3 phút → rửa bằng nước → thấm khô → soi kính dầu.  
Kết quả: Hạt granulôza bắt màu xanh lam tối, tế bào màu vàng nhạt.

### 4.3. Nhuộm giọt mỡ

Khi nuôi cấy VSV trên môi trường giàu glucit hoặc khi tế bào đã hoá già, trong tế bào thường có các giọt mỡ. Giọt mỡ có khả năng bắt màu mạnh với các thuốc nhuộm sudan III hoặc sudan đen trong khi các thành phần khác của tế bào hầu như không bắt màu với các thuốc nhuộm này. Để quan sát giọt mỡ có thể sử dụng nấm men, *Clostridium*, *Mycobacterium*...

#### a. Phương pháp nhuộm tế bào sống

Đưa một giọt dịch huyền phù VSV lên lam → thêm một giọt phocmalin 40% → giữ trong 5 phút → thêm một giọt xanh metylen (1 : 30) → giữ 10 phút → thêm 1 giọt sudan III → giữ 5 phút → Đậy lamen → Quan sát ở hệ kính dầu.

Kết quả: Giọt mỡ bắt màu vàng da cam của sudan III, tế bào chất bắt màu xanh của xanh metylen.

#### b. Nhuộm tiêu bản cố định

Đưa lên lam giọt dịch huyền phù VSV 16 – 18 giờ nuôi cấy → Cố định trên ngọn lửa đèn cồn (hơ nhanh 2 lần) → nhỏ một giọt sudan III (hoặc sudan đen) → giữ 15 phút → rửa sạch bằng nước → nhuộm Fuesin 1 phút → rửa bằng nước → thấm khô → soi kính dầu.

Kết quả: Tế bào bắt màu hồng, giọt mỡ bắt màu vàng da cam của sudan III (hoặc màu đen của sudan) (hình 5.6).



Hình 5.6. Tế bào nấm men với các thể ẩn nhập



**c. Nhuộm phân biệt tế bào sống chết (phương pháp Baclight)**

Phương pháp nhuộm này sử dụng thuốc nhuộm greenorenscent và propidiumiodide.

Kết quả: Tế bào sống bắt màu lục, tế bào chết bắt màu đỏ. Có thể sử dụng các chủng vi khuẩn, nấm men như: *Bifidobacterium*, *Saccharomyces*.

**V. HƯỚNG DẪN KIỂM TRA, ĐÁNH GIÁ KẾT QUẢ THÍ NGHIỆM**

Yêu cầu sinh viên trình bày kết quả các thí nghiệm quan sát được vào bảng, ví dụ như bảng sau:

| Thí nghiệm | phương pháp sử dụng | Kết quả quan sát | Mô tả bằng hình vẽ | Nhận xét |
|------------|---------------------|------------------|--------------------|----------|
|            |                     |                  |                    |          |

**Trả lời các câu hỏi:**

1. Dựa vào nguyên lí của các phương pháp nhuộm và kết quả thực nghiệm, điền vào chỗ trống những từ thích hợp đồng thời giải thích các kết quả đó:

– Trong thí nghiệm nhuộm Gram:

Khi nhuộm Gram đúng, *B. subtilis* có màu....., *E. coli* có màu ..... trong vết bôi thứ nhất. Quan sát màu tế bào ở vết bôi thứ 2, ta có thể định loại được VSV đang nghiên cứu là G<sup>-</sup> hay G<sup>+</sup>.

– Trong thí nghiệm nhuộm màng nhày bằng tiêu bản âm:

**Kết quả:** Màng nhày..., tế bào màu ..... nền tiêu bản màu đen.

– Trong thí nghiệm quan sát bào tử bằng phương pháp nhuộm đơn bằng Fuesin:

**Kết quả:** nhận thấy bào tử ..... nằm trong phân nguyên sinh chất bắt màu.....

– Nhuộm bào tử bằng phương pháp Schaeffer và Fulton.

Tiêu bản nhuộm đúng thì bào tử sẽ bắt màu ....., tế bào chất bắt màu.....

2. Hãy gạch chân tên các VK có khả năng sinh bào tử trong số các VK sau đây:

*Clostridium butyricum*, *Planosarcina ureae*, *Bacillus mesentericus*, *Pseudomonas denitrificans*, *Nitrosomonas nipae*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Escherichia coli*, *Vibrio cholera*, *Desulfotomacillum nigrificans*.

## VI. PHA CHẾ THUỐC NHUỘM, HOÁ CHẤT

|   |  |
|---|--|
| <p><b>1. Dung dịch lugol nhuộm Gram</b></p> <p>Iốt: 1g<br/>           KI: 2g<br/>           Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>: 3g<br/>           Nước cất: 300ml</p>   | <p><b>2. Dung dịch Maneval</b></p> <p>Fucsin: 0,05g<br/>           Fe<sub>2</sub>Cl<sub>3</sub>: 5g<br/>           Axit axetic: 5ml<br/>           Phenon: 3,9ml<br/>           Nước cất: 95ml</p>   |
| <p><b>3. Dung dịch Lugol I</b></p> <p>Iốt tinh thể: 7g<br/>           KI: 20g<br/>           Nước cất: 300ml</p>  | <p><b>4. Dung dịch 0,5% Sudan III (hoặc Sudan đen)</b></p> <p>Xudan III (sudan đen): 5g<br/>           Cồn 95°<br/>           (Hoặc axit lactic): 100ml</p>  |
| <p><b>5. Dung dịch lugol II</b></p> <p>Iốt tinh thể: 1g<br/>           KI: 2g<br/>           Nước cất: 300ml</p> <p>Nghiền nhỏ KI với 10ml nước cất trong cối sứ. Sau đó thêm iốt vào tiếp tục nghiền cho tan hết (vì iốt không tan trong nước mà tan trong dung dịch nước KI).</p> <p>Chuyển dung dịch trên sang cốc đong, dùng nước tráng hết phần còn dính ở cối, sau đó thêm nước cho đủ 300ml. Lọc dung dịch và cất trong lọ màu nâu. Dung dịch chỉ nên dùng trong thời hạn 30 ngày.</p> | <p><b>6. Dung dịch mực nho</b></p> <p>Mực nho: 5g<br/>           Nước cất: 15ml</p> <p>Mài mực nho trong nước cất. Quay li tâm dịch mực nho 15 – 20 phút để làm lắng các hạt cặn lớn.</p> <p>Nếu không có máy li tâm để mực nho tự lắng trong 15 ngày.</p> |
| <p><b>7. Dung dịch 10% nigrozin</b></p> <p>Nigrozin: 10g<br/>           Nước cất: 100ml</p> <p>Đun sôi dung dịch trong 30 phút, để nguội rồi thêm 0,5ml Focmalin lắc đều. Giữ thuốc nhuộm trong lọ nâu có nút mài.</p>  | <p><b>8. Xanh metylen Loffer</b></p> <p>Xanh Metylen<br/>           bão hoà rượu: 300ml<br/>           Dung dịch KOH 0,1%: 1ml<br/>           Nước cất: 100ml</p>  |

## CHƯƠNG IV

# NGHIÊN CỨU MỘT SỐ HOẠT TÍNH CỦA VI SINH VẬT

## Bài 6. NGHIÊN CỨU KHẢ NĂNG SINH ENZIM VÀ CHẤT KHÁNG SINH Ở VI SINH VẬT

### A. MỤC TIÊU

Sau khi học xong bài này sinh viên phải:

- Củng cố và nâng cao các khái niệm về khả năng sinh enzym và kháng sinh của vi sinh vật.
- Có khả năng tự thực hiện các thí nghiệm nhằm phát hiện hoạt tính một số enzym và hoạt tính kháng sinh của vi sinh vật.

### B. NỘI DUNG

#### I. KHẢ NĂNG SINH ENZIM CỦA VI SINH VẬT

Trong quá trình sinh trưởng của VSV, hàng loạt các quá trình chuyển hóa sinh học được diễn ra ở bên trong cũng như bên ngoài tế bào của chúng. Sở dĩ các quá trình này xảy ra được là nhờ chúng có một hệ enzym hết sức phong phú. Các enzym từ VSV có thể là enzym nội bào, enzym ở vùng chu chất hoặc enzym ngoại bào. Dưới tác động của enzym, các phản ứng sinh hoá xảy ra nhanh hơn từ  $10^8 - 10^{20}$  lần so với bình thường. Enzim VSV có ưu thế hơn enzym từ động vật và thực vật vì VSV không những là nguồn enzym phong phú mà chúng còn có khả năng sinh một lượng lớn enzym trong thời gian ngắn trên các cơ chất rẻ tiền, dễ kiếm. Hoạt tính của chúng mạnh hơn, hoạt động trong dải pH và nhiệt độ rộng hơn. Hơn nữa, nhiều loại enzym của VSV không có ở động vật và thực vật. Vì thế, enzym VSV được sản xuất nhiều ở quy mô công nghiệp và có ứng dụng rộng rãi. Ngày nay đã có đến hơn 3000 enzym được thông báo và được ứng dụng trong hơn 30 ngành công nghiệp, trong đó chủ yếu là các enzym từ VSV. Trong bài này chúng tôi xin đề cập đến một số phương pháp xác định khả năng sinh các loại enzym quen thuộc như prôteaza, xenlulaza, amylaza, catalaza, ureaza của VSV nhằm cung cấp những kiến thức cơ sở về phương pháp nghiên cứu enzym từ VSV.

## **1.1. Vật liệu, hóa chất và dụng cụ**

### **1.1.1. Vi sinh vật dùng để nghiên cứu khả năng sinh enzym**

- a. Vi khuẩn: *Bacillus*, *E. coli*, *Pseudomonas*.
- b. Nấm mốc: *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Penicillium*...
- c. Xạ khuẩn (*Streptomyces*, *Thermoactinomyces*).

### **1.1.2. Một số môi trường chứa cơ chất cho các loại enzym nghiên cứu (Phụ lục 2)**

- a. Môi trường có chứa tinh bột.
- b. Môi trường chứa CMC (Carboxymethyl xenlulôzơ).
- c. Môi trường chứa prôtein (casein, hoặc 1% sữa, hoặc gelatin).
- d. Môi trường có chứa Urê.

## **1.2. Đặt thí nghiệm phát hiện khả năng sinh prôteaza, amilaza và xenlulaza trên môi trường thạch**

### **1.2.1. Phương pháp cấy chấm điểm**

– Chuẩn bị các môi trường thích hợp dùng để nuôi cấy từng loại VSV này như ở phần phụ lục 2.1.

– Đổ môi trường vào đĩa Petri vô trùng, để nguội.

– Dùng que cấy vòng cấy chấm từ 1 – 3 điểm VSV trên bề mặt môi trường thạch trong đĩa petri.

– Để vào tủ ấm ở 30°C khoảng 3 – 7 ngày (tùy loại VSV).

Sau 3 – 7 ngày, lấy các đĩa Petri ra để kiểm tra và đánh giá khả năng tạo thành các enzym này (xem phần 6.3).

Thí nghiệm được coi là đạt yêu cầu nếu VSV chỉ mọc giới hạn tại các điểm chấm, không lan ra các vùng lân cận (các vùng không chấm VSV).

Bằng phương pháp này ta chỉ phát hiện được khả năng sinh enzym ngoại bào của VSV. Để kiểm tra khả năng sinh enzym nội bào cần dùng phương pháp khoan lỗ thạch.

### **1.2.2. Phương pháp khoan lỗ thạch**

Phương pháp này có thể phát hiện được cả enzym ngoại bào và nội bào.

Trước hết cần nuôi cấy trước VSV sinh enzym trên môi trường dịch thể thích hợp. Sau đó li tâm, tách riêng dịch nuôi cấy và sinh khối. Dịch môi trường đã li tâm dùng để phát hiện enzym ngoại bào. Phần sinh khối được dùng để phát hiện hoạt tính enzym nội bào.

Cách tiến hành:

– Cây các VSV nghiên cứu (vi khuẩn, xạ khuẩn, nấm mốc, nấm men) lên môi trường dịch thể tương ứng trong thời gian từ 24 – 72 giờ (tùy vào loại VSV).

– Li tâm dịch nuôi cấy ở 3000 vòng/phút trong 20 phút (hoặc lọc qua giấy lọc), tách riêng dịch nổi và sinh khối. Sinh khối rửa sạch bằng nước cất (3 lần), đem nghiền nhỏ, thêm nước cất vô trùng (2 : 1), khuấy đều và để trong tủ lạnh 1 – 2 giờ, li tâm hoặc lọc lấy dịch lọc. Cũng có thể dùng trực tiếp sinh khối đã nghiền nhỏ đã trộn thêm nước cất vô trùng (1 : 1).

– Đổ môi trường thạch chứa cơ chất thích hợp vào đĩa Petri vô trùng, để nguội.

– Dùng khoan nút chai khoan từ 1 – 3 lỗ trên môi trường thạch trong đĩa Petri.

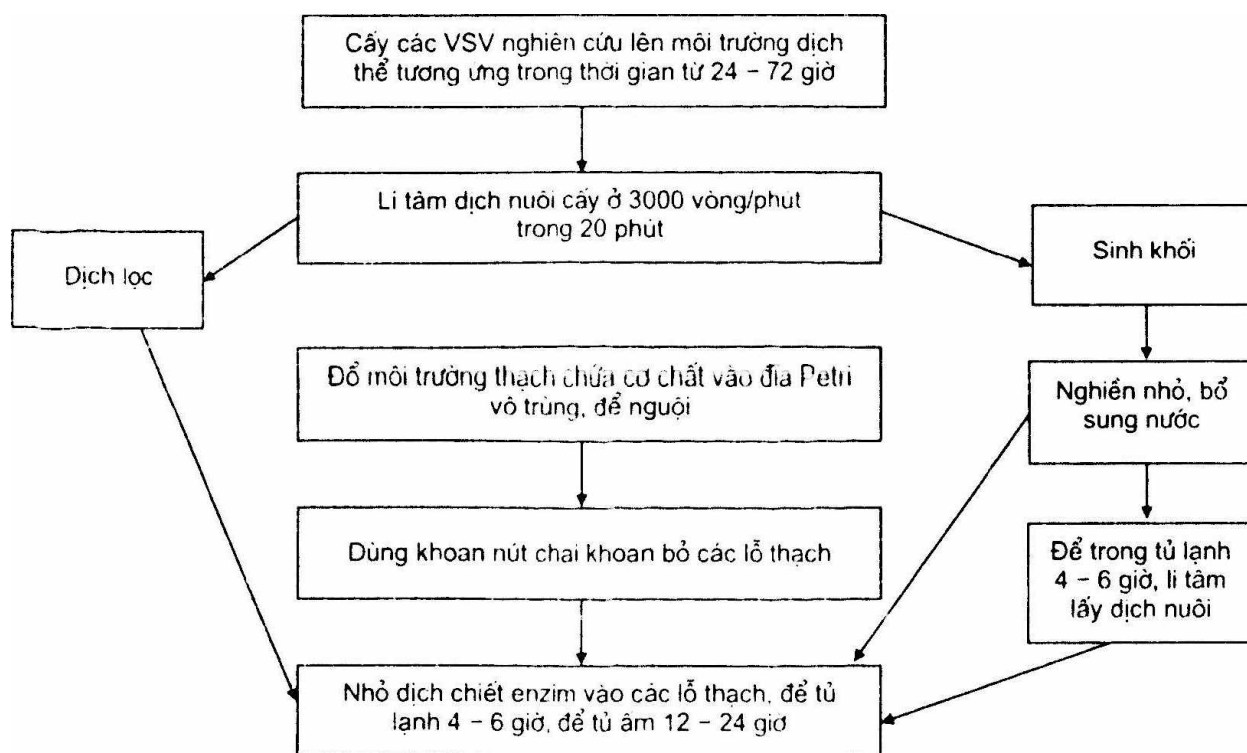
– Dùng pipet nhỏ 0,1ml dịch li tâm (hoặc 0,1g sinh khối nghiền) vào các lỗ thạch.

– Gói đĩa Petri, để vào tủ lạnh từ 6 – 12 giờ để enzym từ các lỗ thạch khuếch tán ra các vùng cơ chất xung quanh.

– Để các đĩa Petri vào tủ ấm từ 6 – 12 giờ.

– Lấy các đĩa Petri ra và kiểm tra kết quả (xem phần 1.2.3).

Sơ đồ tóm tắt thí nghiệm này như ở hình 6.1.



Hình 6.1. Sơ đồ kiểm tra hoạt tính enzym bằng phương pháp khoan lỗ thạch

### 1.2.3. Kiểm tra kết quả thí nghiệm sinh enzym

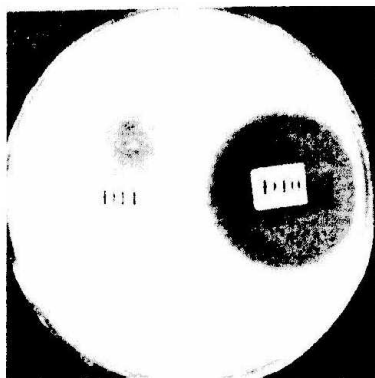
#### a. Kiểm tra khả năng phân giải protein:

Protein bị kết tủa bởi các chất như  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{HgCl}_2$ , cồn 96°. Khi đổ lên bề mặt thạch đã cấy chấm điểm VSV (hoặc chứa dịch nghiền cứu theo phương pháp đục lỗ), nếu VSV sinh ra prôteaza thì xung quanh khuẩn lạc VSV (hoặc các lỗ) sẽ có một vòng trong suốt do các protein đã bị phân giải không còn phản ứng kết tủa với các chất kết tủa protein. Các vùng chưa bị phân giải sẽ có màu trắng đục do protein bị kết tủa.

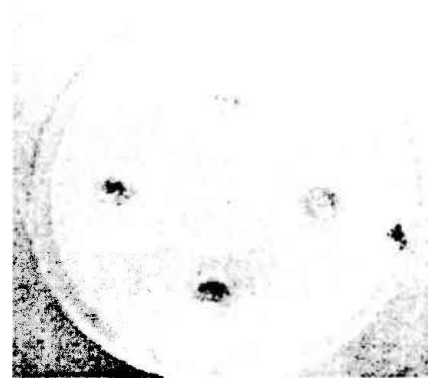
Có thể dùng một trong số dung dịch kết tủa sau đây để nhận biết khả năng này:

- 80% dung dịch  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  bão hoà.
- Cồn 96°.
- Dung dịch  $\text{HgCl}_2$  1% – 10% (nên hạn chế dùng vì rất độc).
- Dung dịch 1% CBB R250 (Comassie Brilliant Blue R250).

Đổ một trong số các dung dịch trên lên bề mặt môi trường đã nuôi cấy VSV, để khoảng 5 – 10 phút, đổ bỏ dịch, rửa lại bằng nước cất. Nếu VSV sinh prôteaza sẽ tạo thành vùng trong suốt xung quanh khuẩn lạc (hình 6.2).



a. Hiện hình bằng dung dịch 1%  $\text{HgCl}_2$



b. Hiện hình bằng dung dịch CBB R250

Hình 6.2. Khả năng phân giải protein của vi sinh vật

\* *Lưu ý:* Nếu VSV được cấy chấm điểm trên môi trường chứa 1% sữa đặc thì hoạt tính phân giải protein có thể nhận biết trực tiếp, không cần các chất kết tủa protein. Màu trắng đục của môi trường sữa là do sự có mặt của chất casein trong sữa. Nếu VSV sinh prôteaza sẽ tạo thành vùng trong suốt xung quanh khuẩn lạc, vùng không bị phân giải vẫn có màu trắng đục.

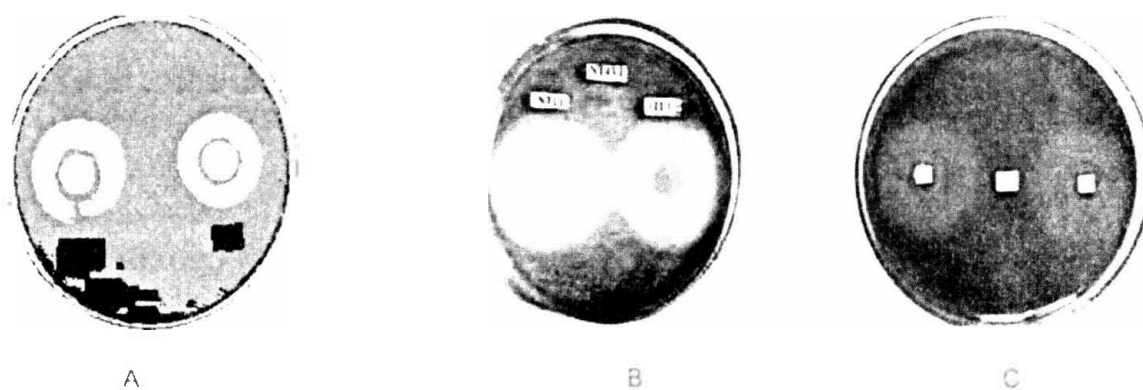
#### b. Kiểm tra khả năng phân giải xenlulôzơ:

Xenlulôzơ bị nhuộm thành màu tím hồng khi có mặt của  $\text{KI} + \text{I}_2$  hoặc màu đỏ khi có mặt của Congo đỏ. Khi xenlulôzơ bị phân giải thành các oligosacarit thì không bắt màu với các chất này.

Vì thế, dung dịch KI + I<sub>2</sub> hoặc dung dịch 1 – 2% côngô đỏ (Congo Red) được dùng để phát hiện hoạt tính xenlulaza.

Khi đổ dung dịch KI + I<sub>2</sub> lên bề mặt môi trường CMC (carbomethyl xenlulozơ) hay xenlulozơ axetat đã nuôi VSV, nếu có sự phân giải các chất này thì xung quanh khuẩn lạc (đỏ khoan) tạo thành vòng trong suốt do xenlulozơ đã bị phân giải, vùng chưa phân giải có màu tím hồng nhạt (hình 6.3).

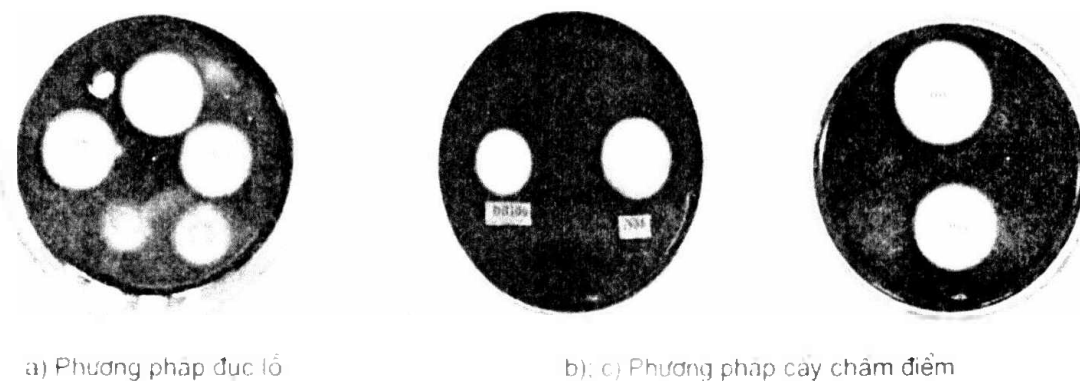
Nếu dùng dung dịch 1 – 2% côngô đỏ thì sau khi đổ côngô đỏ lên bề mặt môi trường nuôi cấy 5 phút, đổ bỏ dung dịch này, sau đó đổ thêm dung dịch NaCl 1M, giữ 15 phút, rồi rửa bằng nước sẽ thấy vùng phân giải không màu trong suốt, phần chưa phân giải bắt màu côngô đỏ (hình 6.3).



Hình 6.3. Hoạt tính xenlulaza: hiện hình bằng dung dịch lugol (A và B) và bằng côngô đỏ (C)

### c. Kiểm tra hoạt tính amilaza

– Tinh bột bị bắt màu xanh tím đậm khi tác động với iốt còn các đường đơn và oligosacarit sẽ không bắt màu. Vì thế, khi đổ dung dịch KI + I<sub>2</sub> lên bề mặt môi trường nuôi cấy VSV, vùng phân giải xung quanh khuẩn lạc không màu trong suốt, còn phần chưa phân giải có màu xanh đậm (hình 6.4).



Hình 6.4. Khả năng phân giải tinh bột: Hiện hình bằng dung dịch lugol

#### d. Đánh giá sơ bộ khả năng sinh các enzym

– Lật sắp các Petri, dùng thước đo đường kính vòng phân giải (kí hiệu D) và đường kính lỗ khoan (hoặc độ lớn của khuẩn lạc VSV), kí hiệu d.

– Đánh giá khả năng sinh enzym: Tính tỉ lệ D/d hoặc D – d. Hoạt tính enzym của các VSV có thể sơ bộ đánh giá nhờ giá trị D – d hoặc D/d, các giá trị này càng lớn thì khả năng sinh enzym của VSV càng mạnh.

### 1.3. Phát hiện khả năng sinh ureaza

#### 1.3.1. Nguyên lí chung

Một số VSV có khả năng sinh ra enzym ureaza, phân giải urê thành CO<sub>2</sub>, NH<sub>3</sub> và H<sub>2</sub>O. Để có thể phát hiện được hoạt tính phân giải urê cần nuôi VSV trong môi trường chứa urê có chất chỉ thị là phenol đỏ. Khi có sự phân giải urê, môi trường sẽ trở nên kiềm tính, màu vàng đỏ nhạt của phenol đỏ sẽ nhanh chóng chuyển sang màu tím hồng.

#### 1.3.2. Vật liệu, hóa chất

– Vi khuẩn (*E. coli*, *Bacillus*, *Pseudomonas*...) đã nuôi trong môi trường dịch thể 24 – 48 giờ.

– 5 ống môi trường urê dịch thể.

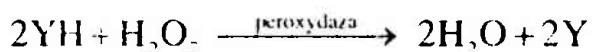
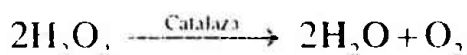
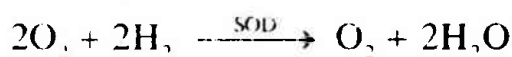
#### 1.3.3. Đặt thí nghiệm

– Cấy vi khuẩn vào các ống môi trường urê, để 24 – 48 giờ, quan sát sự đổi màu của dịch nuôi, ghi nhận xét. Các vi khuẩn có khả năng sinh ureaza sẽ làm dịch nuôi có màu hồng (hình 6.5).

### 1.4. Phát hiện hoạt tính catalaza

#### 1.4.1. Nguyên lí chung

Các VSV có enzym chứa flavoprotein khử O<sub>2</sub> tạo ra các H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> hoặc O<sub>2</sub> , đây là những chất oxi hóa cực mạnh, phá hủy nhanh chóng cấu trúc của tế bào. Nhiều loài VSV có khả năng sản sinh ra các enzym chuyển hóa các chất trên. Các enzym này có thể là superoxidismutaza (SOD), catalaza hoặc peroxidaza như phương trình sau đây:





### 1.4.2. Vật liệu, hóa chất

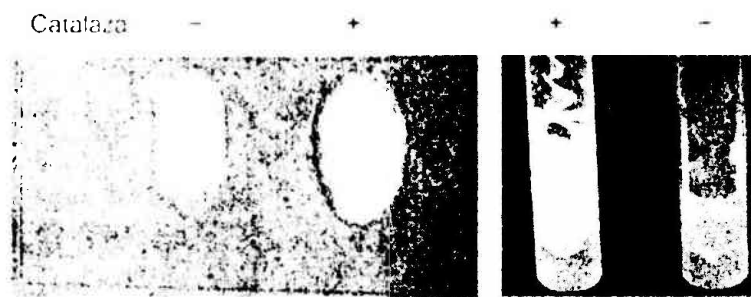
a. *Vi khuẩn*: *E.coli*, *Bacillus*... nuôi cấy trên môi trường dịch thể hoặc môi trường thạch 24 – 48 giờ.

b. *Hóa chất*: Dung dịch 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

c. *Phương pháp*: Nhỏ một giọt dung dịch 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> vào sinh khối của vi khuẩn. Nếu thấy sủi bọt thì chứng tỏ trong sinh khối có catalaza (catalaza (+)). Nếu không sủi bọt thì trong sinh khối không có catalaza (catalaza (-)) (hình 6.6).



Hình 6.5. Hoạt tính ureaza: thử trên dịch nuôi cấy



Hình 6.6. Hoạt tính catalaza

a) Thử trên dịch nuôi vi khuẩn

b) Thử trên sinh khối cấy trên thạch nghiêng

## II. HOẠT TÍNH ĐỐI KHÁNG CỦA VI SINH VẬT

Trong thiên nhiên, mối quan hệ giữa các VSV rất đa dạng. Một trong số các mối quan hệ đó là quan hệ đối kháng (một loại VSV nào đó có khả năng ức chế sự sinh trưởng của VSV khác). Cơ chế đối kháng cũng rất đa dạng: có thể do làm tăng hoặc giảm pH môi trường không phù hợp cho sự sinh trưởng của VSV khác, kí sinh hủy diệt tế bào VSV khác hoặc sinh ra các chất độc hại như H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, axit hữu cơ... Mối quan hệ quan trọng nhất là VSV sinh ra các chất hoá học đặc hiệu ức chế hoặc tiêu diệt sự sống của các loại VSV khác một cách có chọn lọc ngay ở nồng độ thấp (gọi là các chất kháng sinh). Các VSV này được gọi là các VSV sinh kháng sinh. Đây là mối quan hệ có ứng dụng lớn trong thực tiễn. Mối quan hệ này sẽ được đề cập sâu trong bài thí nghiệm này.

### 2.1. Tuyển chọn các vi sinh vật sinh kháng sinh

#### a. Nguyên tắc

VSV sinh kháng sinh là VSV đối kháng sinh ra các chất đặc hiệu ức chế hoặc tiêu diệt sự sống của các loại VSV khác một cách có chọn lọc ngay ở nồng độ thấp. Vì thế, bước đầu tiên tuyển chọn các VSV sinh kháng sinh là phải phát hiện khả năng đối kháng của nó, sau đó phải xác định bản chất đối kháng này có phải là do chất kháng sinh hay không.

### **b. Chuẩn bị vật liệu, hóa chất, dụng cụ**

– Mỗi nhóm cần có 3 đĩa Petri chứa 3 loại môi trường: Môi trường MPA dành cho vi khuẩn, môi trường PDA dành cho nấm mốc, môi trường Hansen dùng cho nấm men.

– Khoan nút chai  $\Phi = 0,7 - 1\text{cm}$

– Que trang vô trùng

– Pipet vô trùng

– Các VSV đối kháng và VSV kiểm định: Giáo viên chuẩn bị trước như hướng dẫn dưới đây:

+ Chuẩn bị các VSV đối kháng: Các VSV định nghiên cứu về khả năng đối kháng được nuôi cấy trên các môi trường thích hợp với chúng. Có thể nuôi các VSV này trên môi trường thạch theo phương pháp trải dày hoặc cấy trong môi trường dịch thể trong tủ ấm ở nhiệt độ và thời gian thích hợp (nấm mốc, vi khuẩn 2 – 4 ngày, xạ khuẩn 5 – 7 ngày). Sau thời gian này VSV sẽ sinh trưởng dày đặc trên bề mặt môi trường dành cho chúng đồng thời sinh ra các chất ức chế sự sinh trưởng của các VSV khác.

+ Chuẩn bị VSV kiểm định: VSV kiểm định là các loại VSV dùng để kiểm tra tính đối kháng của các VSV đối kháng. Chúng có thể là vi khuẩn, nấm mốc hay xạ khuẩn tùy thuộc vào mục đích của sự tuyển chọn VSV đối kháng.

\* Các loại VSV thường được sử dụng làm VSV kiểm định:

– Vi khuẩn Gram dương: *Bacillus subtilis*, *B. cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Sarcina lutea*.

– Vi khuẩn Gram âm: *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*

– Nấm men: *Candida albicans*, *Torulopsis ustilis*

– Nấm mốc: *Trichophyton*, *Fusarium*, *Aspergillus*...

\* Cách chuẩn bị VSV kiểm định:

Các VSV từ các ống giống thuần được cấy chuyển sang nuôi ở môi trường lỏng thích ứng cho mỗi loại (vi khuẩn trên môi trường nước thịt – pepton, nấm men trên môi trường Hansen, nấm mốc trên môi trường Czapek – Dox và xạ khuẩn trên môi trường Czapek – Dox – canxi) trong 24 giờ ở 30°C.

### **c. Đặt thí nghiệm phát hiện hoạt tính đối kháng**

\* Phương pháp khối thạch

– Lấy khoan nút chai ( $\phi = 6 - 10\text{mm}$ ) khử trùng trên ngọn đèn, khoan môi trường đã nuôi cấy VSV đối kháng như trình bày ở trên thành các khối hình trụ.

- Cấy các VSV kiểm định trên các môi trường thạch tương ứng: theo phương pháp trải dày bằng que trang hay phương pháp trộn trong môi trường thạch.

- Dùng que cấy lấy các khối thạch có chứa VSV đối kháng đặt lên bề mặt của môi trường chứa các VSV kiểm định đã chuẩn bị ở bước 2. Đặt đĩa Petri, để trong tủ lạnh 6 – 8 giờ cho các chất sinh ra khuếch tán vào môi trường có VSV kiểm định, sau đó để vào tủ ấm 28 – 30°C trong 2 – 3 ngày.

\* *Phương pháp cấy chấm điểm:* Cấy chấm điểm VSV nghiên cứu lên bề mặt môi trường đã cấy VSV kiểm định

\* *Phương pháp khoan lỗ thạch:* Tiến hành như phần xác định hoạt tính enzym.

\* *Phương pháp khoan giấy lọc:* Nhỏ dịch nuôi cấy VSV nghiên cứu lên các khoan giấy lọc (0,5 – 1cm) vô trùng, để khô tự nhiên hoặc sấy ở 40°C, sau đó đặt lên bề mặt môi trường đã có VSV kiểm định ở trên. Để trong tủ ấm ở điều kiện thích hợp với sự sinh trưởng của từng loại VSV kiểm định.

#### **d. Xét nghiệm kết quả**

Quan sát sự tạo thành vòng vô khuẩn

Quan sát các đĩa Petri đã đạt thí nghiệm: Nếu các VSV nghiên cứu có khả năng đối kháng với các VSV kiểm định thì xung quanh khối thạch sẽ không có sự sinh trưởng của VSV kiểm định (tạo thành vòng vô khuẩn), dễ dàng nhìn thấy bằng mắt thường.

Đánh giá sơ bộ khả năng đối kháng dựa vào độ lớn của vòng vô khuẩn: Dùng thước kẻ đo đường kính vòng vô khuẩn (D) và đường kính của khối thạch hay lỗ khoan (d). Tính giá trị  $D - d$  hoặc  $D/d$ . Khả năng đối kháng của VSV càng mạnh thì vòng vô khuẩn (D) càng lớn.

## **2.2. Xác định bản chất của sự đối kháng là chất kháng sinh**

### *a. Nguyên tắc:*

Sau khi có được các VSV có khả năng đối kháng, ta cần loại bỏ các yếu tố không phải là các chất kháng sinh như độ pH (do VSV đối kháng sinh ra quá kiềm hoặc quá axit đối với VSV kiểm định), hay sự tạo thành  $H_2O_2$ , các chất này thường ức chế không chọn lọc các VSV kiểm định.

### *b. Cách tiến hành:*

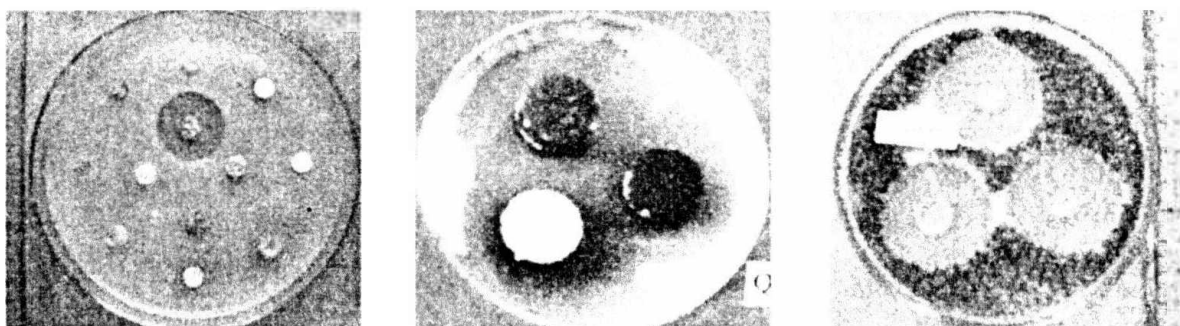
- Nuôi các chủng có khả năng đối kháng trên môi trường thích hợp với chúng.
- Kiểm tra khả năng sinh  $H_2O_2$  của chủng nghiên cứu, nếu nồng độ  $H_2O_2$  lớn hơn 1% thì phải loại bỏ  $H_2O_2$  vì đa số VSV bị diệt bởi  $H_2O_2$  ở nồng độ này.
- Kiểm tra độ pH của dịch nuôi cấy. Điều chỉnh độ pH của dịch nuôi về pH thích hợp cho sự sinh trưởng của VSV kiểm định.

– Tiến hành xác định khả năng đối kháng của các dịch đã được xử lý ở trên bằng phương pháp khoan lỗ thạch như phần thử hoạt tính enzym.

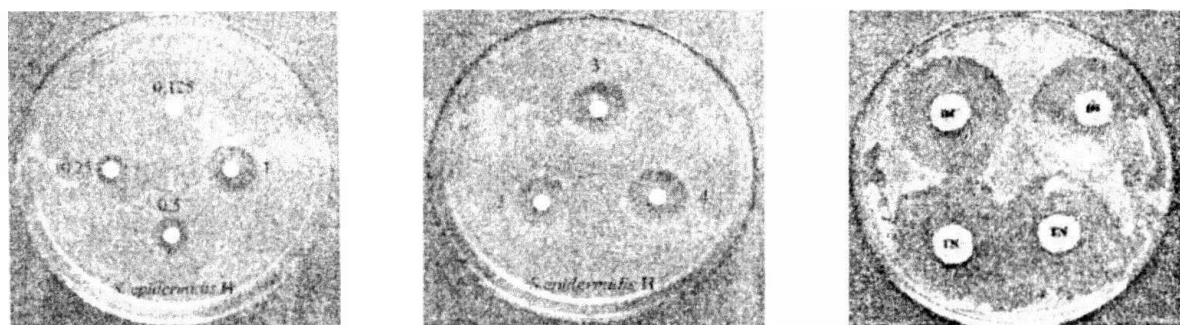
Nếu dịch nuôi cấy sau khi loại bỏ  $H_2O_2$  và điều chỉnh pH vẫn thể hiện hoạt tính đối kháng thì có thể VSV đã sinh chất kháng sinh.

Việc nghiên cứu sâu hơn về chất kháng sinh không tiến hành ở bài thực hành này.

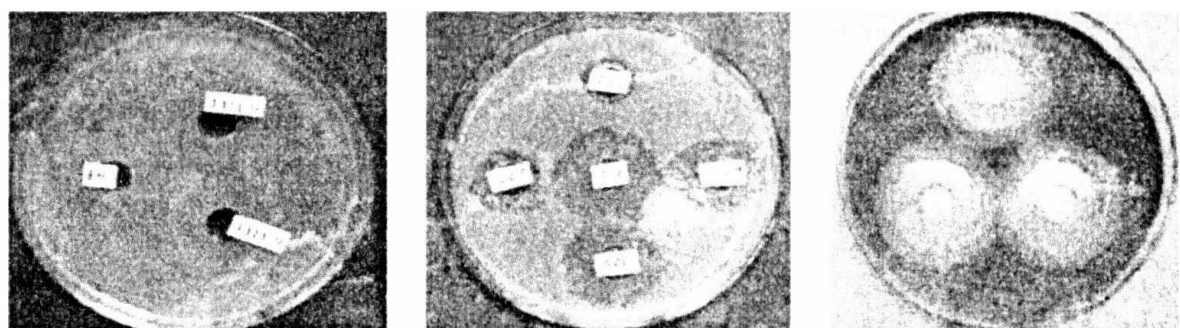
Một số hình ảnh minh họa về hoạt tính đối kháng của VSV được ghi lại ở hình 6.7.



a. Hoạt tính kháng sinh chống nấm (phương pháp khối thạch)



b. Hoạt tính kháng khuẩn (phương pháp khoan giấy lọc)



c. Hoạt tính kháng khuẩn và hoạt tính kháng nấm. (Phương pháp đục lỗ)

Hình 6.7. Một số hình ảnh về khả năng đối kháng của vi sinh vật

### 2.3. Hướng dẫn kiểm tra, đánh giá kết quả thí nghiệm

- Giáo viên kiểm tra từng thí nghiệm của các nhóm, thảo luận với sinh viên về nhận biết và đánh giá kết quả thí nghiệm.

- Sinh viên cần nhận xét kết quả nghiên cứu của mình, ghi vào bảng, như ví dụ ở bảng sau:

| STT | Thí nghiệm          | Vi sinh vật nghiên cứu | Cơ chất hoặc VSV kiểm định | D - d (mm) | Nhận xét  | Kết luận                                    |
|-----|---------------------|------------------------|----------------------------|------------|---|---|
| 1   | Hoạt tính prôteaza  | <i>Aspergillus</i>     | 1% Casein                  | 32         | Vòng phân giải trong suốt   | Hoạt tính mạnh                              |
|     |                     |                        |                            | 32         | Vòng phân giải mờ   | ?   |
|     |                     |                        |                            | 10         | Vòng phân giải trong suốt   | ?   |
| 2   | Hoạt tính đối kháng | Ví dụ: Nấm mốc         | Ví dụ: <i>E.coli</i>       | 30         | Vòng vô khuẩn rõ  | Hoạt tính kháng <i>E. coli</i> của nấm mạnh |
|     |                     |                        |                            | 10         | Vòng vô khuẩn rõ  | ?   |
|     |                     |                        |                            | 3,0        | Vòng vô khuẩn mờ, có sự phát triển yếu của vi khuẩn kiểm định trong vòng vô khuẩn | ?   |
|     |                     |                        |                            | 0          | 0   | Không có hoạt tính                          |

### 2.4. Một số câu hỏi

1. Trả lời các ô đánh dấu chấm hỏi ở bảng trên.
2. Tại sao những phương pháp trên đây chỉ là các phương pháp định tính và sơ bộ xác định hoạt tính?
3. Giải thích ý nghĩa của từng bước trong các thí nghiệm ở bài này.

## Phụ Lục 2: CHUẨN BỊ MÔI TRƯỜNG CHO BÀI 6

### 2.1. Chuẩn bị môi trường kiểm tra hoạt tính enzym: xenlulaza, prôteaza và amylaza bằng phương pháp cấy chấm điểm

Đầu tiên pha chế các môi trường nuôi cấy cơ sở cho từng loại VSV theo bảng sau:

| Môi trường nuôi cấy cơ sở  |                               |  |
|--|-------------------------------|--|
| Vi khuẩn   | Nấm mốc                       | Xạ khuẩn   |
| Peptôn: 5g<br>Cao nấm men: 2,5g<br>Glucôzơ: 1g<br>Nước: 1000ml<br>pH = 7,0 - 7,2 | Môi trường Czapek<br>pH = 5,5 | Môi trường Czapek<br>Glucôzơ - CaCO <sub>3</sub><br>pH = 6,8 - 7,2 |

Sau đó thêm vào môi trường cơ sở các chất cần nghiên cứu như bảng sau

| Enzim cần nghiên cứu | Thành phần môi trường   |
|----------------------|---|
| Xenlulaza            | Môi trường cơ sở + 0,3 đến 0,5% chất xenlulôzơ (CMC, xenlulôzơ axetat hoặc xenlulôzơ bột) |
| Prôteaza             | Môi trường cơ sở + 20ml sữa đặc hoặc 1,0% gelatin hay casein                              |
| Amilaza              | Môi trường cơ sở + 1,0% tinh bột tan  |

\* Nếu thử bằng phương pháp khoan lỗ thạch thì chỉ cần môi trường chứa 1,5 - 1,8% thạch và thêm các cơ chất tương ứng, không cần dùng môi trường cơ sở với đầy đủ các thành phần như ở bảng trên.

### 2.2. Pha chế các thuốc thử

\* Dung dịch thuốc thử HgCl<sub>2</sub> 1%

|                       |    |      |      |
|-----------------------|----|------|------|
| HgCl <sub>2</sub> :   | 1g | HCl: | 20ml |
| Nước cất đủ tới 100ml |    |      |      |

\* Dung dịch nhuộm CBB 250:

|                |       |                           |       |
|----------------|-------|---------------------------|-------|
| 0,1% CBB R250: | 0,5g  | 7% axetic axit:           | 50ml  |
| 40% methanol:  | 200ml | H <sub>2</sub> O khử ion: | 260ml |

\* Dung dịch 80% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> bão hòa: Pha 62,5g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> trong 100g H<sub>2</sub>O ở nhiệt độ 30°C.

## CHƯƠNG V

# SỰ CHUYỂN HÓA CÁC HỢP CHẤT HỮU CƠ KHÔNG CHỨA NITƠ BẰNG VI SINH VẬT

## Bài 7. MỘT SỐ QUÁ TRÌNH LÊN MEN

### A. MỤC TIÊU

- Củng cố các kiến thức và kỹ năng thực hành để hiểu rõ về một số quá trình sinh hóa do VSV thực hiện và ý nghĩa thực tiễn của chúng.

Sinh viên cần:

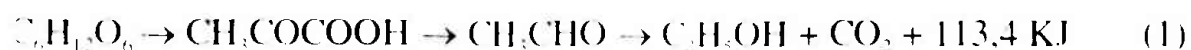
- Nắm vững cơ chế của các quá trình sinh hóa đó.
- Tiến hành thành công các thí nghiệm và xét nghiệm kết quả các quá trình thí nghiệm thận trọng để hiểu rõ ý nghĩa của từng bước thí nghiệm.

Các kết quả thu được không chỉ củng cố các kiến thức về các quá trình trao đổi chất và năng lượng ở VSV mà còn nâng cao tư duy và khả năng làm việc với các thí nghiệm nghiên cứu tương tự khác về hoạt động sống của VSV và ý nghĩa của chúng trong đời sống và bảo vệ môi sinh.

### B. NỘI DUNG

#### I. XÁC ĐỊNH KHẢ NĂNG LÊN MEN RƯỢU ETYLIC

**1.1. Bản chất:** Khi phân giải đường trong điều kiện kỵ khí, VSV chuyển hydro từ NADH đến axetaldehyd để tái tạo NAD<sup>+</sup>, sản phẩm chính là tạo thành rượu etylic.



**1.2. Vi sinh vật lên men:** Quá trình lên men rượu chủ yếu là do các nấm men chi *Saccharomyces* (*S. cerevisiae*, *S. ellipsoideus*) hay *Schizosaccharomyces*. Ngoài ra, một số loài *Mucor* (*M. rouxi*) hay *Sarcina ventriculi* cũng có khả năng lên men etylic.

### 1.3. Tiến hành thí nghiệm xác định khả năng lên men rượu

#### 1.3.1. Vật liệu

a. Chuẩn bị dịch lên men: Để quá trình lên men xảy ra tốt nhất dùng dịch lên men có thành phần: 15% nước đường, 0,5% Pepton, 0,3%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  và 0,1%  $\text{MgSO}_4$ . Cũng có thể dùng dung dịch 10% đường hoặc dung dịch 10% đường bổ sung 1%  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . Đun sôi để nguội.

b. Nấm men: Dùng 10% dịch nuôi cấy nấm men *S. cerevisiae* thuần, hoặc bánh men thuốc bắc tán nhỏ.

c. Dụng cụ: Bình lên men Smith; nếu không có có thể dùng chai bia có nút kín.

d. Hóa chất: dung dịch 10%  $\text{Ba}(\text{OH})_2$ ; dung dịch 20%  $\text{NaOH}$ ; iốt tinh thể ở dạng bột;  $\text{H}_2\text{SO}_4$  đậm đặc; dung dịch kalibicrômat ( $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ).

#### 1.3.2. Tiến hành lên men

\* Cách 1: Lên men trong bình Smith (hình 7.1)

– Cho dịch lên men vào bình lên men, đậy bằng nút cao su nối với ống thủy tinh uốn cong, một đầu được nhúng chìm vào ống nghiệm chứa đầy nước úp ngược.

– Đặt các bình thí nghiệm ở 25 – 30°C, sau vài giờ lên men thì  $\text{CO}_2$  thải ra sẽ đẩy cột nước trong ống nghiệm tụt xuống.

\* Cách 2: Cho dịch lên men vào chai bia, nút kín lại, để 24 – 36 giờ, khi mở nút chai thấy bọt khí  $\text{CO}_2$  nổi mạnh lên.

#### 1.3.3. Phân tích kết quả thí nghiệm

– Xác định cường độ lên men rượu: Cường độ lên men rượu có thể xác định dựa vào lượng  $\text{CO}_2$  thoát ra hoặc hàm lượng etanol được tạo thành từ một thể tích môi trường xác định trong một thời gian nhất định. Thông thường người ta dùng phương pháp xác định theo hàm lượng  $\text{CO}_2$  vì nó dễ dàng xác định hơn hàm lượng rượu etylic.



1. Lên men trong bình Smith



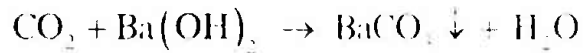
2. Tế bào nấm men *Saccharomyces cerevisiae*

Hình 7.1. Thí nghiệm lên men rượu



- Định tính CO<sub>2</sub>:

+ Phản ứng với Ba(OH)<sub>2</sub>: Cho 5ml dung dịch lên men vào ống nghiệm, thêm 1ml dung dịch 10% Ba(OH)<sub>2</sub>. Dùng kẹp gỗ kẹp ống nghiệm rồi đun sôi nhẹ trên ngọn đèn cồn rồi để lắng. Nếu có mặt của CO<sub>2</sub> sẽ tạo thành kết tủa màu trắng do sự tạo thành BaCO<sub>3</sub> theo phản ứng:



+ Nếu đặt thí nghiệm trong bình Smith thì đánh giá mức độ thải CO<sub>2</sub> bằng mức tụt của cột nước trong ống nghiệm.

- Định tính rượu etylic:

+ Định tính rượu etylic bằng phản ứng tạo màu với dung dịch kali bicromat (K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>).

Lấy vào ống nghiệm 1 – 2ml dung dịch đã lên men, 1 – 2ml H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> đậm đặc rồi thêm từng giọt dung dịch 1% K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>, lắc đều. Nếu trong dung dịch phản ứng có mặt rượu etylic sẽ xuất hiện màu xanh lam, do phản ứng của rượu etylic với K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> theo phương trình:



Ống đối chứng: Làm tương tự như trên nhưng thay 1 – 2ml dịch lên men bằng 1 – 2ml dịch chưa lên men. So sánh sự thay đổi màu ở hai ống thí nghiệm và đối chứng.

+ Phát hiện etylic bằng phương pháp chưng cất: Thay ống thủy tinh bề cong của bình lên men Smith bằng ống thủy tinh thẳng đứng rồi đun trên ngọn đèn cồn cho sôi lăn tăn. Rượu etylic sẽ bốc hơi thoát ra ngoài. Dùng diêm châm lửa lên đầu ống thủy tinh, nếu có rượu etylic bay ra sẽ cháy thành ngọn lửa xanh.

- Xác định sự có mặt của nấm men: Dùng que cấy lấy một vòng dịch lên men làm tiêu bản bằng phương pháp nhuộm đơn tế bào. Tế bào *Saccharomyces* có hình cầu hay ovan, nảy chồi (Hình 7.1).

#### 1.4. Một số ứng dụng của quá trình lên men rượu

Quá trình lên men rượu được ứng dụng để sản xuất rượu, các đồ uống có chứa rượu theo phương pháp truyền thống và công nghiệp.

##### 1.4.1. Lên men rượu nếp cái:

Rượu nếp cái là loại sản phẩm lên men rượu của gạo nếp hoặc gạo nếp cẩm. Sản phẩm được dùng cả bã sau khi lên men.

*a. Cách làm rượu nếp cái theo các phương pháp cổ truyền*

Lấy 1kg gạo nếp xát bỏ vỏ trấu, nấu chín (đồ sôi hoặc nấu cơm chín), sau đó rải ra mặt cho hạ nhiệt đến 40 – 45°C. Lấy 20 – 30 gam bánh men dân gian, nghiền

nhỏ, rây lấy phần bột mịn, rắc đều lên nếp và xếp vào rổ rá có lót lớp lá chuối hoặc lá rong. Đặt mặt lên một nồi để rượu hình thành có thể chảy xuống. Đậy kín bằng một tấm nilon, hoặc lớp chăn, giữ ấm trong 2 – 3 ngày sẽ có rượu nếp cái

#### *b. Làm rượu cần của người Chu – Ru ở Lâm Đồng*

Rượu cần của người Chu – Ru được làm từ một loại men đặc biệt, đó là thứ men được chế biến từ 5 loại cây rừng. Trong 5 loại cây được gọi là men “dực”, kết hợp với cây Kzut là men “cái”. Sau khi có đủ 5 loại cây, người ta đem phơi men “dực” cho héo, rồi đem băm nhỏ, bỏ vào cối giã cho đến khi thành bột, sau đó phơi nắng cho khô.

Bấy giờ người ta đem gạo ra ngâm nước một đêm, vớt ra để cho ráo, rồi giã thành bột, nặn thành từng khối bằng nắm tay hay vo tròn như quả trứng – Đây là men để làm rượu. Men này chỉ sử dụng làm rượu sau một tháng, nếu đem dùng sớm quá rượu bị chua, còn nếu để lâu hơn 6 tháng thì men sẽ mất tác dụng.

#### **1.4.2. Lên men đường hoặc lên men nước hoa quả**

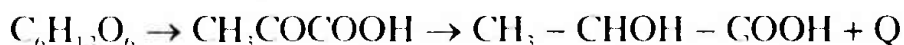
Dung dịch đường 10% hoặc nước quả ép, đun nhẹ ở 70°C trong 20 phút để loại bỏ vi khuẩn, bổ sung nấm men chuẩn *Sacharomyces cerevisiae*, để chổ ấm 30 – 35°C trong 2 ngày, sau đó để trong tủ lạnh ở 10°C trong 1 ngày sẽ thu được nước giải khát lên men.

#### **1.4.3. Sản xuất cốm bổ dinh dưỡng**

Nấm men *Sacharomyces cerevisiae* được nhân giống, thu sinh khối nấm men. Sau đó có thể dùng tác nhân tự phân là muối ăn hoặc toluen tác động với mục đích thu nhận mức cao nhất các chất dinh dưỡng có trong tế bào nấm men, đưa ra môi trường dịch thể. Hấp thụ các chất dinh dưỡng này lên tinh bột, đường, màu thực phẩm và hương liệu, đóng khuôn, sấy khô, đóng gói sản phẩm.

## **II. XÁC ĐỊNH KHẢ NĂNG LÊN MEN LACTIC**

**2.1. Bản chất:** khi phân giải đường trong điều kiện kỵ khí, vi khuẩn lactic chuyển hydro từ NADH sang axit pyruvic để tái tạo NAD<sup>+</sup>, tạo thành axit lactic:



Căn cứ vào sản phẩm sinh ra, quá trình lên men lactic được chia thành hai kiểu: Đồng hình và dị hình

**2.2. Vi khuẩn lên men:** *Streptococcus* (*S. cremoris*, *S. lactis*, *S. thermophilus*) và *Lactobacillus* (*L. bulgaricus*, *L. acidophilus*, *L. cucumeris*, *L. plantarum*...)

*L. brasicae fermentatae*, *Leuconostoc mesenteroides*, *E. coli*...

Quá trình lên men lactic có nhiều ứng dụng trong đời sống hàng ngày (muối dưa, muối cà, làm mắm chua, nem chua, sữa chua) và trong công nghiệp để sản xuất axit lactic, sản xuất phomat.

## 2.3. Đạt thí nghiệm lên men lactic

### 2.3.1. Vật liệu, hóa chất

Rau cải dưa, sữa tươi (hoặc sữa bột, sữa đặc có đường). Muối ăn, đường sacarôza, 10% axit  $H_2SO_4$ , dung dịch 5%  $KMnO_4$ ; dung dịch  $AgNO_3$  trong  $NH_4NO_3$ , dung dịch 0,1N NaOH. Các loài *Lactobacillus* thuần hoặc sữa chua của thương phẩm.

### 2.3.2. Lên men rau quả

- Rau cải (bắp cải, su hào, cà...) rửa sạch, phơi ở chỗ dâm để loại bớt nước.
- Đổ dung dịch nước 6% muối vào vại (sành sứ hoặc thủy tinh), có thể bổ sung 5% đường làm nguồn cacbon để hấp thụ lúc đầu cho các vi khuẩn lactic.
- Cho rau vào vại, nén rau chìm hẳn trong dung dịch trên. Để ở chỗ ấm hoặc tủ ấm  $30 - 35^\circ C$  trong 2 - 3 ngày. Vi sinh vật có mặt trên rau, củ sẽ lên men đường chiết rút từ tế bào, làm chua rau quả. Vì vậy, nếu quá trình lên men lactic xảy ra tốt thì dưa không bị nát, có màu vàng, thơm đặc trưng của dưa muối.

### 2.3.3. Lên men sữa thành sữa chua

Sữa tươi là cơ chất thích hợp nhất cho lên men lactic vì trong sữa tươi đã có từ  $10 - 20\%$  axit lactic ( $1\%T = 0,009g$  axit lactic), tạo điều kiện thuận lợi cho các vi khuẩn lactic phát triển và lên men.

- Rót sữa tươi vào cốc đồng  $\rightarrow$  đun sôi nhẹ để thanh trùng ( $85 - 87^\circ C$  trong 5 - 10 phút hoặc  $90 - 92^\circ C$  trong 2 - 3 phút).
- Bổ sung tỉ lệ 10% giống vi khuẩn lactic thuần chủng (*S. cremoris*, *S. lactis*, *S. diacetylacetic*, *L. acidophyllus*... đã nhân giống ở môi trường sữa), hoặc sữa chua thành phẩm loại tốt  $\rightarrow$  khuấy đều  $\rightarrow$  dây bằng nilon sạch  $\rightarrow$  buộc kĩ  $\rightarrow$  để ở nhiệt độ từ  $30 - 35^\circ C$  khoảng 5 - 7 giờ, sữa bắt đầu đông tụ.
- Giữ ở  $5 - 10^\circ C$  trong 10 - 12 giờ cho protein trong sữa giãn nở, giảm độ ẩm tự do làm sản phẩm trở nên mịn.

## 2.4. Phân tích kết quả thí nghiệm

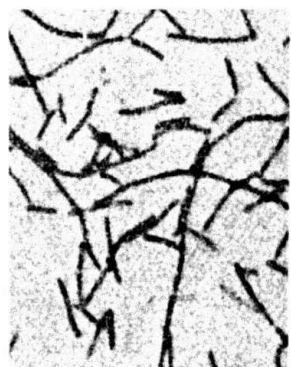
### a. Định tính sự có mặt của axit lactic

*Phản ứng tạo axetaldehyd:* Cho 10ml dịch lên men dưa chua vào cốc đồng dung tích 50ml, thêm vào đó 1ml dung dịch 10% axit  $H_2SO_4$ , 2ml dung dịch  $KMnO_4$  5%. Tắm dung dịch  $AgNO_3$  trong  $NH_4NO_3$  vào một miếng giấy lọc,

đậy lên miệng cốc và đun sôi trên ngọn đèn cồn. Quan sát sự chuyển màu của giấy lọc. Nếu có mặt của axit lactic, phản ứng sẽ xảy ra và tạo thành axetaldehyd. Axetaldehyd tác dụng với hỗn hợp  $\text{AgNO}_3$  trong  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  tạo ra chất làm đen giấy lọc. Phương trình phản ứng:



b) *Quan sát vi khuẩn lactic*: Làm vết bôi từ dịch nước dứa chua hay sữa chua → cố định trên ngọn đèn cồn → nhuộm đơn → quan sát ở vật kính dầu.



*L. acidophilus*

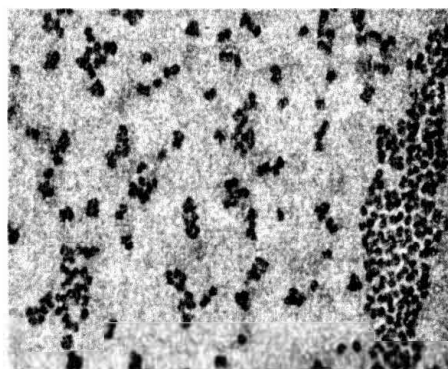


*L. bulgaricus*



*L. lactis*

a) Một số hình dạng vi khuẩn lactic (nguồn Internet).



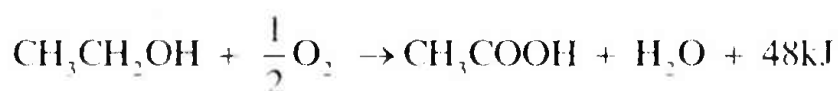
b) Vi khuẩn lactic trong sữa chua (ảnh Trần Thị Thuý).

Hình 7.2. Hình dạng của một số vi khuẩn lactic

### III. XÁC ĐỊNH KHẢ NĂNG “LÊN MEN” AXETIC

#### 3.1. Bản chất

Sự oxi hoá rượu thành axit axetic (còn được gọi là lên men giấm) xảy ra như sau:



### 3.2. Vi sinh vật “lên men” axetic

Quá trình được xảy ra nhờ giống vi khuẩn hiếu khí *Acetobacter* (*A. xylinum*, *A. pasteurianum*, *A. aceti*, *A. orleanense*, *A. schutzenbackii*). Trong “lên men” axetic tự nhiên, tác nhân chủ yếu là *Acetobacter* và *Gluconobacter*. Không nên nhầm lẫn sự oxi hoá rượu thành axit axetic bởi các *Acetobacter* và sự lên men kỵ khí tạo thành axetic của các loài *Clostridium*.

### 3.3. Đặt thí nghiệm

-- Cho 30 -- 40ml môi trường lên men (bia hoặc dung dịch gồm 10 -- 15% rượu etylic và 3 -- 5% đường sacarôza) vào bình nón dung tích 150ml. Axit hoá môi trường bằng axit axetic 1M đến pH = 4,5 -- 5,0.

-- Bỏ sung 10% *Acetobacter* trong dung dịch lên men giấm (cũng có thể không cần thêm dịch giống này quá trình lên men giấm vẫn xảy ra, song chậm và dễ nhiễm hơn).

-- Bịt miệng bình bằng vải màn để tránh ruồi giấm và để vào tủ ấm ở 30°C. Sau 5 -- 7 ngày, trên bề mặt của môi trường sẽ xuất hiện màng giấm trong, màu trắng nhạt, đó chính là các tế bào vi khuẩn axetic liên kết với nhau nhờ màng nhầy có bản chất gần giống như xelulôzơ.

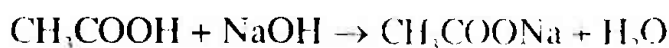
### 3.4. Kiểm tra kết quả

#### 3.4.1. Định tính axit axetic

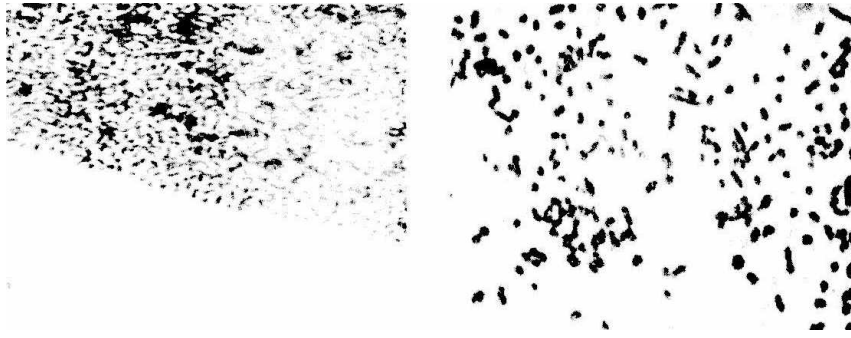
-- Phản ứng tạo etyl axetat: Lấy vào ống nghiệm 5ml dung dịch lên men → thêm 0,5 ml cồn 95% và 3ml H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> đặc → trộn đều → đun sôi trên ngọn đèn cồn. Phản ứng sẽ tạo thành etyl axetat có mùi dầu chuối.



-- Phản ứng tạo màu với clorua sắt: Lấy 3ml dịch lên men → thêm vài giọt dung dịch 5% FeCl<sub>3</sub> → lắc đều → đun sôi trên ngọn đèn cồn. Phản ứng sẽ tạo thành axetat sắt màu đỏ thẫm theo phương trình.



3.4.2. **Quan sát vi khuẩn axetic:** Lấy dịch lên men làm vết bôi → cố định vết bôi trên ngọn lửa đèn cồn → nhuộm đơn → Quan sát hệ kính dầu (hình 7.3).

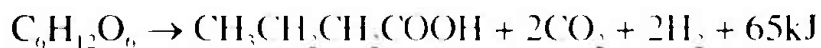


Hình 7.3. Vi sinh vật lên men axetic

## IV. XÁC ĐỊNH KHẢ NĂNG LÊN MEN BUTYRIC

### 4.1. Bản chất

Khi phân huỷ glucôzơ trong điều kiện kỵ khí, vi khuẩn sinh bào tử gây ra sự biến đổi như sau:



### 4.2. Vi khuẩn lên men

Các vi khuẩn tham gia chủ yếu vào quá trình lên men Butyric là nhóm *Clostridium* như: *C. pasteurianum*, *C. felsineum*, *C. butyricum*, *C. acetobutylicum*

### 4.3. Đặt thí nghiệm lên men Butyric

#### 4.3.1. Vật liệu, hoá chất:

Khoai tây,  $CaCO_3$ , dung dịch  $FeCl_3$  5%.

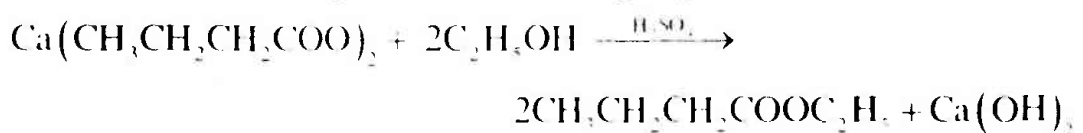
#### 4.3.2. Cách tiến hành

- Khoai tây rửa sạch không gọt vỏ, cắt thành mảnh nhỏ kích thước dài 4cm, bề ngang mỗi chiều 0,5cm.
- Cho các miếng khoai tây vào ống nghiệm đầy khoảng 1/3 thể tích ống nghiệm.
- Thêm vào ống nghiệm 0,1g  $CaCO_3$  để kiểm tra môi trường, đổ nước vừa ngập.
- Đun cách thủy ở nhiệt độ 80°C trong 15 – 20 phút, sau đó để ở nhiệt độ 28 – 30°C trong 3 – 4 ngày.

### 4.4. Phân tích kết quả thí nghiệm

#### 4.4.1. Phản ứng tạo thành etyl butyrat

Cho vào ống nghiệm 5ml dung dịch lên men đã trung hoà bằng  $Ca(OH)_2$ , thêm vào đó 0,5 ml rượu etylic 95% và 2ml  $H_2SO_4$  đậm đặc. Đun nóng và lắc nhẹ, ta ngửi thấy có mùi thơm của este etyl butyrat. Phản ứng xảy ra như sau.



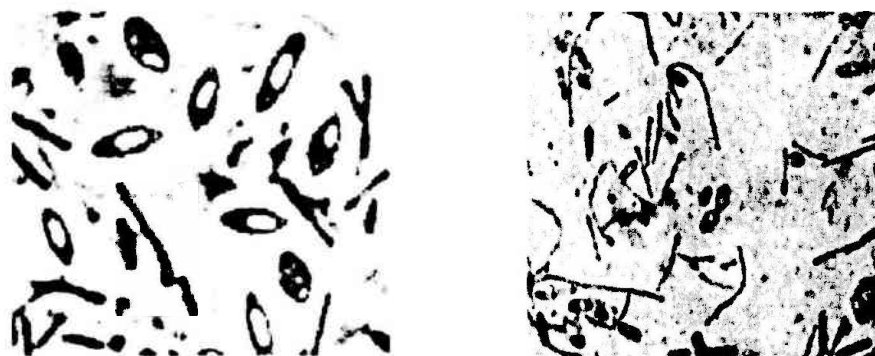
#### 4.4.2. Phản ứng tạo thành sắt butyrat

Cho vào ống nghiệm 5ml dung dịch lên men đã trung hoà bằng  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  thêm vào đó 2ml  $\text{FeCl}_3$  5%. Đun nóng trên ngọn lửa đèn cồn sẽ xuất hiện màu đỏ nâu của sắt butyrat. Phản ứng xảy ra như sau.



#### 4.4.3. Quan sát vi sinh vật

Làm tiêu bản nhuộm đơn bằng dung dịch lugol hoặc bằng dung dịch fuchsin.



Hình 7.4. Vi khuẩn lên men butyric (thí nghiệm với khoai tây – ảnh Trần Thị Thuý)

## V. SỰ PHÂN GIẢI XENLULOZO

### 5.1. Sự phân giải các chất xenlulozo kỵ khí

#### 5.1.1. Bản chất

Các vi khuẩn phân giải xenlulozo kỵ khí chỉ *Clostridium* trong đất, hoặc trong phân chuồng, phân xanh (*C. thermocellum*, *C. thermocelluloseum*, *C. cellulosaes omelianskii*) hoặc các vi khuẩn sống trong dạ cỏ của trâu bò (*Ruminococcus* và *Bacteroides*) phân huỷ xenlulozo thành axit axetic,  $\text{CO}_2$  (hoặc  $\text{CH}_4$ ) và  $\text{H}_2\text{O}$  như phương trình sau:



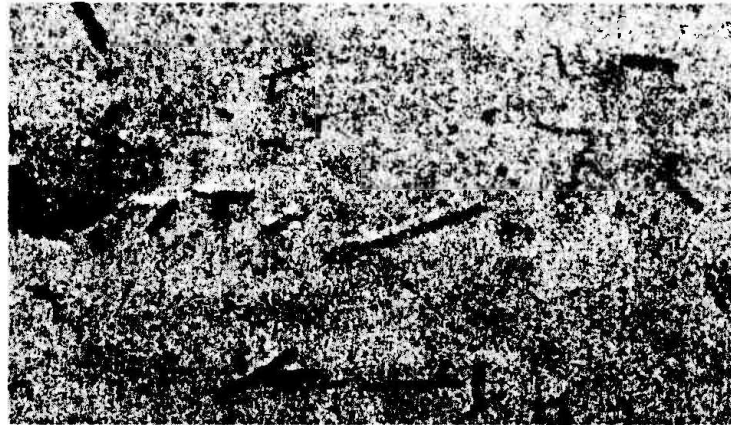
#### 5.1.2. Đặt thí nghiệm

Chuẩn bị môi trường phân giải kỵ khí: 300ml nước thịt Pepton; 700ml nước; 1g  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ; 1g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ; 0,5g  $\text{MgSO}_4$ ; 0,5g  $\text{NaCl}$ ; 2,0g  $\text{CaCO}_3$ ; 2 giọt dung dịch 0,1%  $\text{FeSO}_4$  không cần khử trùng.

Đổ môi trường đến 2/3 ống nghiệm, thêm 0,5 – 1g đất vườn, nhúng chìm vài dải giấy lọc trong môi trường. Đun sôi môi trường 5 – 10 phút, nút kín tạo điều kiện kỵ khí và để vào tủ ấm ở 30 – 35°C trong 2 – 3 tuần. Nếu có sự phân huỷ xenlulozo, giấy lọc sẽ hoá màu vàng, dần dần nát vụn và tan thành dịch lỏng.

### 5.1.3. Kiểm tra kết quả

Quan sát *Clostridium*: Làm vết bôi từ dịch phân huỷ → cố định tiêu bản → nhuộm đơn hoặc nhuộm bào tử (quan sát ở hệ kính dầu (hình 7.5)).

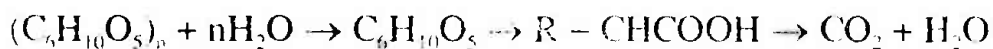


Hình 7.5. Vi khuẩn phân giải xenlulôzơ kị khí (ảnh Trần Thị Thuý)

## 5.2. Phân giải xenlulôzơ hiếu khí

### 5.2.1. Bản chất

Khi có  $O_2$ , xenlulôzơ bị VSV phân huỷ thành  $CO_2$  và  $H_2O$ .



### 5.2.2. Vi sinh vật phân giải xenlulôzơ hiếu khí

Nấm mốc (*Apergillus*, *Penicillium*, *Cladosporium*, *Botrytis*, *Fusarium*, *Trichoderma*...), vi khuẩn (*Bacillus*, *Cellivibrio*, *Cellfalicula*, *Cytophaga*), xạ khuẩn (*Streptomyces*...).

### 5.2.3. Đặt thí nghiệm

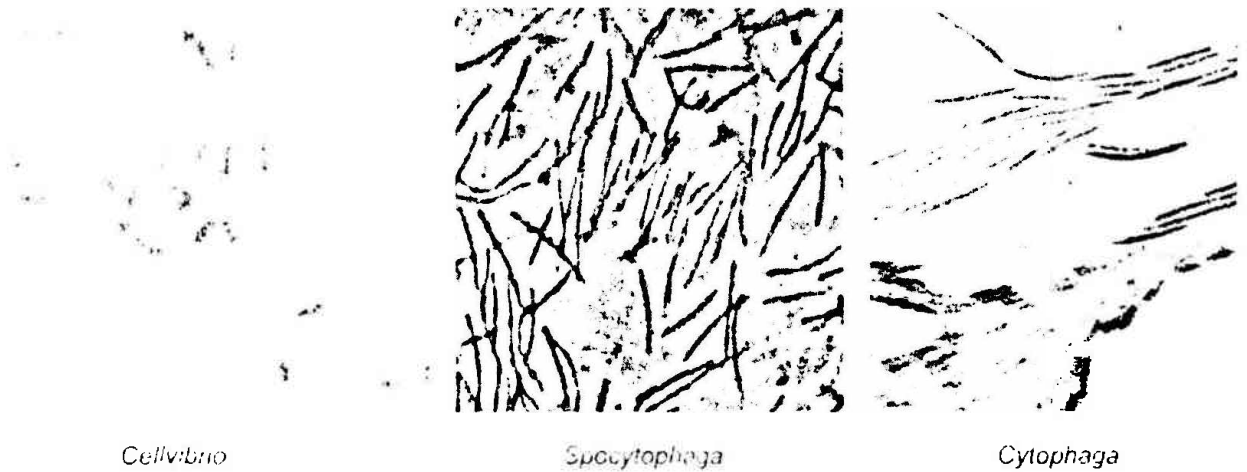
– Chuẩn bị môi trường Getchinson: 1g  $KH_2PO_4$ ; 0,1  $CaCl_2$ ; 3g  $MgSO_4$ ; 0,1g  $NaCl$ ; 0,01  $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ ; 2,5  $NaNO_3$ ; 1000ml nước; pH = 7,0 – 7,3. Không cần khử trùng.

– Đổ một ít môi trường Getchinson vào bình nón dung tích 150ml (dày khoảng 2cm), thêm 0,5g đất trồng và một mẫu phân nhỏ (bằng hạt đậu xanh). Gấp một miếng giấy lọc thành hình nón hoặc hình gập nếp đặt vào môi trường trong bình tam giác sao cho một phần giấy lọc chìm trong môi trường, phần còn lại nằm trong không khí, đẩy nút bông lên miệng bình và để ở  $20^{\circ}C - 25^{\circ}C$  trong 10 – 15 ngày. Sự phân huỷ giấy lọc sẽ xảy ra mạnh ở vùng tiếp xúc giữa không khí và môi trường. Có thể nhìn thấy các khuẩn lạc VSV mọc tại vùng này.

### 5.2.4. Kiểm tra kết quả

- Quan sát sự phân huỷ của giấy lọc tại vùng có các khuẩn lạc VSV.
- Làm tiêu bản VSV từ các khuẩn lạc mọc trên vùng giấy lọc và quan sát.





Hình 7.6. Một số vi khuẩn phân giải xenlulôzơ hiệu khí

## VI. KIỂM TRA ĐÁNH GIÁ KẾT QUẢ

Trong mỗi thí nghiệm sinh viên cần:

- Đặt thí nghiệm và tiến hành xét nghiệm định tính xem các quá trình đó có xảy ra hay không, ghi lại nhận xét, tìm lí do thành công, thất bại của thí nghiệm.
- Làm tiêu bản quan sát các loại VSV có trong các quá trình chuyển hoá, nhận mặt sơ bộ những VSV nào trong hỗn dịch VSV quan sát được là tác nhân thực hiện quá trình chuyển hoá đó.
- Trình bày lại kết quả thí nghiệm như bảng sau:

| Thí nghiệm | Phương pháp đặt TN | Phương pháp định tính | Kết quả định tính, nhận xét | Vẽ hình dạng các VSV đã quan sát |
|------------|--------------------|-----------------------|-----------------------------|----------------------------------|
|            |                    |                       |                             |                                  |

## VII. MỘT SỐ CÂU HỎI

1. Thường thì các tế bào *Sacharomyces* chỉ có khả năng lên men đường đơn hoặc đường đôi. Hãy giải thích tại sao nhân dân ta lại có thể sản xuất rượu từ tinh bột bằng bánh men dân gian?
2. Làm thế nào để có thể phân biệt nhanh hai quá trình lên men lactic đồng hình và lên men lactic dị hình trong điều kiện phòng thí nghiệm?
3. Người ta cho rằng, các VSV trong dạ cỏ của động vật nhai lại có vai trò sống còn với các động vật này. Hãy chứng minh.

## CHƯƠNG VI

# SỰ TUẦN HOÀN CỦA NITƠ TRONG TỰ NHIÊN NHỜ VI SINH VẬT

Vi sinh vật tham gia khép kín chu trình tuần hoàn của nguyên tố nitơ trong tự nhiên: Các VSV amôn hoá sẽ phân huỷ các hợp chất nitơ hữu cơ tạo ra  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{CO}_2$  và  $\text{H}_2\text{O}$ . Hợp chất  $\text{NH}_4^+$  này lại bị các VSV nitrat hoá chuyển thành  $\text{NO}_3^-$  và sau đó một phần  $\text{NO}_3^-$  lại bị các VSV phản nitrat hoá khử thành  $\text{N}_2$ . Nitơ phân tử lại được các nhóm vi khuẩn cố định đạm tạo thành  $\text{NH}_4^+$ . Các muối nitơ chứa  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_3^-$  do VSV tạo ra sẽ là nguồn nitơ cho thực vật và VSV sử dụng tạo thành các hợp chất nitơ hữu cơ. Chu trình nitơ được khép kín.

## Bài 8. SỰ CHUYỂN HOÁ CÁC HỢP CHẤT HỮU CƠ CHỨA NITƠ

### A. MỤC TIÊU

– Củng cố các kiến thức về một số quá trình chuyển hoá các hợp chất chứa nitơ của VSV.

– Sinh viên cần:

+ Nắm vững cơ chế của các quá trình VSV chuyển hoá nitơ từ hợp chất nitơ hữu cơ sang hợp chất nitơ vô cơ và  $\text{N}_2$ .

+ Tiến hành thành công các thí nghiệm về các quá trình chuyển hoá này.

+ Biết ứng dụng một số quá trình chuyển hoá này vào thực tiễn.

### B. NỘI DUNG

#### I. QUÁ TRÌNH AMÔN HOÁ

Bản chất của quá trình amôn hoá là sự tạo thành  $\text{NH}_4^+$  từ các hợp chất nitơ hữu cơ (protein, urê, axit nucleic...) dưới tác động của các VSV.

##### 1.1. Quá trình amôn hoá protein

###### 1.1.1. Bản chất

Quá trình amôn hoá protein hay còn gọi là quá trình khoáng hoá protein, quá trình thối rữa hay quá trình lên men thối. Quá trình amôn hoá xảy ra ở khắp mọi

nơi, bất cứ chỗ nào có các hợp chất protein trong điều kiện hiếu khí cũng như kỵ khí ở nhiệt độ tối ưu là 25 – 30°C.

Muốn phân giải protein, vi sinh vật phải tiết ra các protease ngoại bào làm chuyển hoá protein thành các phân tử nhỏ hơn tới các axit amin. Một phần các axit amin này được vi sinh vật sử dụng trong quá trình sinh tổng hợp protein của chúng, một phần khác được tiếp tục phân giải theo những con đường khác nhau để sinh ra  $\text{NH}_3$ ,  $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2\text{S}$  và nhiều sản phẩm trung gian khác.

Trong điều kiện thoáng khí thì protein được phân giải và quá trình oxi hoá thường được tiến hành đến sản phẩm cuối cùng là  $\text{NH}_3$ ,  $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{H}_2\text{S}$ . Ngược lại, trong điều kiện kỵ khí thì phân giải protein thường có sự tích lũy khá nhiều các sản phẩm trung gian như indol, skatol, cadaverin, acmatin, histamin.

### **1.1.2. Vi sinh vật phân giải protein**

Rất nhiều loại VSV khác nhau tham gia vào quá trình amôn hoá trong tự nhiên, đáng chú ý nhất là các loài sau đây:

- Vi khuẩn: *Bacillus* (*B. mycoides*, *B. mesentericus*, *B. subtilis*, *B. cereus*, *B. megatherium*...), *Pseudomonas* (*P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *P. putrificus*...), *Proteus vulgaris*, *E. coli*, *Clostridium* (*C. putrificum*, *C. sporogenes*, *C. welchii*...).
- Xạ khuẩn: *Streptomyces* (*S. griseus*, *S. rimosus*, *S. fracliae*)
- Nấm mốc: *Aspergillus* (*A. oryzae*, *A. flavus*, *A. terreicola*, *A. niger*, *A. saitsi*, *A. avamorii*...).

### **1.1.3. Đặt thí nghiệm**

#### *c. Vật liệu, hoá chất*

- Thịt, tôm, cá.
- Bình tam giác 50 – 100ml, giấy quỳ hồng.
- Dung dịch 10% chỉ axetat, dung dịch Nessler, dung dịch 5%  $\text{KNO}_3$ , dung dịch 30%  $\text{NaOH}$ , dung dịch 1%  $\text{CuSO}_4$ .
- Thuốc thử Ehrlich, axit axetic.

#### *d. Tiến hành thí nghiệm*

Lấy 3 – 5g thịt, cá (cắt nhỏ), cho vào bình tam giác, thêm 1g đất trồng và 20 – 30ml nước. Trong trường hợp muốn xác định khu hệ vi khuẩn có bào tử thì cần đun sôi nhẹ dung dịch lên trong vài phút. Để trên miệng bình các giấy chỉ thị sau để xác định một số sản phẩm phân huỷ:

- 1 dải giấy quỳ hồng hay giấy tím dung dịch Nessler để xác định sự có mặt của  $\text{NH}_3$ .
- 1 dải giấy tím dung dịch 10% chỉ axetat để xác định sự có mặt của  $\text{H}_2\text{S}$ .

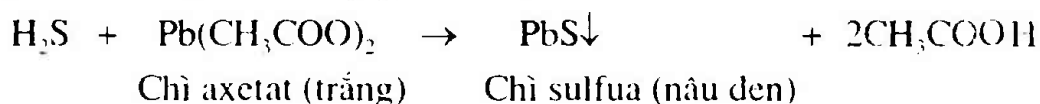
Đậy nút bông và để bình tam giác ở 28 – 35°C trong 4 – 7 ngày. Nếu muốn quan sát vi sinh vật kị khí thì miệng bình tam giác cần bọc kín bằng nilon hoặc gắn bằng parafin trên nút bông.

*c. Xác định các sản phẩm lên men*

– *Xác định sự có mặt của NH<sub>3</sub>*: Giấy quỳ hồng biến thành màu xanh, giấy tím dung dịch Nessler chuyển từ màu trắng sang màu vàng nếu có mặt của NH<sub>3</sub>.

– *Xác định sự có mặt của H<sub>2</sub>S*: Một số loại axit amin có chứa S như xistin, xistein, methionin... khi vi khuẩn phân giải sẽ giải phóng ra H<sub>2</sub>S làm giấy tím dung dịch chì axetat chuyển từ màu trắng sang màu đen của PbS.

– *Xác định các sản phẩm trung gian của protein*



– *Phản ứng kết tủa protein*: cho vào ống nghiệm 5ml dung dịch lên men thối, cho vào đó 5 – 6 giọt axit axetic. Đun sôi nhẹ ống nghiệm và để lắng sẽ có kết tủa màu trắng do protein bị kết tủa.

– *Phản ứng màu của protein*

Cho vào ống nghiệm 5ml dung dịch lên men thối, 1ml dung dịch 30% NaOH và 0,5ml dung dịch 1% CuSO<sub>4</sub>. Đun sôi nhẹ ống nghiệm. Khi có mặt protein thì dung dịch có màu xanh tím, nếu có Pepton dung dịch có màu hơi đỏ.

Hai phản ứng này nếu dương tính chứng tỏ trong môi trường lên men còn protein chưa phân giải hết.

– *Xác định khả năng tạo thành indol*:

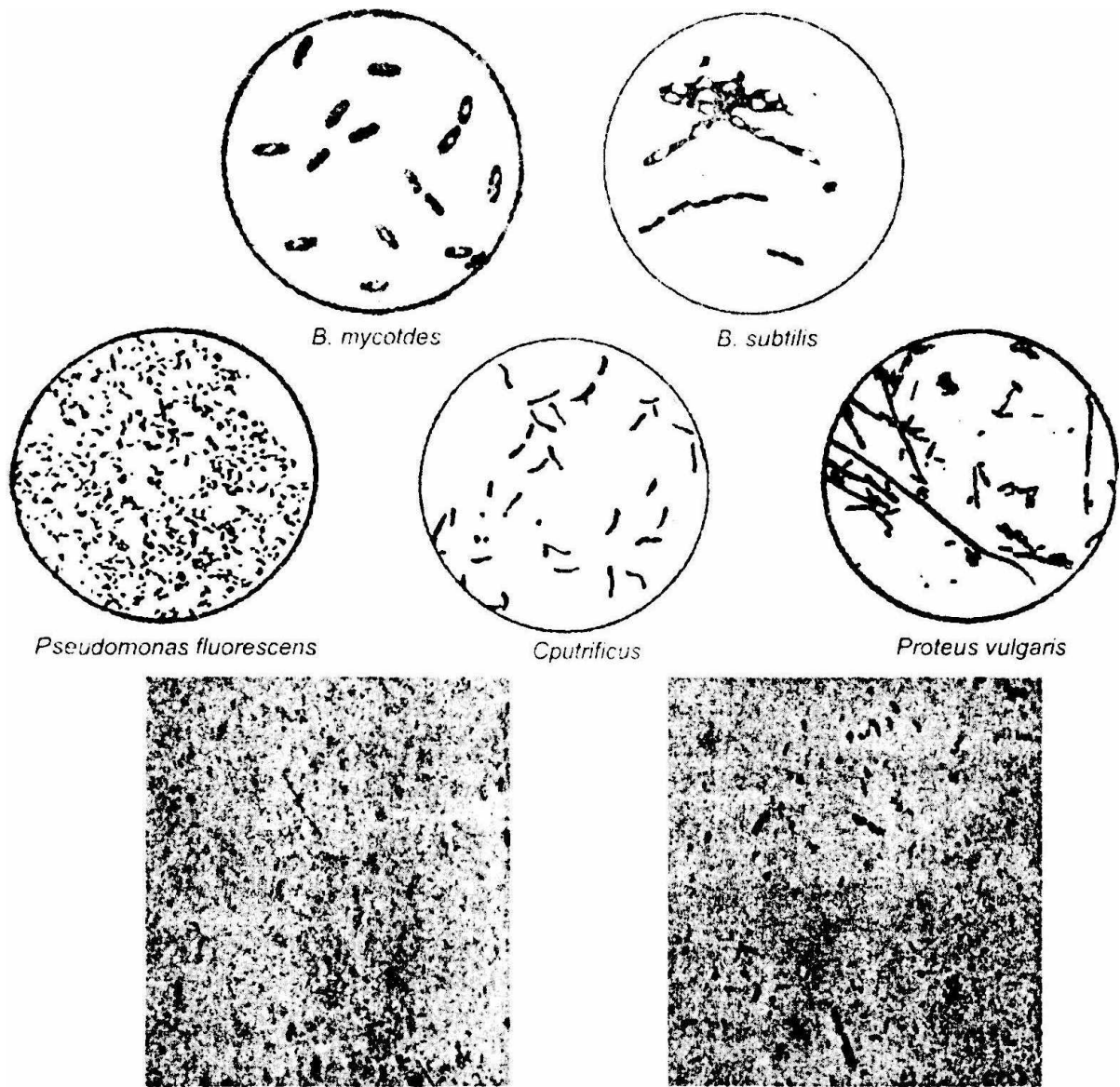
Tryptophan là một axit amin được sinh ra trong quá trình phân giải protein. Vi khuẩn *Proteus vulgaris* và một số vi khuẩn khác có khả năng sinh tryptophanase có thể phân giải tryptophan thành indol và skatol có mùi hôi thối.

+ Lấy 3 – 4ml dung dịch lên men sau 24 – 48 giờ cho vào ống nghiệm. Nhỏ vài giọt thuốc thử Ehrlich vào ống nghiệm. Nếu có indol sinh ra thì chỗ tiếp xúc bề mặt có màu đỏ của rosindol.

+ Cho vào ống nghiệm 5ml dung dịch lên men thối, 0,5ml dung dịch 10% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> và 0,5ml dung dịch 0,01% KNO<sub>2</sub>. Đun sôi nhẹ, nếu có indol thì dung dịch sẽ xuất hiện màu hồng của nitritindol.

– *Quan sát vi sinh vật*

Lấy dung dịch lên men thối 2 – 4 ngày (hoặc 6 – 7 ngày) làm tiêu bản nhuộm đơn hay nhuộm gram để xác định khu hệ vi sinh vật trong các thời điểm lên men khác nhau.



Hình 9.1. Một số vi khuẩn trong nước thịt lên men thối (ảnh Trần Thị Thủy)

## 1.2. Ứng dụng

### 1.2.1. Làm nước mắm

Nước mắm là sản phẩm phân giải protein của động vật dưới dạng nước. Thành phần chủ yếu của chúng là dung dịch các polipeptit, dipeptit và axit amin.

Nguyên liệu làm nước mắm có thể dùng bất kì nguồn động vật nào như cá, tôm, cua, thịt... Nhưng thông thường nhất là dùng cá, tôm.

Cách làm đơn giản và ở quy mô nhỏ như sau:

Có 2 giai đoạn:

- *Giai đoạn 1* (Giai đoạn làm thối rửa protein): Cá, tôm để nguyên con, rửa sạch cho vào thùng gỗ, vại sành, chum. Thường người ta trộn lẫn thính, mốc tương

hoặc bánh men rượu, củ riềng giã nhỏ với tỉ lệ 2 – 5%, rắc một ít muối lên trên. Để bình ở nơi có nắng 30 – 45°C trong 4 – 5 ngày. Lúc này hệ enzyme proteaza của mồi tương, men rượu và hệ vi khuẩn trong ruột tôm, cá sẽ làm thối rữa protein tạo nên mùi thối của indol, skatol. Trong công nghệ hiện đại người ta thường chủ động đưa enzym protease vào để phân giải protein cho nhanh.

– *Giai đoạn 2* (Giai đoạn làm chín (thơm) nước mắm): Cho muối ăn đạt tỉ lệ 20 – 25% so với lượng tôm, cá. Đậy kín hoặc dùng vải vữa trát kín bình và để bình phơi ngoài nắng từ 3 – 6 tháng. Lúc này thịt, cá tiếp tục bị phân giải tạo nên các este thơm làm cho các loại nước mắm có những hương vị riêng. Lọc riêng ta được nước mắm chiết (chắt) có màu vàng sẫm, trong. Có thể dùng bình có vòi ở đáy mà trên đó có một lớp trấu, cát, sỏi sạch trước khi cho tôm, cá vào. Sau 3 – 6 tháng tháo vòi tạ được nước mắm chiết đã được lọc trong.

Sau khi lấy nước mắm chiết còn lại là chượp cá. Người ta cho nước muối có tỉ lệ 20 – 25% đun lẫn với chúng với tỉ lệ 1 phần chượp và 5, 7, 10 phần nước muối tùy chất lượng chượp sao cho nước mắm có độ đậm từ 10 – 25%. Có thể tạo màu nước mắm bằng lá chuối khô rang cháy hoặc kẹo đắng.

Có thể làm nước mắm cá lên men thối tự nhiên bằng cách xếp một lượt cá, một lượt muối (tỉ lệ 3 cá/1 muối) và phơi nắng 2 – 4 tháng, sau đó chiết bằng nước như loại nước mắm Phan Thiết, Phú Quốc...

### **1.2.2. Làm mắm tôm**

– *Mắm tôm đỏ*: Tôm con (tép) giã dập, cho một ít mồi tương hoặc men rượu, thính theo tỉ lệ 20%, muối theo tỉ lệ 15 – 20%. Để bình nơi ấm 30 – 40°C. Sau 7 – 10 ngày tôm hoá đỏ, có mùi thơm. Có thể dùng mắm ăn sống hoặc chiên với mỡ, hành, gừng, cà chua.

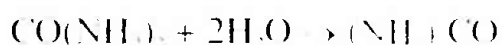
– *Mắm tôm xanh*: Cũng làm tương tự như trên nhưng lúc đầu cho một ít muối. Sau 5 – 7 ngày mới cho thêm muối tỉ lệ 10 – 15%. Dạng này chỉ để ăn sống hoặc làm chượp nấu nước mắm.

## **1.3. Quá trình amôn hoá urê**

### **1.3.1. Bản chất**

Urê là hợp chất hữu cơ chứa nitơ, có trong nước giải của người và động vật, là sản phẩm cuối cùng của quá trình chuyển hoá các hợp chất chứa nitơ. Urê còn được tổng hợp ở các nhà máy phân đạm hoá học. Urê có chứa 47% nitơ, nhưng nếu không được vi sinh vật phân giải thành  $\text{NH}_3$  thì cây trồng không sử dụng được.

Quá trình phân giải urê xảy ra một cách đơn giản với sự xúc tác của urease của vi sinh vật.



$(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$  ít bền vững do đó dễ dàng phân giải tiếp



### 1.3.2. Vi sinh vật phân giải ure

Vi khuẩn phân giải urê thường là vi khuẩn hiếu khí, số ít là kỵ khí, có thể sinh trưởng mạnh ở pH trung tính hoặc hơi kiềm (pH = 7 – 8), chúng phân bố khá rộng rãi trong đất. Những loài đáng chú ý là:

- Cầu khuẩn: *Planosarcina ureae*, *Micrococcus ureae*, *Sarcina hansenii*
- Trục khuẩn: *Bacillus* (*B. pasteurii* hay *Urobacillus pasteurii*, *B. freidereichii*, *B. hesmogenes*, *B. psychroaereticus*, *B. amylovorum*,...), *Pseudobacterium ureoliticum*, *Chromobacterium prodigiosum*, *Proteus vulgaris*...
- Nhiều loài nấm mốc và xạ khuẩn sống trong đất cũng có khả năng phân giải urê mạnh mẽ.

### 1.3.3. Đặt thí nghiệm

#### 1.3.3.1. Vật liệu, hoá chất

- Nước tiểu, hoặc môi trường Rubenchich, hoặc môi trường Zenghen
- Giấy thấm dung dịch Nessler, giấy quỳ hồng
- Ống nghiệm, bình tam giác 50 – 100ml

#### 1.3.3.2. Tiến hành thí nghiệm

- Lấy 30ml dung dịch
- Môi trường nước thịt + Peptôn + urê 5%
- hoặc
- Môi trường Kalitactrat chứa 5% urê
  - Môi trường Rubenchich chứa 5% urê
  - Môi trường nước tiểu

Cho vào bình tam giác (hay ống nghiệm) 10ml môi trường lên men. Thêm vào đó ít đất trồng. Đặt một dải quỳ hồng hay giấy thấm dung dịch Nessler trên miệng bình (hay ống nghiệm) và dây nút bông lã. Để ở nhiệt độ 25 – 30 °C trong 3 – 5 ngày.

#### 1.3.3.3. Xét nghiệm kết quả

##### a. Xác định sự có mặt của $\text{NH}_3$ và $\text{NH}_4^+$

Như quá trình amôn hoá protein.

### b. Quan sát vi sinh vật

Bằng thao tác vô trùng, lấy một giọt dung dịch phân hay làm tiêu bản nấm đơn, soi kính dầu để quan sát vi sinh vật:

- *Micrococcus ureae*: đơn cầu khuẩn hay song cầu khuẩn.
- *Urobacillus pasteurii*: tế bào lớn, chu mao, nội bào tử.
- *Planosarcina ureae*: 4 – 8 tế bào hình cầu.

### 1.3.4. Ứng dụng

- Kết hợp ủ với phân chuồng (xem phân nitrat hoá)
- Nuôi gia súc, gia cầm ăn cỏ, rơm:

Trong dạ cỏ của gia súc có sừng và manh tràng của thỏ, ngỗng, gà tây... thường có vi khuẩn phân giải xenlulôzơ, xylan, pectin... chúng phát triển với số lượng rất lớn để phân giải các chất trên.

Để cung cấp thêm nguồn đạm cho vi khuẩn phát triển, có thể trộn thêm dung dịch urê vào cỏ, rơm, thức ăn ủ xanh... với tỉ lệ 1 – 3% trước khi cho gia súc, gia cầm ăn. Trong quá trình tiêu hoá, nhờ có vi khuẩn phân giải nên tạo thêm một lượng protein và axit amin không thay thế cho gia súc. Mặt khác, khi vi khuẩn phát triển, các cơ chất xenlulôzơ, xylan, pectin... được phân giải nhanh chóng thành các axit hữu cơ cần thiết cho hoạt động sống của cơ thể các động vật ăn cỏ.

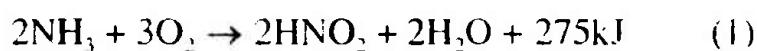
## II. QUÁ TRÌNH NITRAT HÓA

### 2.1. Bản chất

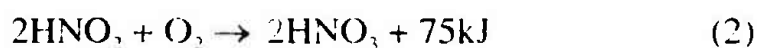
Trong thiên nhiên,  $\text{NH}_3$  hoặc  $\text{NH}_4^+$  tạo ra trong quá trình amôn hoá, trong điều kiện hiếu khí chúng nhanh chóng chuyển thành nitrat. Phân đạm ( $\text{NH}_4\text{SO}_4$ ,  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ,  $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$  sau khi bón vào ruộng nếu môi trường thoáng khí cũng chuyển thành nitrat dưới tác dụng của vi khuẩn nitrat tự dưỡng hoặc một số vi sinh vật dị dưỡng.

Quá trình nitrat hoá xảy ra theo hai giai đoạn và do hai nhóm vi khuẩn khác nhau thực hiện:

- Giai đoạn nitrit hóa do nhóm vi khuẩn *Nitrosomonas*



- Giai đoạn nitrat hoá do nhóm vi khuẩn *Nitrobacter*





## 2.2. Vật liệu, hóa chất

- Bàn sứ lõm, ống nghiệm, bình tam giác 50 – 100ml.
- Dung dịch thuốc thử Trommsdorf, Griss I + II, Diphenylamin.
- Dung dịch 33%  $H_2SO_4$ , pyrogallol.
- Môi trường Vinogradski 1 (nitrit hoá) và Vinogradski 2 (nitrat hoá).

## 2.3. Tiến hành thí nghiệm

- Lấy 5ml môi trường nitrit hoá 1 vào ống nghiệm 1
- Lấy 5ml môi trường nitrit hoá 2 vào ống nghiệm 2 hoặc lấy 10 – 20ml môi trường vào bình tam giác 50 – 100ml.
- Thêm 0,1g đất trồng vào mỗi ống nghiệm hay bình tam giác (cho nguồn vi sinh vật), để ở tủ ấm 28 – 30°C trong thời gian 5 – 7 ngày.

## 2.4. Kiểm tra kết quả

### 2.4.1. Định tính

#### a. Giai đoạn nitrit hoá

+ Phản ứng với dung dịch Trommsdorf: Dùng pipet lấy lên bản sứ lõm 3 giọt dung dịch Trommsdorf, 1 giọt dung dịch 33%  $H_2SO_4$ , thêm một giọt canh trường lên men từ bình nitrit hoá, khuấy đều bằng đũa thuỷ tinh (không dùng que cấy). Nếu có mặt  $NO_2^-$ , dung dịch sẽ chuyển màu đen.

+ Phản ứng tạo màu với dung dịch Griss I + II: Nhỏ 1 – 2 giọt dịch nuôi cấy lên bản sứ lõm, thêm một giọt dung dịch Griss I và 1 giọt dung dịch Griss II. Nếu có mặt nitrit, dịch nuôi cấy có màu đỏ pháo

+ Phản ứng với dung dịch Diphenylamin: Trên bản sứ lõm cho 1 – 2 giọt dịch nuôi cấy, thêm 1 – 2 giọt Diphenylamin. Nếu có mặt  $NO_2^-$  thì dung dịch có màu trắng hoặc xanh nhạt.

#### b. Giai đoạn nitrat hoá

Cũng làm tương tự như giai đoạn nitrit: Nếu  $NO_2^-$  trong môi trường lên men đã chuyển hết thành  $NO_3^-$  thì khi phản ứng với thuốc thử:

- + Trommsdorf: Không có màu đen
- + Griss I + II: Không có màu đỏ
- + Diphenylamin: Có màu xanh lam

Lấy 5ml dung dịch lên men nitrat, thêm 0.1g pyrôgalol, lắc nhẹ, dùng pipet (nhúng đầu pipet vào dung dịch) thêm 1ml H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> đậm đặc và thêm 0.5g NaCl. Đun sôi nhẹ. Nếu có mặt NO<sub>3</sub> sẽ thấy xuất hiện một vòng đỏ tía.

#### 2.4.2. Quan sát vi sinh vật

Lấy một giọt dung dịch nuôi cấy làm tiêu bản, nhuộm đơn, soi kính dầu, quan sát vi sinh vật.

##### a. Giai đoạn nitrit hoá:

– *Nitrosomonas*: vi khuẩn hình bầu dục nhỏ bé (0.4 – 0.6) × (1 – 0.8)µm, không sinh bào tử, có tiêm mao khá dài, có khả năng tích lũy nhiều chất nhày quanh tế bào, chúng thuộc loại tự dưỡng bắt buộc.

– *N. europaea*: gram âm, ít di động, chịu được nhiệt độ 40°C trong 5 phút và chịu được NaCl 3%; *N. javanensis*: tế bào nhỏ hơn, có tiêm mao dài hơn loài nói trên; *N. oligoabogenes*: gram dương, hay di động, kém chịu nhiệt và chịu mặn, bị chết ở môi trường có nồng độ NaCl từ 1,4% trở lên.

– *Nitrosococcus*: tế bào hình cầu, gram âm, đường kính 1.5 – 2µm. Chưa phân lập được thuần khiết.

– *Nitrospira*: tế bào hình gậy dài và hơi xoắn trông tương tự như *Leptospira*. Có thể dài tới 15 – 20µm, gram âm. Trong môi trường nuôi cấy lâu chúng có thể bị cắt nhỏ ra thành những hạt hình cầu.

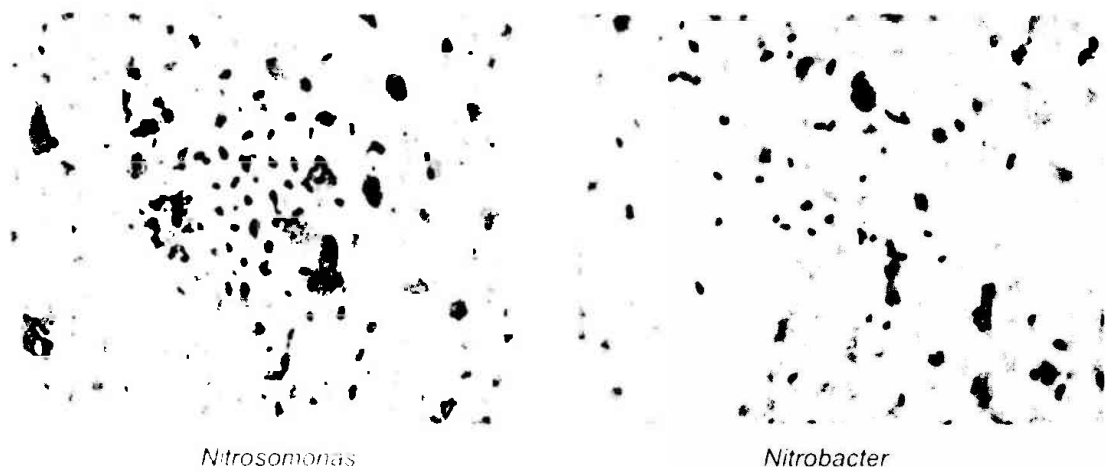
– *Nitrosocystis*: trên bản silicagen tạo thành những khuẩn lạc lồi và lớn.

– *Nitrosolobus*: đây là giống mới được miêu tả gần đây, tế bào có hình nhiều thùy (lobular).

##### b. Giai đoạn nitrat hoá

Loại vi khuẩn nitrat hoá điển hình là các loài thuộc giống *Nitrobacter*. Chúng là những tế bào hình bầu dục, kích thước khoảng (0.8×1)µm, gram âm, không sinh bào tử, trên bản silicagen hoặc trên thạch (chứa nitrit) tạo thành những khuẩn lạc trong suốt và rất nhỏ bé (đường kính khoảng 0,2mm). Chúng thuộc loại tự dưỡng bắt buộc và không sinh bào tử. Hai loài *Nitrobacter* chủ yếu là *N. vinogradskii* (không di động) và *N. agilis* (di động).

Vi khuẩn nitrat hoá còn bao gồm cả một số ít các giống khác như *Nitrococcus*: cầu khuẩn, gram âm, có nhiều tiêm mao, loài điển hình là *Nitrococcus mobilis*; *Nitrocystis*: khuẩn lạc lồi, đường kính khoảng 3mm, tạo thành một khối chất nhày; *Nitrospira*: hình que mảnh, gram âm, không di động, chưa có màng điển hình, loài điển hình là *Nitrospira gracilis*.



Hình 9.3. Vi khuẩn Nitrit hoá và Nitrat hoá (ảnh Trần Thị Thúy)

## 2.5. Ứng dụng

Phân của gia súc có sừng có một lượng lớn xenlulôzơ, xylan, pectin... chưa được phân huỷ, chúng cần được chuyển hoá thành các axit mùn dưới tác dụng của các VSV. Vì vậy, trong quá trình ủ phân chuồng người ta thường bổ sung 1 – 3% ure và 3 – 5% phân lân để làm phát triển khu hệ VSV phân bón. Để làm giảm quá trình phân giải hiệu khí của phân chuồng, giảm sự mất đạm và nâng cao chất lượng phân, người ta có thể tưới nước tiểu vào phân bón cho ẩm đều ở giai đoạn đầu của quá trình ủ phân chuồng.

## III. QUÁ TRÌNH PHÂN NITRAT HOÁ

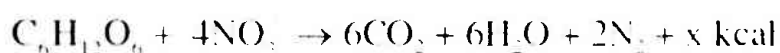
### 3.1. Bản chất

Trong đất, trong nước hoặc trong phân chuồng thì nitrat và nitrit có khả năng bị khử thành  $N_2$ . Quá trình này gọi là quá trình phân nitrat hoá. Đây là quá trình có hại vì nó gây tổn thất nhiều thức ăn đạm của cây trồng. Có quá trình phân nitrat hoá học và quá trình phân nitrat hoá sinh học.

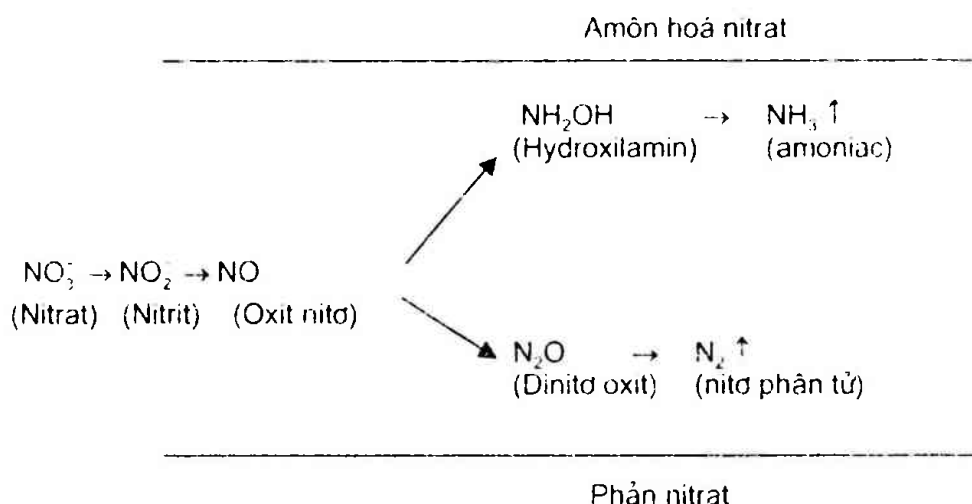
– Quá trình phân nitrat hoá học thường xảy ra trong các môi trường thiên nhiên có pH thấp hơn 5.5



– Quá trình phân nitrat hoá sinh học xảy ra trong điều kiện kỵ khí, một số VSV phân nitrat hoá dùng nitrat làm chất nhận  $N_2$ , khử nitrat đến nitơ phân tử ( $N_2$ ).



Hai quá trình phân nitrat hóa và amôn hoá nitrat có chung giai đoạn đầu tiên:



## 3.2. Đặt thí nghiệm

### 3.2.1. Vật liệu, hoá chất

- Bàn sứ lôm, ống nghiệm.
- Giấy quỳ hồng, giấy tẩm dung dịch Nessler.
- Các dung dịch nuôi cấy vi khuẩn phản nitrat hoá: nitrat – đường kính, Giltai, Beijerink.

### 3.2.2. Tiến hành thí nghiệm

Cho vào ống nghiệm 10 – 15ml môi trường nuôi cấy vi khuẩn phản nitrat. Để nuôi cấy VK phản nitrat hoá có thể sử dụng môi trường nitrat – đường kính, nitrat – Peptôn, Giltai... Nuôi cấy vi khuẩn lưu huỳnh có khả năng phản nitrat hoá sử dụng môi trường Beijerink. Đun sôi nhẹ, để nguội và cho một ít đất vào (cho nguồn VSV).

- Để xác định sự có mặt  $\text{NH}_3$ : Đặt trên miệng bình 1 dải giấy quỳ hồng và một dải giấy tẩm dung dịch Nessler

- Để tạo môi trường yếm khí có thể cho 1 lớp dầu vazolin, parafin lên bề mặt môi trường. Sau khi đầy nút bông dùng nilon và dây cao su bọc kín miệng ống nghiệm lại. Nuôi cấy ở 30 – 35°C trong 5 – 6 ngày.

### 3.2.3. Xác định các sản phẩm lên men

- Xác định sự có mặt của  $\text{NH}_3$ : Nếu giấy quỳ hồng biến thành màu xanh, giấy tẩm dung dịch Nessler màu trắng chuyển sang màu vàng chứng tỏ có  $\text{NH}_3$  bay ra.

- Xác định sự có mặt của  $\text{NH}_4^+$ : Nhỏ vào bản sứ lôm một giọt dung dịch lên men, thêm một giọt dung dịch Nessler. Nếu có mặt  $\text{NH}_4^+$  thì dung dịch chuyển từ màu vàng trong sang màu vàng sẫm.

- Xác định sự có mặt của  $N_2$ : Quan sát ống nghiệm lên men trong 2 – 4 ngày đm, có sự sủi bọt ( $CO_2$ ,  $N_2$ ).

- Kiểm tra xem dung dịch có tạo thành  $NO_2$  hay không bằng thuốc thử Griss, có khử hết  $NO_2$  hay không bằng thuốc thử Diphenylamin (xem phần nitrat hoá).

#### 3.2.4. Quan sát vi sinh vật

Lấy dịch nuôi cấy làm tiêu bản nhuộm đơn, soi kính dầu và quan sát VSV. Vi khuẩn phản nitrat hoá thường là vi khuẩn kỵ khí không bắt buộc, chúng bao gồm nhiều loài trong các giống *Pseudomonas*: hình gậy, gram âm, không sinh bào tử, có tiên mao o đình như *P. fluorescens*, *P. denitrificans*, *P. aeruginosa*, *P. stutzeri*...; Bacterium như *B. denitrificans*, *B. stutzeri*; *Achromobacter stutzeri*; *Bacillus licheniformis*...

Một số vi khuẩn lưu huỳnh thực hiện quá trình phản nitrat hoá như *Thiobacterium denitrificans*, *Sulfomonas denitrificans*...



*Pseudomonas* (nguồn Internet)



*Achromobacter* (nguồn Internet)

Hình 9.3. Vi khuẩn phản Nitrat hoá

### 3.3. Ứng dụng

Bón phân chuồng vào đất nhằm cung cấp một lượng đạm dễ tiêu cho cây trồng dưới dạng  $NH_4^+$ ,  $NO_3^-$  và một lượng axit mùn làm cho đất có cấu tượng tốt.

- Để chống quá trình phản nitrat hoá (mất đạm) của phân chuồng, người ta cần thiết phải đưa phân bón xuống tầng khử của đất (tầng để cày) bằng cách: khi sạ cày lật đất, rắc phân chuồng + vôi + phân lân vào ruộng rồi tiến hành cày lật đất ngay, sau đó mới tháo nước vào ruộng và cày bừa tiếp.

- Khi bón các loại phân đạm hoá học như  $(NH_4)_2SO_4$ , urê vào ruộng để chống quá trình phản nitrat hoá gây mất đạm, người ta thường rải phân vào buổi chiều tối, sau đó phải làm cỏ, sục bùn ngay... để phân đạm được đưa ngay xuống tầng sâu của đất (tầng để cày). Không có không khí,  $NH_4^+$  không chuyển hoá thành  $NO_3^-$  và quá trình phản nitrat hoá không xảy ra.

- Cách khác, người ta trộn phân hoá học vào bùn, vè thành viên nhỏ, dúi vào gốc lúa, gốc cây...

## Bài 9. VI SINH VẬT CỐ ĐỊNH NITƠ (N<sub>2</sub>)

Thực vật thường xuyên phải chịu sự thiếu hụt nitơ. Tuy nhiên, nitơ lại thường xuyên được bổ sung cho đất nhờ quá trình cố định nitơ trong không khí nhờ VSV như vi khuẩn, nấm sợi sống cộng sinh với thực vật hoặc sống tự do trong đất.

### A. MỤC TIÊU

- Củng cố các kiến thức về quá trình chuyển hoá N<sub>2</sub> tự do thành các hợp chất chứa nitơ của VSV.
- Sinh viên cần:
  - + Nắm vững cơ chế của các quá trình VSV chuyển hoá nitơ tự do không có giá trị dinh dưỡng sang hợp chất nitơ vô cơ liên kết.
  - + Tiến hành thành công các thí nghiệm về các quá trình chuyển hoá này.
  - + Biết ứng dụng quá trình chuyển hoá này vào thực tiễn.

### B. NỘI DUNG

#### I. VI KHUẨN CỐ ĐỊNH NITƠ SỐNG TỰ DO

##### 1.1. Vi khuẩn

Trong số những VSV sống tự do trong đất thì những vi khuẩn thuộc chi *Azotobacter* và vi khuẩn *Clostridium pasteurianum* có khả năng cố định nitơ cao nhất.

##### 1.1.1. Nhóm vi khuẩn hiếu khí

– *Azotobacter* là vi khuẩn gram âm hiếu khí bắt buộc, dùng nitơ phân tử của không khí làm nguồn nitơ còn nguồn cacbon là những axit hữu cơ, các glucit và các chức rượu. *Azotobacter* nhạy cảm với độ ẩm của đất và hàm lượng của những nguyên tố khoáng trong đó có P, K, Mo, B... Những loài *Azotobacter* có thể cố định được 15 – 20mg nitơ khi sử dụng hết 1g chất hữu cơ ở pH = 5,5 – 7,2. Trong chi *Azotobacter* thì các loài sau đây là phổ biến nhất: *A. chroococcum*, *A. agile*, *A. vinelandii*, *A. indicum*. Trong chu trình sống, *Azotobacter* thường tạo bào tử nghỉ (Cyst).

– *Azotobacter chroococcum*: Trong dịch nuôi mới cấy thì tế bào có dạng hình que, chuyển động, có kích thước từ 3 – 7µm. Trong canh trường cũ thì có hình cầu, kết thành từng đôi hay thành từng khối. Thường thì chúng được bao bọc vỏ

nhảy. Trong tế bào thì có nhiều hạt volutin. Trên môi trường đặc thì có khuẩn lạc nhảy, không màu hay có màu từ nâu đen đến đen. Sắc tố không khuếch tán vào môi trường.

- *Azotobacter agile* (tên khác: *A. agilis*, *Azotomonas agile*): Tế bào hình cầu hay ovan, đường kính 3 – 5µm, đứng riêng rẽ từng tế bào hay kết thành từng đôi khuẩn lạc bằng phẳng, sáng. Chúng tiết vào môi trường sắc tố màu vàng hay màu xanh.

Ngoài *Azotobacter*, một số vi khuẩn hiếu khí khác như *Azomonas* (tương tự như *Azotobacter* song không có bào tử nghỉ), *Derxia* và *Beijerinckia* cũng có khả năng cố định nitơ.

### 1.1.2. Nhóm vi khuẩn kỵ khí

*Clostridium pasteurianum* dùng những glucit và axit hữu cơ làm nguồn cacbon. Chúng có thể cố định được 10 – 12mg ở pH = 4,7 – 8,5 khi sử dụng hết 1g chất hữu cơ.

*Clostridium pasteurianum* là vi khuẩn kỵ khí, tế bào hình que, chuyển động và có kích thước 3 – 7µm. Đứng riêng rẽ hay kết hợp thành đôi hoặc thành chuỗi ngắn. Bào tử có hình ovan nằm ở giữa tế bào làm cho tế bào mang bào tử có hình thoi. Kích thước của bào tử khoảng (1,3 – 1,6)µm. Khuẩn lạc trắng, phẳng và sáng...

## 1.2. Vật liệu, hoá chất

- Ống nghiệm, bình tam giác 50 – 100ml, hộp lồng  $\Phi = 10\text{cm}$ .
- Môi trường Ashby, Fedorop, Vinogradski.
- Dung dịch 10%  $\text{FeCl}_3$ .

## 1.3. Tiến hành thí nghiệm

### 1.3.1. Môi trường dịch thể

Phân môi trường Ashby hoặc Fedorop vào bình tam giác thành lớp dày 1.5cm. Đun sôi để nguội, thêm một ít đất trồng vào (đưa nguồn vi sinh vật)

Gấp xếp một miếng giấy lọc thành hình nón và đặt vào môi trường. Để bình tam giác vào tủ ấm 28 – 30°C, sau 5 – 7 ngày sẽ xuất hiện vầng nhảy trên bề mặt môi trường, trên thành bình và trên bề mặt giấy lọc, đó chính là vi khuẩn hiếu khí *Azotobacter*, còn ở đáy bình là *Clostridium* kỵ khí.

Để phân lập *C. pasteurianum*, ngoài môi trường Fedorop có thể sử dụng môi trường Vinogradski.

Việc phân lập thuần khiết *C. pasteurianum* không phải là việc đơn giản. Vi khuẩn này thường sống cộng sinh chặt chẽ với loại trực khuẩn hiếu khí có bào tử *Bacillus closteroides*. *C. pasteurianum* cung cấp thức ăn đậm cho *B. closteroides*, ngược lại, vi khuẩn này lấy hết oxy trong môi trường và cung cấp cho *C. pasteurianum* một số vitamin cần thiết.

Người ta có thể cho vào môi trường Vinogradski 1ml dung dịch hỗn hợp nguyên tố vi lượng (xem môi trường Fedorop), 1g axit ascorbic và 1ml dịch tự phân nấm men. Hoặc cho thêm vào môi trường 1g E.D.T.A (Trilon B). Các chất bổ sung này có thể làm hạn chế sự phát triển của các loài vi khuẩn thường sống kèm với *C. pasteurianum*.

Khi *C. pasteurianum* xuất hiện bào tử, lấy một ít cặn  $\text{CaCO}_3$  ở đáy ống nghiệm, đáy bình tam giác (nơi có nhiều *C. pasteurianum*) cấy lên bề mặt thạch đĩa sau đó đưa vào điều kiện kỵ khí để vi khuẩn phát triển thành khuẩn lạc trên mặt thạch, cũng có thể cấy vào thạch khi sắp sửa đông (nhiệt độ khoảng  $45^\circ\text{C}$ ), nuôi cấy ở điều kiện kỵ khí, khuẩn lạc sẽ xuất hiện trong lớp thạch sau vài ngày nuôi cấy.

### **1.3.2. Môi trường đặc**

Cấy các cục đất trồng lên môi trường thạch đĩa Ashby, Fedorop đặc. Để hộp lỏng ở  $28 - 30^\circ\text{C}$  trong 5 – 7 ngày. Xung quanh các cục đất sẽ xuất hiện các đám vi khuẩn màu trắng ngà, nhầy nhớt, có sắc tố nâu, đó chính là các vi khuẩn hiếu khí cố định nitơ.

## **1.4. Xét nghiệm kết quả**

### **1.4.1. Xác định các sản phẩm lên men trên môi trường dịch thể**

Sau 5 – 7 ngày, trên bề mặt môi trường hình thành màng của *Azotobacter* có màu nâu. Dịch ở trong bình nổi bọt và bốc mùi của axit butyric. Sự hình thành axit butyric trong môi trường có thể nhận biết bằng phản ứng:

- Lấy 5ml dịch nuôi cấy cho vào ống nghiệm.
- Cho 2ml dung dịch 10%  $\text{FeCl}_3$ .
- Đun sôi nhẹ ống nghiệm, để nguội, dung dịch trong ống nghiệm có màu nâu đỏ.

Cũng có thể làm phản ứng ester (xem phân lên men Butyric).

### **1.4.2. Quan sát vi sinh vật**

– Để nghiên cứu hình thái vi khuẩn trên môi trường dịch thể cần làm 2 tiêu bản. Một tiêu bản từ màng bề mặt môi trường để quan sát *Azotobacter*. Tiêu bản này được nhuộm màu như nhuộm vỏ nhày. Tiêu bản thứ 2 được làm từ dịch nuôi



cây, trong bình nghiên cứu hoặc trong ống thạch đựng, thạch đĩa để nghiên cứu *C. pasteurianum*. Tiêu bản được nhuộm bằng dung dịch lugol hay tím gentian.

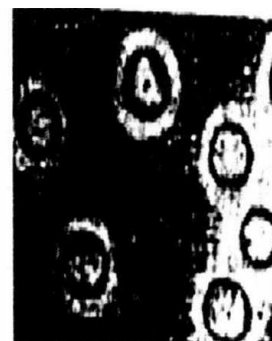
- Trên môi trường đặc chọn cho khuẩn lạc màu trắng ngà, nhầy nhớt, có sắc tố nâu làm tiêu bản, nhuộm đơn, đỏ fuesin hoặc tím gentian... sẽ thấy vi khuẩn có màng nhầy lớn, đơn, song hoặc tứ cầu khuẩn của *Azotobacter*.



*A. Chroococcum*



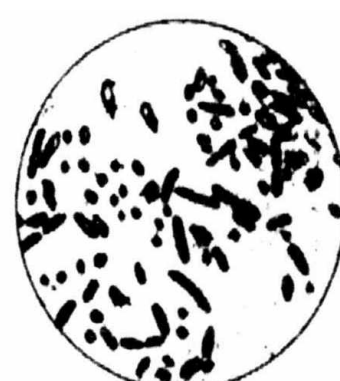
*A. Vinelandii*



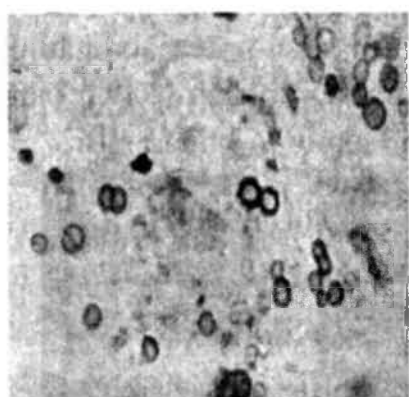
*Derxta gumosa*



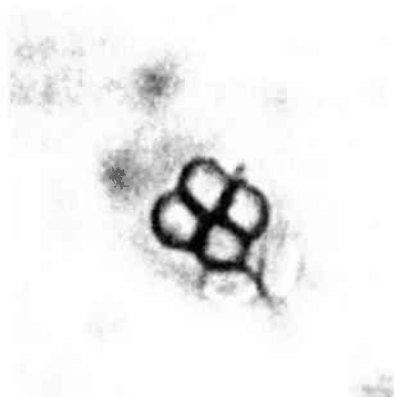
*Beijerinckia tridica*



*C. pasteurianum*



*Azotobacter* (x400)  
(ảnh Trần Thị Thủy)



*Azotobacter* (x1000)  
(ảnh Trần Thị Thủy)

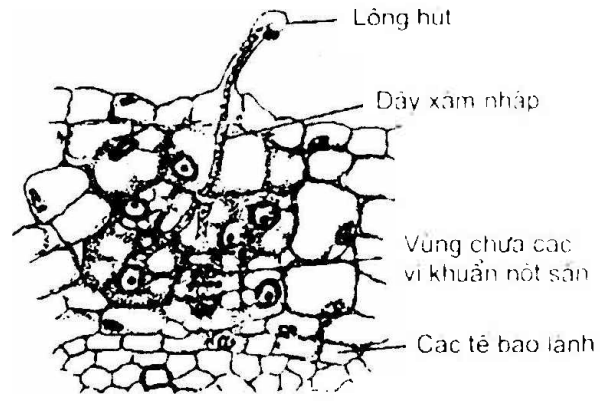


*C. pasteurianum*

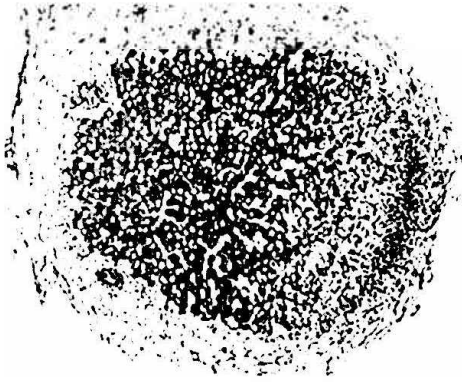
Hình 9.4. Vi khuẩn cố định nitơ tự do



1. Rễ cây đậu với các nốt sần chứa *Rhizobium*



2. Sơ đồ lát cắt nốt sần



Lát cắt ngang nốt sần



*Rhizobium* (ảnh Trần Thị Thủy)

Hình 9.5. Vi khuẩn nốt sần

### III. ỨNG DỤNG

#### 3.1. Sản xuất phân Nitragin

Lấy đất màu hay than bùn làm ẩm đến 30 – 40% rồi cho vào những chai có dung tích 0,5 lít. Khử trùng 2 giờ ở 2 atm để giết hết những vi khuẩn có bào tử.

Song song với việc làm trên thì nuôi cấy vi khuẩn nốt sần trong những ống nghiệm hay bình tam giác có môi trường nước đậu. Đặt vào tủ ấm ở nhiệt độ 25 – 28°C. Những vi khuẩn sinh trưởng chậm (ở rễ cây đậu vũ phiến – *Lupinus*, lạc) thì thời gian nuôi cấy này từ 10 – 12 ngày, còn những vi khuẩn sinh trưởng nhanh (ở rễ cây đậu tương, đậu Hà Lan, đậu ba lá) thì thời gian nuôi cấy từ 4 – 6 ngày.

Đưa canh trường vi khuẩn nốt sần đã được nuôi cấy như trên cho vào những chai có giá thể vô trùng (đất, than bùn) đã được chuẩn bị. Đặt những chai này vào tủ ấm để vi khuẩn sinh sản với thời gian và nhiệt độ như đã nói ở trên. Trên nhãn dán ở mỗi chai cần ghi rõ nitrazin dùng cho loại đậu nào, ngày tháng sản xuất và nếu có thể thì cả số thứ tự của chủng vi khuẩn nốt sần đó.

Nitrazin tốt phải chứa không ít hơn 70 triệu tế bào vi khuẩn nốt sần trong 1g chế phẩm (đối với những vi khuẩn nốt sần sinh trưởng chậm như rễ cây Lupinus, đậu, lạc) và không ít hơn 300 triệu tế bào đối với vi khuẩn nốt sần sinh trưởng nhanh (ở rễ cây đậu tương, đậu Hà Lan). Thời gian bảo quản nitrazin là 9 tháng.

Lấy lượng nitrazin cần thiết cho vào một cái chậu, cho nước vào chậu đó (5 lít cho 100kg hạt đậu nhỏ và 1 lít cho 100kg hạt đậu to). Dùng thìa bằng gỗ hay dùng miếng gỗ nhẵn trộn đều nitrazin với nước (3 – 5 phút), không để lắng cặn, rót ngay vào hạt giống và trộn đều. Việc xử lý hạt giống bằng nitrazin tốt nhất là được thực hiện vào ngày gieo cây. Sau đó phải bao vệ chúng khỏi ánh nắng. Việc trộn hạt đậu với từng loại chế phẩm nitrazin tương ứng trước khi gieo hạt để chủ động nhiễm vi khuẩn nốt sần vào rễ đậu, khi bắt đầu hình thành lông hút để mau chóng tạo thành nốt sần. Bằng biện pháp này có thể tăng năng suất hạt đậu từ 10 – 30%.

### **3.2. Nuôi bèo hoa đậu**

Bèo hoa đậu phát triển hết sức nhanh chóng mà không cần sử dụng đến các loại thức ăn nitơ có trong ruộng. Bèo hoa đậu nếu chăm sóc tốt thì mỗi hecta trung bình có thể cho ta 30 – 40 tấn bèo tươi mỗi tháng (chứa 540 – 720kg protein).

Bèo hoa đậu thường phát triển nhanh và tích lũy nhiều nitơ từ không khí trong các điều kiện thích hợp sau đây:

- Nhiệt độ 20 – 28<sup>o</sup>C.
- Độ ẩm không khí 85 – 90%.
- Độ chiếu sáng: 20.000 – 4000 lux.
- Bón đủ phân photphat và phân kali.
- Bón đủ vôi để trung hoà đất.
- Ngăn bèo và san bèo kịp thời để bèo luôn sát cạnh mà không đè lên nhau.
- Đảm bảo việc triệt để phòng trừ các loại sâu hại bèo.

# HƯỚNG DẪN THỰC HIỆN VÀ ĐÁNH GIÁ KẾT QUẢ

## BÀI THỰC HÀNH CHƯƠNG VI

1. Mục tiêu của chương này là rèn luyện kỹ năng phát hiện khả năng chuyển hoá các hợp chất chứa nitơ của vòng tuần hoàn N trong tự nhiên bởi VSV. Nội dung của chương được chia làm 2 buổi.

– *Buổi 1*: Đặt các thí nghiệm amôn hoá, phản nitrat hoá và các thí nghiệm xác định VSV sống tự do cố định nitơ trên môi trường thạch đĩa và môi trường dịch thể.

– *Buổi 2*:

+ Định tính các sản phẩm của quá trình tuần hoàn nitơ trong tự nhiên: amôn hoá, nitrat hoá, phản nitrat hoá và cố định nitơ của *C. pasteurianum* trên môi trường dịch thể.

+ Quan sát các VSV của các quá trình amôn hoá, nitrat hoá, phản nitrat hoá và các VK cố định nitơ sống tự do và sống cộng sinh trong nốt sần họ Đậu.

2. Hướng dẫn kiểm tra, đánh giá kết quả bài 1, 2 trong chương VI

– Đặt thí nghiệm và đánh giá từng sản phẩm lên men của các giai đoạn chuyển hoá nitơ trong vòng tuần hoàn nitơ: amôn hoá, nitrat hoá, phản nitrat hoá và cố định nitơ.

– Làm tiêu bản và quan sát các VSV của từng quá trình chuyển hoá nitơ.

3. Trả lời các câu hỏi:

1 – Trong cách đặt thí nghiệm của quá trình amôn hoá protein bằng cách làm cơ bản như: cho 3 – 5g thịt và 1 ít đất vào 20 – 30ml nước để lên men từ 4 – 7 ngày (môi trường 1), khu hệ VSV sẽ phát triển, các sản phẩm lên men sẽ tạo ra như thế nào?

– Nếu ta cho thêm vào môi trường trên 3 – 5g đường (tỉ lệ 1 : 1) và tỉ lệ đường nhiều hơn, sản phẩm lên men và khu hệ VSV sẽ như thế nào? Giải thích.

2 – Hãy cho biết vai trò của các VSV phân giải protein trong quá trình ủ phân xanh, phân chuồng?

3 – Làm thế nào để hạn chế sự mất đạm trong quá trình ủ phân và bón phân?

4 – Hãy cho biết lợi ích của việc nuôi bèo hoa dâu?

5 – Hãy cho biết tác dụng của việc trồng cây họ Đậu ở vùng đồi núi và trồng xen canh giữa cây trồng họ Đậu và ngô, lúa?

6 – Muốn bổ sung chất đạm cho cây rừng người ta làm như thế nào?

# Phụ lục bài 7, 8, 9: PHA CHẾ THUỐC THỬ HOÁ CHẤT VÀ MỘT SỐ MÔI TRƯỜNG

## 1. Thuốc thử

### 1.1. Thuốc thử Ehrlich

- E – dimethylamino benzaldehyt: 5g
- Rượu butyric: 75ml
- HCl đậm đặc: 25ml

### 1.2. Thuốc thử Trommdorf

- $ZnCl_2$ : 20g
- Tinh bột: 4g
- $ZnI_2$ : 2g (nếu không có  $ZnI_2$  thì thay bằng KI)
- Hoà tan tinh bột vào 150ml nước và đun cho tan hết
- Hoà  $ZnCl_2$  vào 100ml nước cất đun sôi, sau đó đổ vào cốc tinh bột khuấy đều.
- Hoà  $ZnI_2$  trong 300ml nước cất cho tan rồi đổ vào hỗn hợp trên, thêm nước cho đủ 1 lít và giữ trong lọ màu để nơi tối.

### 1.3. Thuốc thử Griss

- Dung dịch thuốc thử Griss I
  - + Axit sunfanilic: 0,5g
  - + Dung dịch 5N axit axetic: 150ml
- Dung dịch thuốc thử Griss II
  - +  $\alpha$  – Naphtylanin: 0,5g
  - + Dung dịch 5N axit axetic: 150ml
  - + Nước cất: 50ml

### 1.4. Thuốc thử Nitron

- Nitron: 10g
- Dung dịch axit axetic 5%: 100ml

Hoà nitron vào dung dịch axit axetic 5%, lọc qua màng thuỷ tinh và bảo quản trong lọ màu.

### 1.5. Thuốc thử Diphenylamin

- Diphenylamin: 1g
- H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>: 100ml
- Nước cất: 20ml

Hoà Diphenylamin vào nước cất, thêm dần axit sunfuric.

### 1.6. Thuốc thử Nessler

- Dung dịch A
  - + KI: 35g
  - + HgCl<sub>2</sub>: 50g
  - + Nước cất: 200ml
- Dung dịch B
  - + NaOH: 50g
  - + Nước cất: 250ml

Hoà riêng dung dịch A vào dung dịch B, sau đó đổ 2 dung dịch trên vào bình tam giác dung tích 500ml, lắc đều trong 5 – 10 phút, sau đó thêm nước tới 500ml. Để lắng trong tủ lạnh 1 tuần rồi gạn lấy phần trong, cho vào lọ màu và bảo quản trong tủ lạnh trước khi dùng.

## 2. Thành phần một số môi trường

### 2.1. Môi trường nước thịt + Peptôn chứa 5% urê (vi khuẩn amon hoá urê)

### 2.2. Môi trường Kali tetrat chứa 5% urê

- Kali tetrat: 5g
- Urê: 50g
- K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>: 0,5g
- Nước: 1000ml
- pH = 7 – 7,2

### 2.3. Môi trường Zenghen chứa 5% urê

- Muối malat hay xitrat, tetrat: 5g
- Urê: 50g
- K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>: 0,25 – 0,5g
- Nước: 1000ml
- pH = 7 – 7,2

Khi cần thay malat bằng Na – xitrat.

### 2.4. Môi trường Rubentchich chứa 5% urê

- Tinh bột tan: 10g
- Urê: 50g
- K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>: 10g
- NaCl: 1g
- MgSO<sub>4</sub>: 0,5g
- FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O (vết): 0,1g
- Nước: 1000ml
- pH = 7 – 7,2

### 2.5. Môi trường Vinogradski 1 (vi khuẩn nitrat hoá)

|   |        |   |    |
|---|--------|---|----|
| - $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ :              | 2g     | - $\text{K}_2\text{HPO}_4$ :            | 1g |
| - $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ : | 0,5g   | - $\text{NaCl}$ :                       | 2g |
| - $\text{FeSO}_4$ (vết):                      | 0,1g   | - $\text{CaCO}_3$ hay $\text{MgCO}_3$ : | 1g |
| - Nước cất:                                   | 1000ml | - pH = 7                                |    |

### 2.6. Môi trường Vinogradski 2 (vi khuẩn nitrat hoá)

|   |        |                              |      |
|---|--------|------------------------------|------|
| - $\text{NaNO}_2$ :                           | 1g     | - $\text{KH}_2\text{PO}_4$ : | 0,5g |
| - $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ : | 0,3g   | - $\text{Na}_2\text{CO}_3$ : | 1g   |
| - $\text{NaCl}$ :                             | 0,5g   | - $\text{FeSO}_4$ :          | 0,1g |
| - Nước cất:                                   | 1000ml | - pH = 7                     |      |

Có thể dùng môi trường Vinogradski 1 và thay 2g  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  bằng 2g  $\text{NaNO}_2$  để nuôi cấy vi khuẩn nitrat hoá.

### 2.7. Môi trường Nitrat – đường kính (vi khuẩn phân nitrat hoá)

|                              |        |   |      |
|------------------------------|--------|---|------|
| - Đường kính:                | 30g    | - $\text{NaNO}_2$ :                           | 2g   |
| - $\text{K}_2\text{HPO}_4$ : | 1g     | - $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ : | 0,5g |
| - $\text{KCl}$ :             | 0,5g   | - $\text{FeSO}_4$ (vết):                      | 0,1g |
| - Nước:                      | 1000ml | - pH = 7                                      |      |

### 2.8. Môi trường Giltai

|   |      |   |       |
|---|------|---|-------|
| - Dung dịch 1:                                |      |   |       |
| + Asparagin:                                  | 0,5g | + Glucose:                                    | 10g   |
| + $\text{KNO}_3$ :                            | 2g   | + Nước:                                       | 500ml |
| - Dung dịch 2:                                |      |   |       |
| + Natri xitrat:                               | 2,5g | + $\text{KH}_2\text{PO}_4$ :                  | 2g    |
| + $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ : | 2g   | + $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ : | 0,2g  |
| + $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ : | 0,1g |   |       |

Trộn 2 dung dịch với nhau, dùng dung dịch  $\text{NaHCO}_3$  bão hoà để điều chỉnh pH đến 7.

### 2.9. Môi trường Beijerinck (vi khuẩn lưu huỳnh, phân nitrat hoá)

|  |      |                     |        |
|--|------|---------------------|--------|
| - Lưu huỳnh:                                       | 10g  | - $\text{KNO}_3$ :  | 0,5g   |
| - $\text{Na}_2\text{CO}_3$ :                       | 0,3g | - $\text{CaCO}_3$ : | 0,3g   |
| - $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (vết): | 0,1g | - Nước ao hồ:       | 1000ml |
|  |      | - pH = 7            |        |

### 2.10. Môi trường Ashby (vi khuẩn cố định nitơ sống tự do)

|                                |        |                |      |
|--------------------------------|--------|----------------|------|
| – Glucose, saccharose, mannit: | 20g    | – $K_2HPO_4$ : | 0,2g |
| – $MgSO_4$ :                   | 0,2g   | – NaCl:        | 0,2g |
| – $K_2SO_4$ :                  | 0,1g   | – $CaCO_3$ :   | 5g   |
| – Nước cất:                    | 1000ml | – pH = 7       |      |

### 2.11. Môi trường Phedorop

|                                   |      |                          |        |
|-----------------------------------|------|--------------------------|--------|
| – Mannit:                         | 20g  | – $K_2HPO_4$ :           | 0,3g   |
| – $CaHPO_4$ :                     | 0,2g | – $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ : | 0,2g   |
| – $K_2SO_4$ :                     | 0,2g | – NaCl:                  | 0,5g   |
| – $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ (vết):     | 0,1g | – $CaCO_3$ :             | 5g     |
| – Hỗn hợp các nguyên tố vi lượng: | 1ml  | – Nước cất:              | 1000ml |
| – pH = 7                          |      |                          |        |

Trong đó: Hỗn hợp các nguyên tố vi lượng:

|                          |        |                                 |      |
|--------------------------|--------|---------------------------------|------|
| – $H_3BO_3$ :            | 5g     | – $(NH_4)_2SO_4$ :              | 5g   |
| – KI:                    | 0,5g   | – NaBr:                         | 0,5g |
| – $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ : | 0,2g   | – $Al_2(SO_4)_3 \cdot 18H_2O$ : | 0,3g |
| – Nước cất:              | 1000ml | – pH = 7                        |      |

### 2.12. Môi trường Vinogradski (vi khuẩn *Cl. pasteurianum*)

|                               |      |                               |        |
|-------------------------------|------|-------------------------------|--------|
| – Glucose:                    | 20g  | – $K_2HPO_4$ :                | 1g     |
| – $MgSO_4 \cdot 2H_2O$ :      | 0,5g | – NaCl (vết):                 | 0,1g   |
| – $MnSO_4 \cdot 5H_2O$ (vết): | 0,1g | – $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ (vết): | 0,1g   |
| – $CaCO_3$ :                  | 40g  | – Nước cất:                   | 1000ml |

### 2.13. Môi trường thuần khiết vi khuẩn nốt sần họ đậu

|                               |        |                          |      |
|-------------------------------|--------|--------------------------|------|
| – Nước đậu (nước chiết đậu) : | 1000ml | – Saccharose:            | 10g  |
| – $K_2HPO_4$ :                | 1g     | – $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ : | 0,5g |
| – Thạch:                      | 20g    | – pH = 7                 |      |

Cách chế nước chiết đậu:

Lấy 50g đậu tương hay 100g giá đậu và 1 lít nước đun sôi 15 – 30 phút, lọc lấy nước trong. Điều chỉnh môi trường đến phản ứng kiềm yếu. Dùng nước chiết đậu này để điều chế môi trường hoặc phân vào các bình và khử trùng ở 1,5 atm trong 30 phút để bảo quản.

Cách chế nước chiết đất:

Lấy 1kg đất vườn thêm 1 ít nước máy. Hấp ở áp lực 1atm trong 30 phút để lắng rồi chắt nước trong, lọc qua giấy lọc. Trung hoà nước lọc, bổ sung nước cho đủ 1000ml rồi dùng để chế môi trường ngay.



## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Burton E. Pierce & Michael J. Leboffe, 1999. *Exercises for the Microbiology Laboratory*. Morton Publishing Company, USA.
2. Burton E. Pierce & Michael J. Leboffe, 2005, *A photographic atlas for the Microbiology laboratory*. 3<sup>rd</sup> Edition, Morton Publishing company, USA.
3. Nguyễn Thành Đạt, Mai Thị Hằng, 2002. *Sinh học vi sinh vật*. Tái bản lần 2, NXB Giáo dục.
4. Nguyễn Thành Đạt, Mai Thị Hằng, 2008. *Giáo trình vi sinh học*. NXB ĐHSP, tái bản lần 2.
5. Nguyễn Thành Đạt, Nguyễn Duy Thảo, Vương Trọng Hòa, 1990. *Thực hành Vi sinh vật*. NXB Giáo dục.
6. Havry W.S., Paul J.V., Vanderman J.L.1994. *A laboratory manual of microbiology*. Freeman. H Company Oxford. England, p. 109 – 111H. Mark.j.,1986. *Water and Waste Water Technology*, 2<sup>nd</sup> edition, John Wiley & Sons, New York.
7. John Prescott Harrley, 2005. Lansing M. Prescott, John P. Harley, Donald A. Klein. *Laboratory exercises in Microbiology*. Sixth Edition, McGraw Hill Publisher.
8. Ronald M. Atlas, James W. Snyder, 2006. *Handbook of Microbiological Media for the Examination of Food*, Academic Press London.
9. Trần Linh Thuộc, 2002. *Phương pháp phân tích vi sinh vật*. NXB Giáo dục.

*Chịu trách nhiệm xuất bản:*

Giám đốc      ĐINH NGỌC BẢO

Tổng biên tập      ĐINH VĂN VANG

*Người nhận xét:*

GS.TS. PHẠM VĂN TY

TS. DUƠNG MINH LAM

*Biên tập nội dung:*

NGUYỄN ĐÌNH DŨNG

*Kỹ thuật vi tính:*

NGUYỄN NGUYỆT NGA

*Trình bày bìa:*

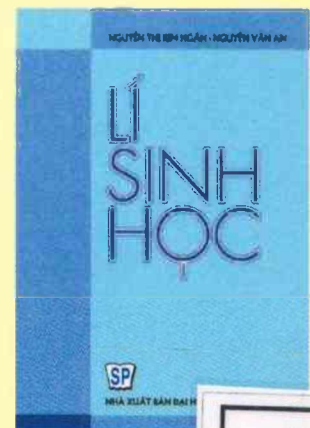
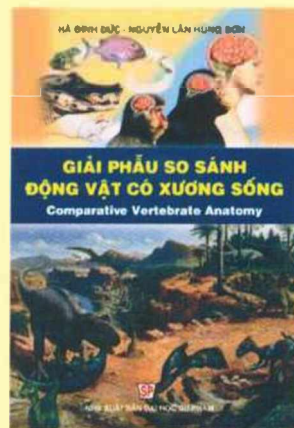
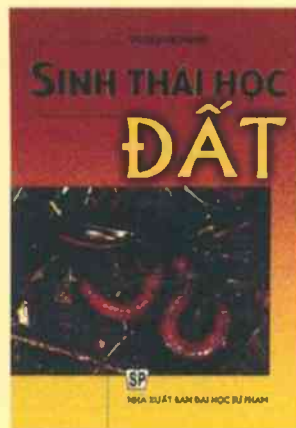
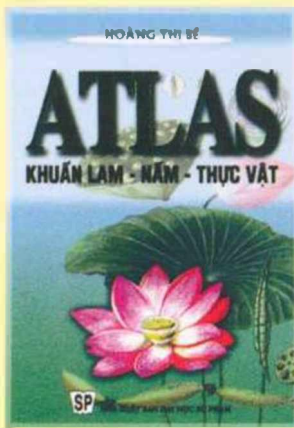
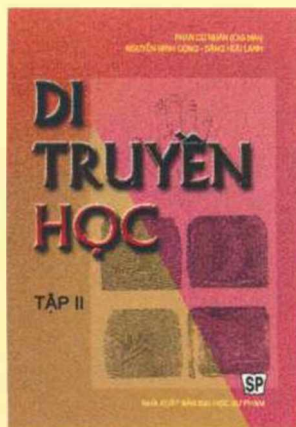
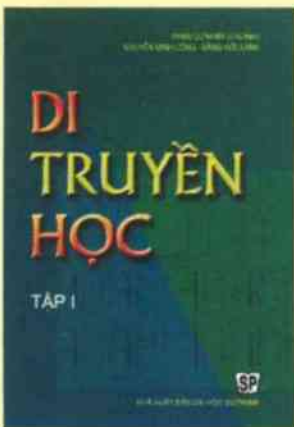
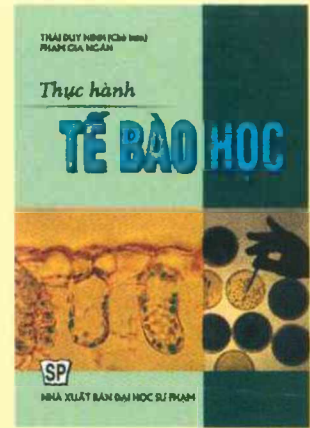
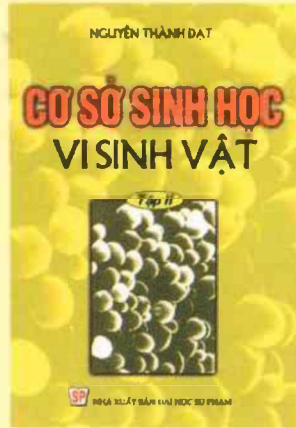
PHẠM VIỆT QUANG

**THỰC HÀNH VI SINH VẬT HỌC**

---

In 1000 cuốn khổ 17x24cm tại Công ty Cổ phần in Khoa học công nghệ Hà Nội  
Đăng kí KHXB số: 267 - 2011/CXB/56 - 13/ĐHSP ngày 14/3/2011  
in xong và nộp lưu chiểu tháng 8 năm 2011

• MỜI BẠN TÌM ĐỌC •



**NHÀ XUẤT BẢN ĐẠI HỌC SƯ PHẠM**

Địa chỉ: 136 Xuân Thủy - Cầu Giấy - Hà Nội  
 Tel: 04.37547735 (Hành chính) - 04.37549202 (Phát hành)  
 Fax: 04.37547911  
 Email: [nxb-phathanh@hnu.edu.vn](mailto:nxb-phathanh@hnu.edu.vn)  
 Website: <http://nxb.hnu.edu.vn>



8 935220 514490

Giá: 32.000đ

ĐẠI HỌC  
 Trung tâm  
 579  
 MH 239  
 DT.021