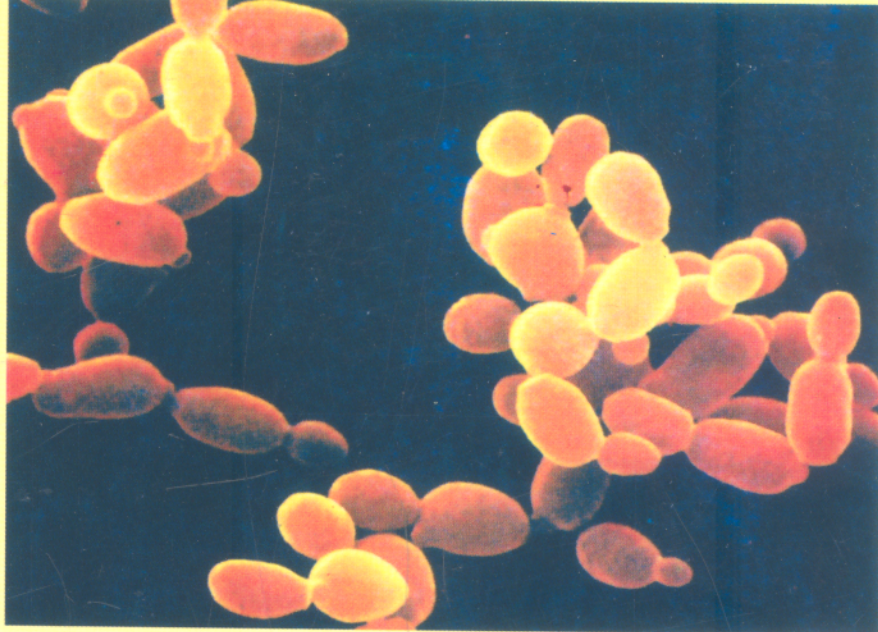


NGUYỄN LÂN DŨNG
NGUYỄN ĐÌNH QUYẾN
PHẠM VĂN TY



VI SINH VẬT HỌC



NHÀ XUẤT BẢN
GIÁO DỤC

NGUYỄN LÂN DŨNG (chủ biên)
NGUYỄN ĐÌNH QUYẾN – PHẠM VĂN TY

VI SINH VẬT HỌC

(Tái bản lần thứ sáu)

NHÀ XUẤT BẢN GIÁO DỤC

CHƯƠNG I

MỞ ĐẦU

1. ĐẶC ĐIỂM CHUNG CỦA VI SINH VẬT

Vi sinh vật (microorganisms) là tên gọi chung để chỉ tất cả các sinh vật có hình thể bé nhỏ, muốn thấy rõ được người ta phải sử dụng tới kính hiển vi.

Virut (virus) là nhóm vi sinh vật đặc biệt, chúng nhỏ bé tới mức chỉ có thể quan sát được qua kính hiển vi điện tử (electron microscope). Virut chưa có cả cấu trúc tế bào. Các vi sinh vật khác thường là đơn bào hoặc đa bào nhưng có cấu trúc đơn giản và chưa phân hóa thành các cơ quan sinh dưỡng (vegetative organs).

Vi sinh vật không phải là một nhóm riêng biệt trong sinh giới. Chúng thậm chí thuộc về nhiều giới (kingdom) sinh vật khác nhau. Giữa các nhóm có thể không có quan hệ mật thiết với nhau. Chúng có chung những đặc điểm sau đây :

1.1. Kích thước nhỏ bé. Mắt con người khó thấy được rõ những vật nhỏ hơn 1mm. Vậy mà vi sinh vật thường được đo bằng micromet (μm , micrometre), virut thường được đo bằng nanomet (nm, nanometre).

$1\mu\text{m} = 10^{-3}\text{mm}$; $1\text{nm} = 10^{-6}\text{mm}$, $1\text{\AA} (\text{angstrom}) = 10^{-7}\text{mm}$. Vì vi sinh vật có kích thước nhỏ bé cho nên diện tích bề mặt của một tập đoàn vi sinh vật hết sức lớn. Chẳng hạn số lượng cấu khuẩn chiếm thể tích 1cm^3 có diện tích bề mặt là 6m^2 .

1.2. Hấp thu nhiều, chuyển hóa nhanh. Vi sinh vật tuy nhỏ bé nhất trong sinh giới nhưng năng lực hấp thu và chuyển hóa của chúng có thể vượt xa các sinh vật bậc cao. Chẳng hạn vi khuẩn lactic (*Lactobacillus*) trong 1 giờ có thể phân giải một lượng đường lactozo nặng hơn 1000 - 10000 lần khối lượng của chúng. Nếu tính số μl O_2 mà mỗi mg chất khô của cơ thể sinh vật tiêu hao trong 1 giờ (biểu thị là $-Q_{\text{O}_2}$) thì ở mô lá hoặc mô rễ thực vật là 0,5 - 4, ở tổ chức gan và thận động vật là 10 - 20, còn ở nấm men rượu (*Sacharomyces cerevisiae*) là 110, ở vi khuẩn thuộc chi *Pseudomonas* là 1200, ở vi khuẩn thuộc chi *Azotobacter* là 2000. Năng lực chuyển hóa sinh hóa mạnh mẽ của vi sinh vật dẫn đến những tác dụng hết sức lớn lao của chúng trong thiên nhiên cũng như trong hoạt động sống của con người.

1.3. Sinh trưởng nhanh, phát triển mạnh. So với các sinh vật khác thì vi sinh vật có tốc độ sinh trưởng và sinh sôi nảy nở cực kì lớn. Vi khuẩn *Escherichia coli* trong các điều kiện thích hợp cứ khoảng 12 - 20 phút lại phân cắt một lần. Nếu lấy thời gian thế hệ (generation time) là 20 phút thì mỗi giờ phân cắt 3 lần, 24 giờ phân cắt 72 lần, từ 1 tế bào ban đầu sẽ sinh ra 4.722.366.500.000.000.000.000 tế bào (nặng 4722 tấn !). Tất nhiên trong thực tế không thể tạo ra các điều kiện sinh trưởng lí tưởng như vậy được cho nên số lượng vi khuẩn thu được trong 1 ml dịch nuôi cấy

thường chỉ đạt tới mức độ $10^8 - 10^9$ tế bào. Thời gian thế hệ của nấm men *Saccharomyces cerevisiae* là 120 phút. Khi nuôi cấy để thu nhận sinh khối (biomass) giàu protein phục vụ chăn nuôi người ta nhận thấy tốc độ sinh tổng hợp (biosynthesis) của nấm men này cao hơn của bò tới 100.000 lần. Thời gian thế hệ của tảo *Chlorella* là 7 giờ, của vi khuẩn lam *Nostoc* là 23 giờ.

1.4. Năng lực thích ứng mạnh và dễ phát sinh biến dị. Năng lực thích ứng của vi sinh vật vượt rất xa so với động vật và thực vật. Trong quá trình tiến hóa lâu dài vi sinh vật đã tạo cho mình những cơ chế điều hòa trao đổi chất để thích ứng được với những điều kiện sống rất bất lợi. Người ta nhận thấy số lượng enzym thích ứng chiếm tới 10% lượng chứa protein trong tế bào vi sinh vật. Sự thích ứng của vi sinh vật nhiều khi vượt quá trí tưởng tượng của con người. Phần lớn vi sinh vật có thể giữ nguyên sức sống ở nhiệt độ của nitơ lỏng (-196°C), thậm chí ở nhiệt độ của hidro lỏng (-253°C). Một số vi sinh vật có thể sinh trưởng ở nhiệt độ 250°C , thậm chí 300°C . Một số vi sinh vật có thể thích nghi với nồng độ 32% NaCl (muối ăn). Vi khuẩn *Thiobacillus thiooxidans* có thể sinh trưởng ở pH = 0,5 trong khi vi khuẩn *Thiobacillus denitrificans* lại thích hợp phát triển ở pH = 10,7. Vi khuẩn *Micrococcus radiodurans* có thể chịu được cường độ bức xạ tới 750.000 rad. Ở nơi sâu nhất trong đại dương (11034 m) nơi có áp lực tới 1103,4 atm vẫn thấy có vi sinh vật sinh sống. Nhiều vi sinh vật thích nghi với điều kiện sống hoàn toàn thiếu oxy (vi sinh vật kỵ khí bắt buộc - obligate anaerobes). Một số nấm sợi có thể phát triển thành váng dày ngay trong bể ngâm xác có nồng độ phenol rất cao.

Vi sinh vật rất dễ phát sinh biến dị bởi vì thường là đơn bào, đơn bội, sinh sản nhanh, số lượng nhiều, tiếp xúc trực tiếp với môi trường sống. Tần số biến dị ở vi sinh vật thường là $10^{-5} - 10^{-10}$. Hình thức biến dị thường gặp là đột biến gen (gene mutation) và dẫn đến những thay đổi về hình thái, cấu tạo, kiểu trao đổi chất, sản phẩm trao đổi chất, tính kháng nguyên, tính đề kháng... Chẳng hạn khi mới tìm thấy khả năng sinh chất kháng sinh của nấm sợi *Penicillium chrysogenum* người ta chỉ đạt tới sản lượng 20 đơn vị penixilin trong 1ml dịch lên men. Ngày nay trong các nhà máy sản xuất penixilin người ta đã đạt tới năng suất 100.000 đơn vị/ml. Bên cạnh các biến dị có lợi, vi sinh vật cũng thường sinh ra những biến dị có hại đối với nhân loại, chẳng hạn biến dị về tính kháng thuốc. Năm 1946 tỉ lệ các chủng *Staphylococcus aureus* kháng thuốc phân lập được ở bệnh viện là khoảng 14%, năm 1996 đã tăng lên đến trên 97%.

Người ta chỉ tiêm cho bệnh nhân mỗi ngày khoảng 100.000 đơn vị penixilin, ngày nay có lúc phải tiêm đến 10.000.000 - 200.000.000 đơn vị.

1.5. Phân bố rộng, chủng loại nhiều. Vi sinh vật phân bố ở khắp mọi nơi trên Trái Đất. Chúng có mặt trên cơ thể người, động vật, thực vật, trong đất, trong nước, trong không khí, trên mọi đồ dùng, vật liệu, từ biển khơi đến núi cao, từ nước ngọt, nước ngầm cho đến nước biển...

Trong đường ruột của người thường có không dưới 100 - 400 loài vi sinh vật khác nhau, chúng chiếm tới 1/3 khối lượng khô của phân. Chiếm số lượng cao nhất trong đường ruột của người là vi khuẩn *Bacteroides fragilis*, chúng đạt tới số lượng $10^{10} - 10^{11}$ /g phân (gấp 100 - 1000 lần số lượng vi khuẩn *Escherichia coli*).

Ở độ sâu 10.000m của Đông Thái Bình Dương, nơi hoàn toàn tối tăm, lạnh lẽo và có áp suất rất cao người ta vẫn phát hiện thấy có khoảng 1 triệu - 10 tỉ vi khuẩn/ml (chủ yếu là vi khuẩn lưu huỳnh).

Ở độ cao tới 84 km trong không khí người ta vẫn còn phát hiện thấy có vi sinh vật. Mặt khác khi khoan xuống các lớp đá trầm tích sâu tới 427m ở châu Nam Cực người ta vẫn phát hiện được các vi khuẩn sống.

Về chủng loại trong khi toàn bộ giới Động vật có khoảng 1,5 triệu loài, Thực vật có khoảng 0,5 triệu loài thì Vi sinh vật cũng có tới trên 100 nghìn loài bao gồm 30 nghìn loài động vật nguyên sinh, 69 nghìn loài nấm ; 23 nghìn loài vi tảo ; 2,5 nghìn loài vi khuẩn lam ; 1,5 nghìn loài vi khuẩn ; 1,2 nghìn loài virus và ricketxi...

Dùng như nhà vi sinh vật học Nga nổi tiếng A.A. Imsenhetskii đã viết : "Các loài vi sinh vật mà ta biết đến hiện nay nhiều lắm cũng không quá được 10% tổng số loài vi sinh vật có sẵn trong thiên nhiên". Chẳng hạn về Năm trung bình mỗi năm lại được bổ sung thêm khoảng 1500 loài mới.

2. VỊ TRÍ CỦA VI SINH VẬT TRONG SINH GIỚI

Việc phân loại các nhóm vi sinh vật được mở đầu bởi nhà khoa học Thụy Điển Linneaus (1707 - 1778). Thực ra trước đó còn phải kể đến sự đề xuất của một nhà tự nhiên học người Anh tên là J. Ray (1628 - 1705). Linneaus (về sau được gọi theo kiểu quý tộc là Carl von Linné) là người đề xướng việc sử dụng tiếng La Tinh để thống nhất gọi tên từng loài. Tên loài gồm hai chữ : chữ đầu (viết hoa) để chỉ tên chi (genus), chữ sau (không viết hoa) để chỉ tên loài (species). Linneaus chia thế giới sinh vật ra thành 2 giới : giới Thực vật và giới Động vật. Năm 1866 nhà khoa học Đức E. Haeckel (1834 - 1919) đề xuất việc bổ sung thêm giới thứ ba là giới Nguyên sinh (Protista). Ông xếp vào giới này tất cả các vi sinh vật đơn bào, các động vật không điển hình và các thực vật không điển hình. Năm 1969 nhà sinh thái học Mĩ R.H. Whittaker (1920 - 1981) đề xuất hệ thống phân loại 5 giới. Đó là giới Khởi sinh (Prokaryota hay Monera) bao gồm Vi khuẩn và Vi khuẩn lam ; giới Nguyên sinh (Protista) bao gồm một số tảo đơn bào (Euglenophyta, Chrysophyta, Pyrrophyta), một số nấm đơn bào có lông roi hay tiên mao (Hyphochytridiomycetes, Plasmodiophoromycetes), và các nhóm động vật nguyên sinh (Sporozoa, Cnidosporidia, Zoomastigina, Sarcodina, Ciliophora), giới Nấm (Fungi), giới Thực vật (Plantae) và giới Động vật (Animalia). Năm 1973 nhà phân loại người Acmenia A.L. Takhtadjan đề nghị bỏ giới Nguyên sinh (Protista), ông cho rằng việc thừa nhận giới này "là một thiếu sót có tính nguyên tắc" của hệ thống phân loại theo Whittaker. Takhtadjan còn đề nghị đổi giới Monera thành giới Mychota.

Năm 1979 nhà sinh vật học lão thành Trung Quốc Trần Thế Tương (Chen Shixiang, 1905 - 1988) đưa ra kiến nghị về hệ thống phân loại 6 giới và 3 nhóm giới (tổng giới) sinh vật như sau :

I - Nhóm giới Sinh vật phi bào (chưa có tế bào)

1 - Giới Virus

II - Nhóm giới Sinh vật nhân nguyên thủy

2 - Giới Vi khuẩn

3 - Giới Vi khuẩn lam (hay Tảo lam)

III - Nhóm giới Sinh vật nhân thật

4 - Giới Thực vật

5 - Giới Nấm

6 - Giới Động vật

84-87-198
X-008N.
X-008N.
X-008N.

84-87-198
X-008N.
X-008N.
X-008N.



84-87
X-00N.
X-00N.
X-00N.

[illegible]

84-87
X-00N.
X-00N.
X-00N.

84-87-198
X-008N.
X-008N.
X-008N.

3. ĐẶC ĐIỂM CỦA SINH VẬT NHÂN NGUYÊN THỦY VÀ SINH VẬT NHÂN THẬT

Sinh vật nhân nguyên thủy (Prokaryota) khác biệt với sinh vật nhân thật (Eukaryota) ở các đặc điểm chủ yếu được trình bày trong bảng sau đây :

	Prokaryota	Eukaryota
Hệ thống di truyền :		
- Vị trí	Thể nhân (nucleoid)	Nhân (nucleus) Ti thể (mitochondria) Lục lạp (chloroplasts)
- Cấu trúc của nhân		
Màng nhân	-	+
Số lượng nhiễm sắc thể	1	> 1
Nhiễm sắc thể chứa histon	-	+
Phân bào giảm nhiễm	-	+
- Sinh sản hữu tính :		
Cơ chế hình thành hợp tử	Tiếp hợp (conjugation) Biến nạp (transformation) Tái nạp (transduction)	Tiếp hợp
Bản chất của hợp tử	Lưỡng bội một phần (chỉ có lưỡng bội đầy đủ khi tiếp hợp)	Lưỡng bội (diploid)
Hệ thống tổng hợp protein :		
Đặc điểm của riboxom	70S (đơn vị Svedberg)	80S (tế bào chất) 70S (cơ quan tử, bào quan)
Cấu trúc trong tế bào chất :		
Ti thể	-	+
Lục lạp	-	- hoặc +
Lizoxom	-	+ (chưa chắc tất cả)
Thể Golgi	-	+
Mạng lưới nội chất (endoplasmic reticulum)	-	+
Hệ thống ống nhỏ (microtubular systems)	-	+
Không bào thật (true vacuoles) - có màng bao bọc	-	+

Các cấu trúc phức ngoài của tế bào

- Màng tế bào chất

Chứa sterol

Chứa một phần bộ máy hô hấp và quang hợp

- Thành tế bào

Mức độ gấp

Chứa peptidoglican

(peptidoglican, murein)

- Cơ quan chuyển vận

Tiên mao (flagella) chứa

9+2 ống nhỏ (microtubules),

bắt nguồn từ hạt giữa

(trung tử, centriole)

Tiên mao không như trên

Chân giả (pseudopodia)

- (ở vi khuẩn lam và Mycoplasma có với nồng độ thấp)
+ (không có ở vi khuẩn màu lục)

Hầu như phổ biến

+

-
ở một số vi khuẩn

-

+

Chỉ ở một số nhóm

-

+ (một số nhóm)

+ (một số nhóm)

4. VAI TRÒ CỦA VI SINH VẬT TRONG TỰ NHIÊN VÀ TRONG NỀN KINH TẾ QUỐC DÂN

Vi sinh vật sống ở khắp mọi nơi trên Trái Đất : từ đỉnh núi cao đến tận đáy biển sâu, trong không khí, trong đất, trong hăm mỏ, trong sông ngòi, ao hồ, trên da, trong từng bộ phận của cơ thể người, động vật, thực vật, trong các sản phẩm lương thực, thực phẩm, vật liệu, hàng hóa... Ngay cả trong những nơi mà điều kiện sống tương chừng hết sức khắc nghiệt vẫn thấy có sự phát triển của vi sinh vật. Vi khuẩn *Pseudomonas bathycetes* sống được ở đáy đại dương, nơi có áp suất tới 1000 atm và nhiệt độ thường xuyên chỉ vào khoảng 3°C. Vi khuẩn *Sulfolobus acidocaldarius* phát triển một cách bình thường ở nhiệt độ 85 - 90°C. Vi khuẩn *Thiobacillus ferrooxidans* phát triển trong các dung dịch ở mỏ sắt có độ pH = 1 - 2. Vi khuẩn *Streptococcus faecalis* lại có thể phát triển tốt ở môi trường có pH = 10 - 11. Vi khuẩn ưa mặn thuộc các chi *Halobacterium*, *Halococcus* phát triển được cả trong các dung dịch bão hòa muối (32% NaCl). Nhiều loài nấm men phát triển được trong mật ong. Có cả những vi sinh vật có khả năng đông hóa dầu mỏ, phenol, khí thiên nhiên...

Trong 1g đất lấy ở tầng canh tác thường có 1 - 22 tỉ vi khuẩn ; 0,5 - 14 triệu xạ khuẩn ; 3 - 50 triệu vi nấm ; 10 - 30 nghìn vi tảo... Trong 1m³ không khí phía trên chuồng gia súc thường có 1 - 2 triệu vi sinh vật, trên đường phố có khoảng 5000, nhưng trên mặt biển chỉ có khoảng 1 - 2 vi sinh vật mà thôi.

Vi sinh vật sống trong đất và trong nước tham gia tích cực vào quá trình phân giải các xác hữu cơ, biến chúng thành CO₂ và các hợp chất vô cơ dùng làm thức ăn cho cây trồng (P, K, S, Ca...). Các vi sinh vật cố định nitơ thực hiện việc biến khí nitơ (N₂) trong không khí thành hợp chất nitơ (NH₃, NH₄⁺) cung cấp cho cây cối. Số

lượng nitơ mà mỗi năm cây trồng thu nhận được nhờ con đường này nhiều gấp 3 lần so với tổng số phân nitơ hóa học được sản xuất ra trên thế giới. Vi sinh vật có khả năng phân giải các hợp chất khó tan chứa P, chứa K, chứa S và tạo ra các vòng tuần hoàn trong tự nhiên. Chúng ta sẽ hiểu rõ hơn về các vòng tuần hoàn này ở chương IX.

Vi sinh vật sống trong đất và trong nước còn tham gia vào quá trình hình thành chất mùn. Trong đất, chất mùn là kho dự trữ thức ăn cho cây trồng và là yếu tố kết dính để tạo ra cấu tượng của đất. Đất có cấu tượng là đất có đủ điều kiện thích hợp về độ ẩm, về không khí, về chất hữu cơ đối với cây trồng.

Vi sinh vật tham gia tích cực vào việc phân giải các phế thải nông nghiệp, phế thải đô thị, phế thải công nghiệp và vì vậy có vai trò hết sức quan trọng trong việc bảo vệ môi trường. Tất nhiên các vi sinh vật gây bệnh thì lại tham gia vào việc làm ô nhiễm môi trường ở những nơi có điều kiện vệ sinh kém.

Vi sinh vật có vai trò quan trọng trong ngành năng lượng. Năm 1990 người ta thống kê thấy nhân loại mỗi năm đã tiêu dùng một lượng sinh khối hóa thạch (dầu mỏ, khí đốt, than đá) tính theo bình quân đầu người lớn hơn 25 lần so với khối lượng bản thân của họ. Chúng ta biết rằng các năng lượng hóa thạch được tái sinh với tốc độ hết sức chậm. Trong khi đó năng lượng hóa thạch đang chiếm trên 90% năng lượng tiêu dùng trên thế giới. Trữ lượng dầu mỏ hiện được biết sẽ cạn kiệt vào năm 2030, cùng lắm là 2050. Trong các nguồn năng lượng mà con người hi vọng sẽ khai thác mạnh mẽ trong tương lai có năng lượng thu được từ sinh khối (biomass). Sinh khối là khối lượng chất sống của sinh vật. Thực vật và một số vi sinh vật có thể tự tạo ra chất hữu cơ của sinh khối từ khí CO_2 và nước. Hàng năm có khoảng 60 - 70 tỉ tấn gỗ củi được sinh ra trên Trái Đất. Bên cạnh việc đun nấu trực tiếp gỗ củi còn có thể sử dụng vi sinh vật và các enzym do chúng sinh ra để chuyển hóa sinh khối thành cồn và dùng cồn làm nhiên liệu (dùng riêng rẽ hay phối trộn với xăng). Vi sinh vật là động lực để vận hành các bể sinh khí sinh học (biogas). Từ 1 tấn phân chuồng được đưa vào lên men có thể làm sản sinh ra 70 - 73m³ khí sinh học, cho năng lượng tương đương với 45l xăng). Riêng Hoa Kỳ mỗi năm có tới 240 triệu tấn phế thải của ngành chăn nuôi. Nếu được tận dụng hết để tạo ra khí sinh học sẽ làm ra được một nguồn năng lượng thay thế cho khoảng 83 - 110 triệu tấn nhiên liệu. Trong khí sinh học có 50 - 85% là khí CH_4 và 15 - 50% là khí CO_2 .

Vi sinh vật là lực lượng sản xuất trực tiếp của ngành công nghiệp lên men. Vi sinh vật có các kiểu trao đổi chất phong phú, có năng lực trao đổi chất mạnh mẽ và do đó có thể sản sinh ra rất nhiều sản phẩm trao đổi chất khác nhau. Nhiều sản phẩm đã được sản xuất lớn ở quy mô công nghiệp. Dưới đây là danh sách các sản phẩm lên men và các thập kỉ bắt đầu đưa được vào sản xuất :

Các thập kỉ	Sản phẩm
1880 - 1920 :	Axit lactic, men bánh mì, rượu etilic (etanol), glixerin, axeton-butanol, amilaza, invertaza.
1920 - 1940 :	Axit xitric (limonic), axit gluconic, proteaza, riboflavin (vitamin B ₂), sorbozơ.
1940 - 1950 :	Penixilin, baxitraxin, streptomixin, clotetraxilin (oreomixin, biomixin), neomixin, amphoterixin, axit itaconic, xenlulaza, pectinaza, amilaza (lên men chìm).
1950 - 1960 :	Axit glutamic (và natri glutamat), lizin, oxitetraxilin (teramixin), tetraxiclin, novobioxin, eritromixin, nistatin,

8.1.19.1.1

canamixin, xicloserin, axit asperglic, axit xitric (lên men chlm), axit gluconic (lên men chlm), peroxidaza, chuyển hóa các steroid, giberelin, dextran, sinh khối đơn bào, axit salixilic.

1960 - 1970 :

Gluciozomeraza, glucoamilaza, aminoaxilaza, lipaza, lactaza, xephalosporin, gentamixin, lincomixin, rifamixin, vancomixin, ribostamixin, blastixidin S, polioxin, valin, chuyển hóa sinh học các steroid, 5'-nucleotit. Thuốc trừ sâu sinh học, xantan.

1970 - 1980 :

Bleomixin, candixidin, josamixin, amixin, validamixin, treonin, rennin, dextranaza, vitamin C (sinh tổng hợp), silitol, axit malic.

Sau 1980 :

Phenylalanin, avimixin, etilen oxit, poli- β -hidroxibutirat (PHB).

Từ đầu thập kỉ 70 của thế kỉ này người ta bắt đầu thực hiện thành công thao tác di truyền (genetic engineering) ở vi sinh vật. Đó là việc chủ động chuyển một gen hay một nhóm gen từ một vi sinh vật hay từ một tế bào các sinh vật bậc cao (người, động vật, thực vật) sang tế bào một vi sinh vật khác. Vi sinh vật mang gen tái tổ hợp nhiều khi đang mang lại những lợi ích to lớn bởi vì có thể sản sinh ở quy mô công nghệ những sản phẩm trước đây chưa hề được tạo thành bởi vi sinh vật.

Dưới đây là một số sản phẩm của các vi sinh vật đã được tái tổ hợp gen :

Sản phẩm phục vụ y tế và thú y	Interferon, insulin, kích tố sinh trưởng người (HGH), limphokin, interlokin, nhân tố kích hoạt đại thực bào (MAF), nhân tố sinh trưởng tế bào beta, thuốc tan fibrin, streptokinaza (SK), urokinaza (UK), chất kích hoạt plasminogen mô (TPA), các vacxin thể hệ mới, nhân tố máu, kích tố tuyến ức (Thymosja), albumin, eritropoetin (EPO), canxitonin, gonadotropin, nhân tố sinh trưởng biểu bì (EGF), antitripsin $\alpha - 1$, nhân tố gây hoại tử khối u (TNF), nhân tố kích thích khuẩn lạc (CSF), kháng thể đơn clon (MAbs). Các sản phẩm cổ điển được sản xuất bằng vi sinh vật mang gen tái tổ hợp (axit amin, chất kháng sinh, vitamin, steroid...)
Sản phẩm phục vụ công nghiệp thực phẩm và thức ăn chăn nuôi	Các axit amin (axit aspactic, phenylalanin, treonin). Các enzym. Sinh khối vi sinh vật (hay protein đơn bào, SCP)...
Sản phẩm phục vụ nông nghiệp	Thuốc trừ sâu vi sinh vật, phân bón vi sinh vật, kích tố sinh trưởng bò (BST), kích tố sinh trưởng lợn (PST)...
Sản phẩm phục vụ công nghiệp hóa học và công nghiệp năng lượng	Sử dụng các chủng vi sinh vật mang gen tái tổ hợp sản xuất khí sinh học, các dung môi hữu cơ, các axit hữu cơ, các enzym, các chất phụ gia dầu khí, etilen oxit, poli- β -hidrobutirat...
Bảo vệ môi trường	Các chủng vi sinh vật mang gen tái tổ hợp có thể phân giải mạnh các chất phế thải hoặc phá hủy các độc chất...

Trong công nghiệp tuyển khoáng nhiều chủng vi sinh vật đã được sử dụng để hòa tan các kim loại quý từ các quặng nghèo hoặc từ các bãi chứa xỉ quặng. Đó là phương pháp chất lọc kim loại và đã được sử dụng để sản xuất đồng, bạc, vàng, kẽm, urani, coban, arsenic, mangan, gali, germani...

Tất nhiên còn phải kể đến không ít các vi sinh vật có hại. Chúng gây bệnh cho người, cho gia súc, gia cầm, tôm cá, cho cây trồng, cây rừng. Chúng làm hư hao hoặc biến chất lương thực, thực phẩm, nguyên liệu, vật liệu, hàng hóa. Chúng sản sinh các độc tố trong đó có những độc tố hết sức độc. Chỉ cần 1mg độc tố của vi khuẩn *Clostridium botulinum* cũng đủ để giết hại tới 1000 tấn cơ thể sinh vật. Chỉ riêng sự tấn công của virus HIV (gây ra bệnh AIDS) cũng đủ gây ra ở cuối thế kỉ 20 khoảng 30 - 40 triệu người mang HIV (90% thuộc về các nước đang phát triển). Vào thời điểm ấy có khoảng 4,5 triệu trẻ em bị mẹ truyền HIV sang trong quá trình mang thai và khoảng 10 triệu trẻ em trở thành mồ côi vì cha mẹ đã bị chết vì bệnh AIDS.

5. SƠ LƯỢC LỊCH SỬ PHÁT TRIỂN CỦA VI SINH VẬT HỌC

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

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

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

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

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

Người có công phát hiện ra thế giới vi sinh vật và cũng là người đầu tiên miêu tả hình thái nhiều loại vi sinh vật là một người Hà Lan vốn là người học nghề trong một hiệu buôn vải. Đó là Antonie van Leeuwenhoek (1632 - 1723). Ông đã tự chế tạo

ra trên 400 chiếc kính hiển vi, trong đó có cái phóng đại được đến 270 lần. Với những chiếc kính hiển vi cầm tay, có gương hội tụ ánh sáng, có ốc điều chỉnh để cho vật định quan sát rơi đúng vào tiêu điểm và bằng cách ghé mắt vào khe nhỏ có gắn thấu kính mài lấy nhỏ xíu, Leeuwenhoek đã lần lượt quan sát mọi thứ có chung quanh mình. Năm 1674 ông nhìn thấy các vi khuẩn và động vật nguyên sinh, ông gọi là các "động vật vô cùng nhỏ bé". Ông thấy các "động vật" này có rất nhiều trong bựa răng và ông viết rằng trong miệng của ông số lượng của chúng còn đông hơn cả dân số của Vương quốc Hà Lan. Nhờ sự giới thiệu của Regnier de Graaf ông đã gửi đến Học hội Hoàng gia Anh 200 bức thư, qua đó ông đã miêu tả hình thái và dạng chuyển động của nhiều loại vi sinh vật. Nhiều bài báo của ông đã được công bố trên tạp chí Triết học của Học hội Hoàng gia Anh và năm 1680 ông được bầu làm thành viên của Học hội này. Tất cả các quan sát và miêu tả của ông đã được in thành một bộ sách gồm 4 tập có nhan đề là "Những bí mật của giới tự nhiên nhìn qua kính hiển vi".

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

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

Viết về Pasteur nhà khoa học Nga K.A.Timiriazev đã phân tích như sau : "Công trình của ông đã đem lại những biến đổi quan trọng trong cả 3 bộ môn khoa học ứng dụng kinh điển của nhân loại. Về công nghiệp, ông đã đề ra các cơ sở hợp lí, vững chắc cho hết thảy các quá trình lên men. Về nông nghiệp, lí luận của ông cùng với sự phát triển của T. Schloesing, H. Hellriegel, S.N. Vinogradskii... đã vạch ra cho các nhà nông học những ánh sáng mới về các nhiệm vụ và phương pháp cơ bản. Về y học... từ sau khi loài người nguyên thủy thoát được ra khỏi sự uy hiếp của các dã thú trong rừng sâu thì trong lịch sử chưa từng có những tiến bộ nào có ý nghĩa quyết định như các công trình nghiên cứu của L.Pasteur."

Dưới đây là niên biểu về một số cống hiến quan trọng của L.Pasteur về vi sinh vật học.

Năm	Cống hiến
1854 - 1864	Chứng minh nhiều quá trình lên men (etilic, lactic, axetic...) là do vi sinh vật gây nên.
1862	Nhận giải thưởng đặc biệt của Viện hàn lâm Khoa học Pháp về việc phủ định học thuyết Tự sinh (spontaneous-generation hypothesis).
1863	Chứng minh vi khuẩn là nguồn gốc của bệnh than.
1865	Phát hiện ra nguyên nhân của bệnh bào tử trùng ở tằm và đề xuất được các biện pháp phòng tránh.
1877	Phát hiện các phẩy khuẩn gây bệnh.
1880	Phát hiện các tụ cầu khuẩn gây bệnh.
1880	Phát hiện các liên cầu khuẩn gây bệnh.

- 1880 Tìm ra vaccin chống bệnh dịch tả gà nhờ sử dụng vi khuẩn đã chuyển sang dạng mất độc lực.
- 1880 Phát hiện não mô cầu khuẩn (cùng với Chamberland, Roux và Thuillier)
- 1881 Tìm ra vaccin chống bệnh than.
- 1883 Phát hiện tụ huyết khuẩn lợn (cùng với Thuillier)
- 1880 - 1885 Nghiên cứu vaccin chống bệnh dại. Ngày 6-7-1885 em bé 9 tuổi Joseph Meister là người đầu tiên được cứu sống nhờ vaccin chống dại của L. Pasteur.
- 1888 Trở thành viện trưởng đầu tiên của Viện Pasteur ở Paris (cho đến khi qua đời).

Tiếp tục phát huy các thành tựu của L. Pasteur trong việc khám phá nguồn gốc của các bệnh truyền nhiễm trong các năm tiếp theo hầu hết các vi sinh vật gây bệnh đã phân lập, nuôi cấy và định tên. Dưới đây là một số ví dụ :

Bệnh	Vi sinh vật	Năm phát hiện
Sốt hồi quy	<i>Borrelia recurrentis</i>	1868-1873
Phong (hủi)	<i>Mycobacterium leprae</i>	1873-1874
Thương hàn	<i>Salmonella typhi</i>	1880
Lao	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	1882
Tả	<i>Vibrio cholera</i>	1883
Bạch hầu	<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	1883-1884
Uốn ván	<i>Clostridium tetani</i>	1884
Viêm màng não	<i>Neisseria meningitidis</i>	1887
Lị	<i>Shigella</i> spp.	1891-1898
Đậu mùa	Virut đậu mùa	1892-1906
Dịch hạch	<i>Yersinia pestis</i>	1894
Ngộ độc thịt	<i>Clostridium botulinum</i>	1896
Sốt vàng	Virut sốt vàng	1901
Giang mai	<i>Treponema-pallidum</i>	1905
Bại liệt	Virut bại liệt	1908-1909
Cúm	Virut cúm	1933
Viêm não Nhật Bản	Virut viêm não Nhật Bản	1934-1938
Sốt Dengơ	Virut Dengue	1940-1946
Viêm gan truyền nhiễm	Virut viêm gan	1942-1962

Nhà bác học Đức Robert Koch (1843 - 1910) là người đã cộng sự mật thiết với Pasteur. Ngoài công lao to lớn trong việc khám phá ra vi khuẩn lao, vi khuẩn tả, ông còn tìm ra phương pháp phân lập thuần khiết vi sinh vật trên các môi trường đặc (solid medium). Học trò của ông là J.R. Petri (1852 - 1921) đã phát kiến ra loại hộp lồng làm bằng thủy tinh. R. Koch đã phát hiện ra phương pháp nhuộm màu tế bào vi sinh vật. Về sau các kĩ thuật nhuộm tiêu bản đã được cải tiến bởi Ehrlich (1881), Ziehl và Neelsen (1883), Loeffler (1884), Gram (1884)... R. Koch được nhận giải Nobel năm 1905. Người có công đầu tiên trong việc chứng minh có sự tồn tại của loại vi sinh vật nhỏ bé hơn vi khuẩn nhiều lần là nhà sinh lí học thực vật Nga D.I. Ivanovskii

(1864 - 1920). Ông chứng minh có sự tồn tại của loại vi sinh vật siêu hiển vi gây ra bệnh khảm (mosaic) ở lá thuốc lá vào năm 1892. Đến năm 1897 nhà khoa học Hà Lan M.W. Beijerinck (1851 - 1931) gọi loại vi sinh vật này là virus (virus) theo gốc La Tinh có nghĩa là "nọc độc". Đến năm 1917 thì F.H. d' Hérelle (1873 - 1949) phát hiện ra các virus của vi khuẩn và đặt tên là thể thực khuẩn (Bacteriophage).

Mặc dầu L.Pasteur là người đầu tiên chứng minh cơ sở khoa học của việc chế tạo vaccin nhưng thuật ngữ vaccin (Vaccin, từ gốc La Tinh Vaccinae có nghĩa là bệnh đậu mùa bò) lại do bác sĩ nông thôn người Anh Edward Jenner (1749 - 1823) đặt ra. Ông là người đầu tiên nghĩ ra phương pháp chủng mù đậu bò cho người lành để phòng bệnh đậu mùa hết sức nguy hiểm cho tính mạng con người.

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

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

Nhà khoa học Pháp gốc Nga S.N. Vinogradskii (1856 - 1953) là người đầu tiên phát hiện ra vi khuẩn sắt (1880), vi khuẩn lưu huỳnh (1887), vi khuẩn nitrat hóa (1890). Nhà khoa học Hà Lan M.W. Beijerinck (1851 - 1931) là người đầu tiên phân lập được vi khuẩn nốt sần *Rhizobium* (1888), vi khuẩn cố định đạm hiếu khí *Azotobacter* (1901), vi khuẩn lên men butylic, vi khuẩn phân giải pectin và nhiều nhóm vi khuẩn khác.

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

Năm 1897 Eduard Buchner (1860 - 1917) lần đầu tiên chứng minh được vai trò của enzym trong quá trình lên men rượu. Ông đã nghiền nát tế bào nấm men bằng cát thạch anh và lấy chất dịch vô bào chiết rút từ men đưa vào một dung dịch chứa 37% đường, sau nửa giờ đã bắt đầu thấy sản sinh CO_2 và rượu etilic. Khoa học về enzym (Enzymology) hình thành và phát triển nhờ hàng loạt các thành công tiếp theo : Năm 1897 B. Bertrand phát hiện ra và đặt tên cho nhóm coenzim ; A. Harden và Young cô đặc được một nhóm coenzim gọi là cozimaza (sau này được xác định là NAD - nicotinamid adenin dinucleotid) vào năm 1905 ; Sorensen chứng minh ảnh hưởng của pH đến hoạt động của enzym (1909) ; Neuberg đề xuất con đường hóa học của quá trình lên men (1912) ; Batelli và Stern khám phá ra dehydrogenaza (1912) ; Warburg nghiên cứu về enzym tham gia vào quá trình hô hấp (1912) ; Michaelis và Menten đề xuất ra động học của hoạt động của enzym (1913) ; J. B. Sumner (1887 - 1955) giải Nobel 1946, lần đầu tiên kết tinh được một enzym và chứng minh bản chất protein của enzym ureaza này (1926) ; J.H. Northrop kết tinh liên tiếp được nhiều enzym khác như pepxin (1929), tripsin (1931), chimotripxin (1933) ; Kelin phân lập được xitocrom c (1933) ; H.A.Krebs và Henselei khám phá ra

chu trình ure (1933) ; Embden và Meyerhof chứng minh quá trình phân giải đường (1933), Kuhn xác định vitamin B₂ là một thành phần của enzym vàng (1935) ; H.A. Krebs tìm ra chu trình axit xitric (1937), giải Nobel 1953 cùng với F. A. Lipmann ; Lipmann xác định vai trò trung tâm của ATP trong quá trình vận chuyển năng lượng (1939 - 1941) ; G. W. Beadle và E.L. Tatum chứng minh lí thuyết "1 gen - 1 enzym" (1940, giải Nobel 1958 cùng với J. Lederberg) ; A. Kornberg khám phá ra ADN polimeraza (giải Nobel 1959 cùng với S.Ochoa).

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

Các nhà vi sinh vật còn tạo ra bước ngoặt của di truyền học. D.T. Avery, C.M. MacLeod, M. McCarty với thực nghiệm trên vi khuẩn (1944) đã chứng minh quá trình biến nạp được thực hiện thông qua ADN ; H. Fraenkel - Conrat và B. Singer thí nghiệm "lắp ráp" virus khảm thuốc lá (1957) và đã chứng minh thêm vai trò của axit nucleic trong việc chuyển giao thông tin di truyền. Như vậy là cùng với phát hiện vĩ đại về cấu trúc ADN xoắn kép của J.D. Watson và F.H.C. Crick (1952, giải Nobel 1962 cùng với M.H.F. Wilkins), phát hiện về vai trò của operon trong việc "đóng, mở gen" của F. Jacob, J. Monod (1961, giải Nobel 1965 cùng với A.Lwoff), việc xác định ra mã di truyền của M. Nirenberg, G. Khorana (1961 - 1965, giải Nobel 1968 cùng với R.Holley)... con người đã đủ nhận thức để có được bức tranh toàn cảnh về cấu trúc chức năng và các quy luật vận động của vật liệu di truyền, mở ra kỉ nguyên tạo ra các cơ thể hoàn toàn mới lạ một cách chủ động nhờ mang gen tái tổ hợp. Các chủng vi sinh vật được tạo ra nhờ thao tác di truyền sẽ có mặt trong đời sống nhân loại ở mọi lĩnh vực khác nhau. Đó là hi vọng để tháo gỡ mọi khó khăn về lương thực, về thực phẩm, về thuốc men, về bảo vệ môi trường. Mặt khác cũng là mối đe dọa khủng khiếp đối với nhân loại nếu các vi sinh vật đã thay đổi gen được sử dụng trong chiến tranh như những loại vũ khí phân tử vô phương cứu chữa.

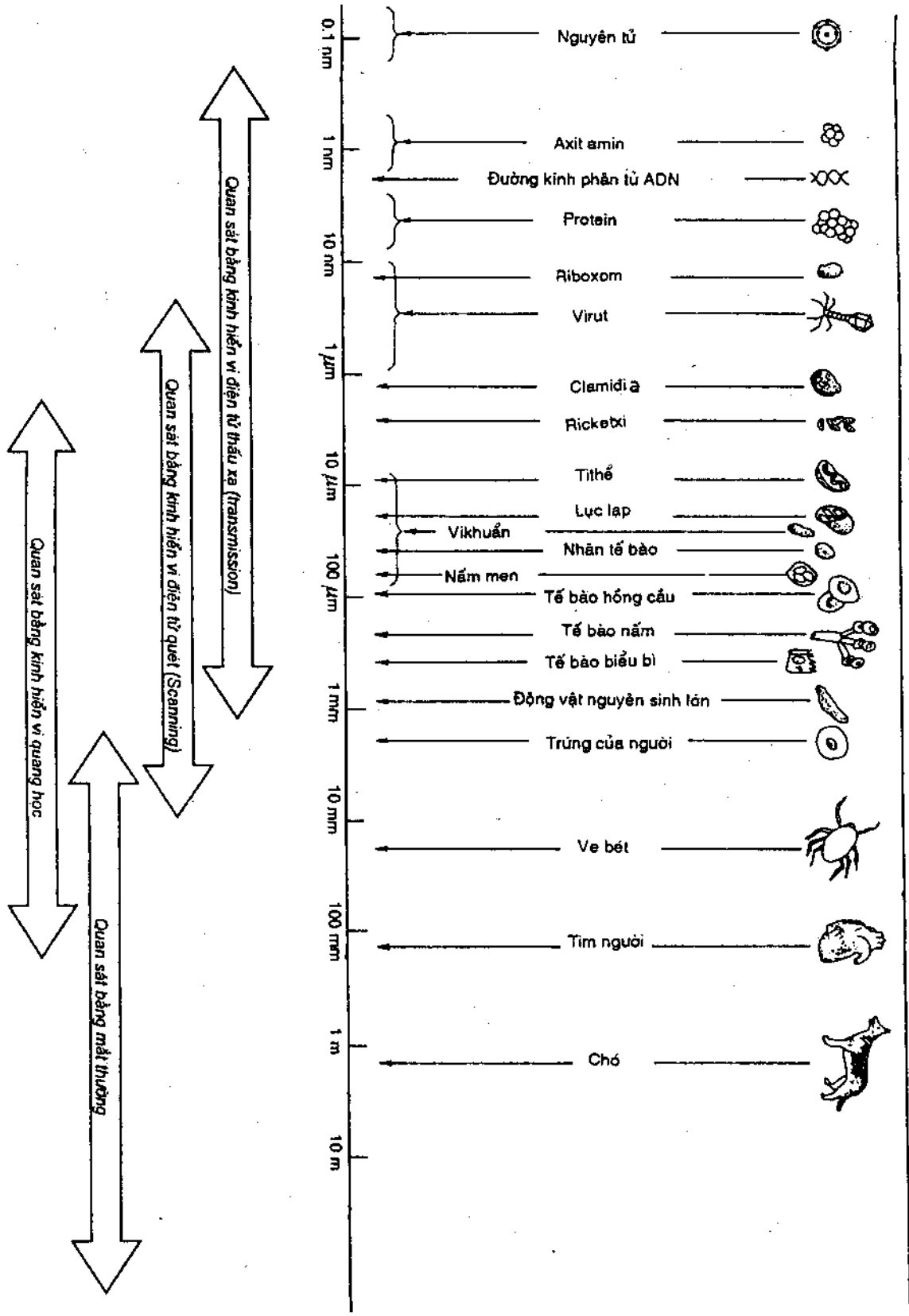
Một vài mốc quan trọng có thể kể đến là :

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

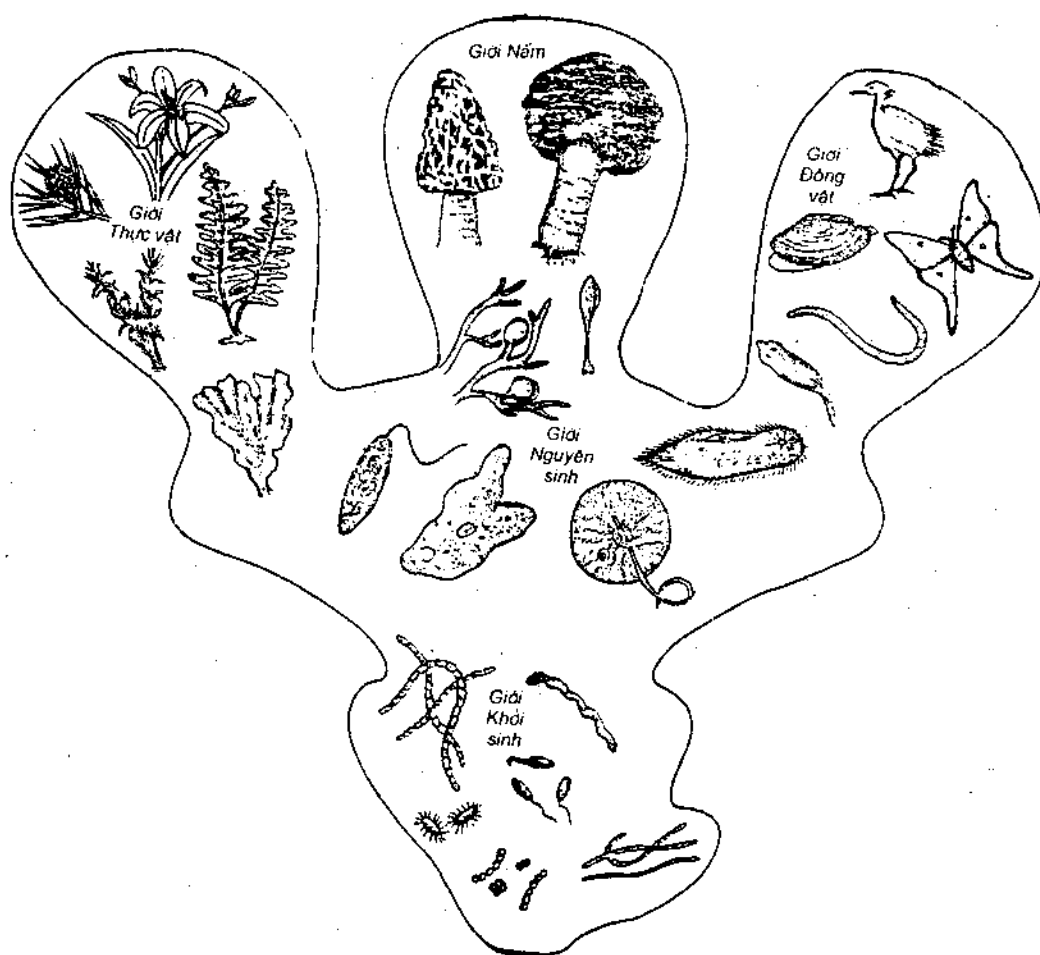
Năm 1978 lần đầu tiên sản xuất ra insulin (chữa bệnh tiểu đường) bằng công nghệ gen (dùng vi khuẩn đã được ghép gen mã hóa việc sinh tổng hợp ra insulin. Năm 1982 thuốc insulin tái tổ hợp được Mĩ và Anh cho phép ứng dụng rộng rãi. Cũng vào năm này người ta đã chế tạo thành công kích tố sinh trưởng người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

Ngày 26/6/2000 cùng một lúc các nhà khoa học thuộc hai nhóm nghiên cứu độc lập là nhóm Consortium của F. Collins và nhóm Celera Genomics của C. Venter đã công bố việc khám phá ra hầu như toàn bộ hệ gen (genom) của người.

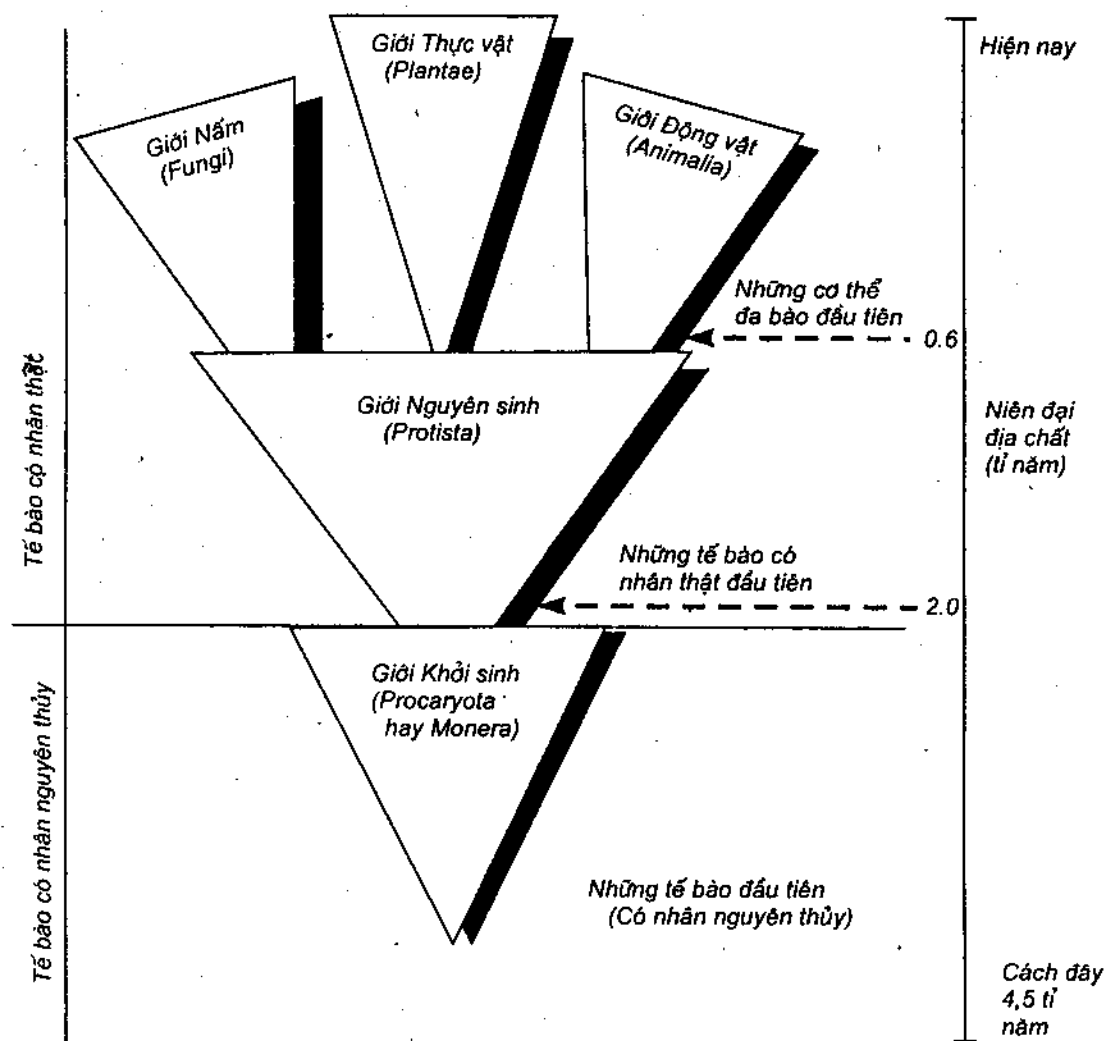
8.11.2014



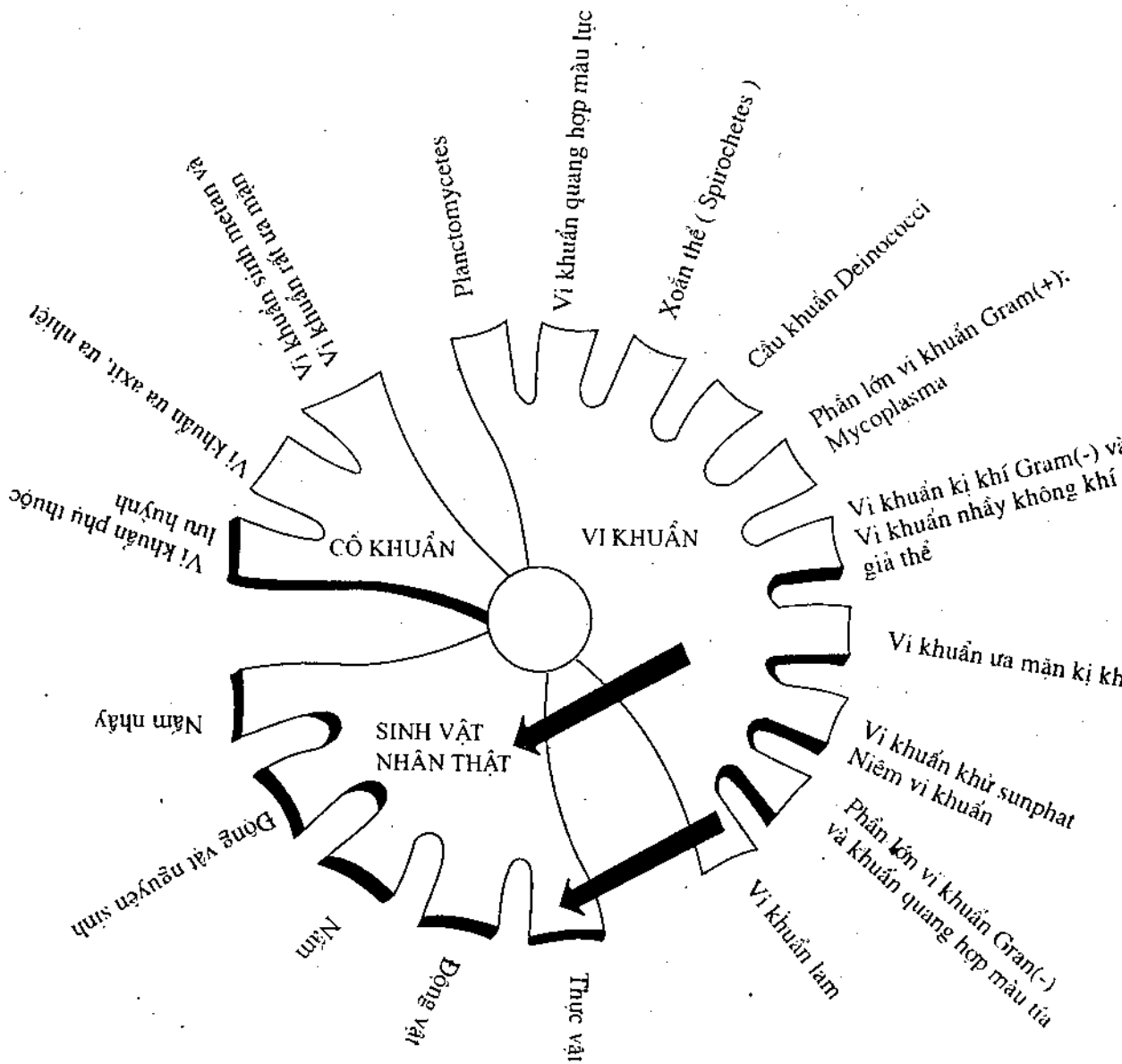
Các phương pháp quan sát thế giới sống (từ nguyên tử, phân tử, cấu trúc dưới tế bào, vi sinh vật, đến các cơ quan và cơ thể sinh vật bậc cao)



Hệ thống phân loại 5 giới của R.H. Whittaker (1920-1981)

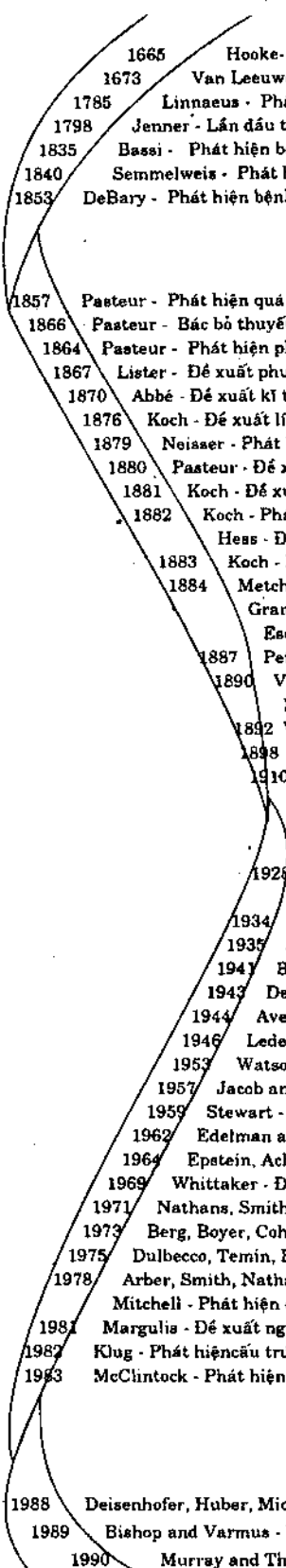


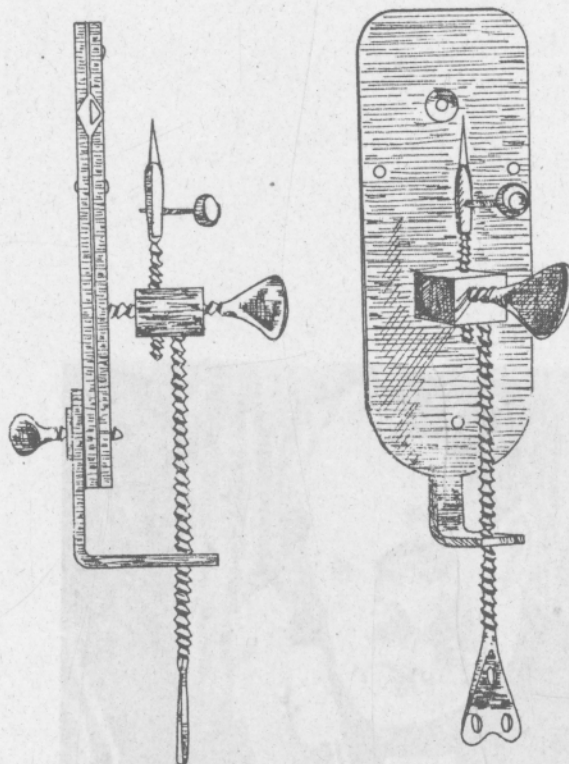
Tiến hóa của sinh giới



Hệ thống phân loại 3 lĩnh vực (domains) của Carl R. Woese

MỘT SỐ MỐC TRONG LỊCH SỬ VI SINH VẬT HỌC

- 
- 1665 Hooke - Lần đầu tiên quan sát thấy tế bào
 1673 Van Leeuwenhoek - Lần đầu tiên quan sát thấy vi sinh vật sống
 1785 Linnaeus - Phân loại các sinh vật
 1798 Jenner - Lần đầu tiên tiêm chủng vaccin để phòng bệnh đậu mùa
 1835 Bassi - Phát hiện bệnh nấm của tằm
 1840 Semmelweis - Phát hiện sốt ở trẻ sơ sinh do nhiễm khuẩn
 1853 DeBary - Phát hiện bệnh nấm ở thực vật
 1857 Pasteur - Phát hiện quá trình lên men
 1866 Pasteur - Bác bỏ thuyết tự sinh
 1864 Pasteur - Phát hiện phương pháp khử trùng kiểu Pasteur
 1867 Lister - Đề xuất phương pháp phẫu thuật vô trùng
 1870 Abbé - Đề xuất kĩ thuật kính hiển vi soi dầu
 1876 Koch - Đề xuất lí thuyết mầm bệnh (Germ theory)
 1879 Neisser - Phát hiện lậu cầu
 1880 Pasteur - Đề xuất các kĩ thuật gây miễn dịch
 1881 Koch - Đề xuất phương pháp phân lập thuần khiết vi sinh vật
 1882 Koch - Phát hiện trực khuẩn lao
 Hess - Đề xuất môi trường thạch (Môi trường đặc)
 1883 Koch - Phát hiện vi khuẩn tả
 1884 Metchnikoff - Đề xuất học thuyết thực bào
 Gram - Đề xuất phương pháp nhuộm Gram
 Escherich - Phát hiện trực khuẩn coli
 1887 Petri - Đề xuất dùng hộp lồng (Hộp Petri)
 1890 Von Bering - Phát hiện kháng độc tố bạch cầu
 Ehrlich - Đề xuất lí thuyết miễn dịch
 1892 Winogradsky - Đề xuất chu trình lưu huỳnh
 1898 Shiga - Phát hiện trực khuẩn lỵ
 1910 Ehrlich - Phát hiện xoắn thể giang mai
 1928 Fleming, Chain, Florey - Khám phá ra Penicillin
 Griffith - Phát hiện hiện tượng biến nạp (Transformation)
 1934 Lancefield - Phát hiện kháng nguyên của liên cầu khuẩn
 1935 Stanley, Northrup, Sumner - Phát hiện vi rút kết tinh (Crystallized virus)
 1941 Beadle and Tatum - Đề xuất mối quan hệ giữa gen và enzym
 1943 Delbruck and Luria - Sự xâm nhiễm của vi rút vào vi khuẩn
 1944 Avery, MacLeod, McCarty - Chứng minh vật liệu di truyền là ADN
 1946 Lederberg and Tatum - Phát hiện hiện tượng tiếp hợp
 1953 Watson and Crick - Khám phá ra cấu trúc của ADN
 1957 Jacob and Monod - Phát hiện sự điều hòa tổng hợp Protein
 1959 Stewart - Nguyên nhân virut đối với ung thư
 1962 Edelman and Porter - Phát hiện kháng thể
 1964 Epstein, Achong, Barr - Phát hiện ra virut Epstein-Barr gây ung thư ở người
 1969 Whittaker - Đề xuất hệ thống phân loại 5 giới sinh vật
 1971 Nathans, Smith, Arber - Phát hiện men Pesticidaza (Dùng trong kĩ thuật di truyền)
 1973 Berg, Boyer, Cohen - Đề xuất kĩ thuật di truyền
 1975 Dulbecco, Temin, Baltimore - Phát hiện men Transcriptaza ngược
 1978 Arber, Smith, Nathans - Phát hiện men Endonuclease giới hạn
 Mitchell - Phát hiện cơ chế thẩm thấu hóa học
 1981 Margulis - Đề xuất nguồn gốc các tế bào có nhân thật
 1982 Klug - Phát hiện cấu trúc của virut đậu thuốc lá (Khảm thuốc lá)
 1983 McClintock - Phát hiện gen nhảy
 1988 Deisenhofer, Huber, Michel - Phát hiện các sắc tố quang hợp vi khuẩn
 1989 Bishop and Varmus - Phát hiện gen ung thư (Oncogenes)
 1990 Murray and Thomas - Ghép cơ quan của cơ thể



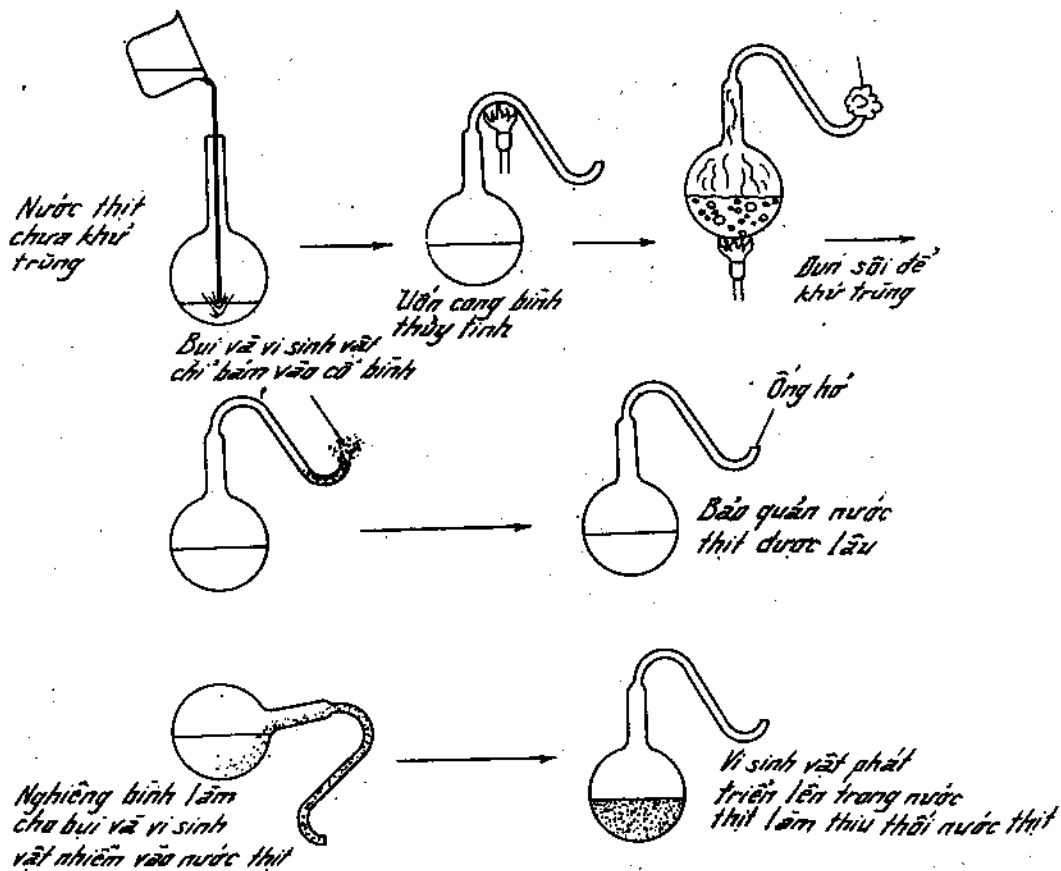
Kính hiển vi của Leeuwenhoek



Anton van Leeuwenhoek (1632-1723)



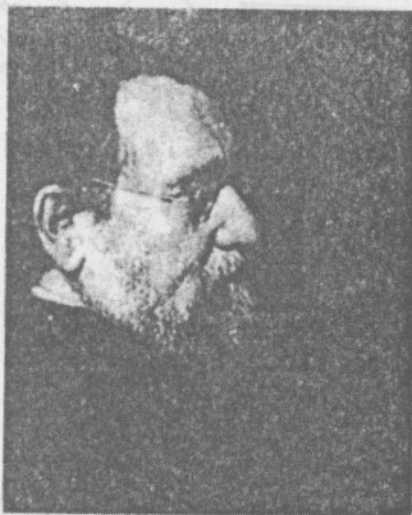
Louis Pasteur (1822 - 1895)



Thí nghiệm bác bỏ thuyết tự sinh



Robert Koch (1843-1910)



Ilja Ilitch Metchnikov (1845-1916)

CHƯƠNG II

HÌNH THÁI VÀ CẤU TẠO TẾ BÀO CÁC VI SINH VẬT NHÂN NGUYÊN THỦY (PROKARYOTES)

Vi sinh vật nhân nguyên thủy bao gồm : Vi khuẩn thật (Eubacteria) và vi khuẩn cổ (Archaeobacteria). Trong vi khuẩn thật lại gồm rất nhiều nhóm khác nhau. Những nhóm chủ yếu là vi khuẩn (Bacteria), xạ khuẩn (Actinomycetes), vi khuẩn lam (Cyanobacteria) và nhóm vi khuẩn nguyên thủy Micoplatma (Mycoplasma), Ricketxi (Rickettsia), Clamidia (Chlamydia).

1. VI KHUẨN

1.1. Hình thái, kích thước, nhuộm màu

Vi khuẩn có nhiều hình thái, kích thước và cách sắp xếp khác nhau. Đường kính của phần lớn vi khuẩn thay đổi trong khoảng $0,2 - 2,0\mu\text{m}$, chiều dài cơ thể khoảng $2,0 - 8,0\mu\text{m}$. Những hình dạng chủ yếu của vi khuẩn là hình cầu, hình que, hình dấu phẩy, hình xoắn, hình có cuống, hình có sợi ...

Ở vi khuẩn hình cầu (cầu khuẩn - *Coccus*, số nhiều là Cocci, từ chữ Hi Lạp Kokkys là quả mọng) tùy theo phương hướng của mặt phẳng phân cắt và cách liên kết mà ta có : Song cầu khuẩn (*Diplococcus*), Liên cầu khuẩn (*Streptococcus*) tứ cầu khuẩn (*Gaffkya*), tụ cầu khuẩn (*Staphylococcus*). Ở vi khuẩn hình que - trực khuẩn (*Bacillus*), (nghĩa tiếng La Tinh là que ngắn) ; *Bacterium*, (từ chữ Hi Lạp Bakterion là que ngắn) có thể gặp dạng đơn, dạng đôi, dạng chuỗi...

Ở vi khuẩn hình xoắn có dạng hình dấu phẩy : Phẩy khuẩn (*Vibrio*), hình xoắn thưa (xoắn khuẩn - *Spirillum*), hình xoắn khít (xoắn thể - *Spirochaetes*).

Còn có thể gặp các hình dạng khác ở vi khuẩn (hình khối vuông, khối tam giác, khối hình sao...). Chi *Beggiatoa* và *Saprospira* có tế bào nối dài thành dạng sợi, chi *Caryophanon* có tế bào hình đĩa xếp lồng vào nhau như một xâu các đồng xu...

Mỗi tế bào vi khuẩn đều rất nhỏ và rất nhẹ. Lấy trực khuẩn đại tràng *Escherichia coli* làm ví dụ. Vi khuẩn này có kích thước $2,0 \times 0,5\mu\text{m}$, 1 tỉ vi khuẩn này mới có 1mg mà thôi.

Vi tế bào vi khuẩn vừa rất nhỏ bé, vừa trong suốt cho nên nếu soi tươi (phương pháp giọt treo) dưới kính hiển vi chỉ có thể thấy được đại thể về hình dạng và tình trạng di động. Muốn quan sát kĩ hơn dưới kính hiển vi quang học cần phải nhuộm màu. Có rất nhiều phương pháp nhuộm màu, các phương pháp chính gồm có :

A. Phương pháp nhuộm vi khuẩn chết bao gồm :

(a). Phương pháp nhuộm ảnh dương

1. Phương pháp nhuộm đơn

2. Phương pháp nhuộm phân biệt

- Phương pháp nhuộm Gram
- Phương pháp nhuộm kháng axit
- Phương pháp nhuộm bào tử nội sinh
- Phương pháp nhuộm Giemsa.

(b). Phương pháp nhuộm ảnh âm. Chẳng hạn dùng mực tàu để làm nổi lên bao nhầy (capsule) của vi khuẩn.

B. Phương pháp nhuộm vi khuẩn sống

Dùng thuốc nhuộm xanh metilen, thuốc nhuộm TTC (triphenyl tetrazolium chloride)

Đặc biệt quan trọng là phương pháp nhuộm Gram do nhà vi khuẩn học Đan Mạch Hans Christian Gram (1853-1938) phát minh ra từ năm 1884. Nhờ phương pháp này có thể phân biệt vi khuẩn ra thành 2 nhóm lớn : vi khuẩn Gram dương (gram - positive) và vi khuẩn Gram âm (gram - negative).

Đầu tiên cố định tiêu bản vi khuẩn bằng ngọn lửa rồi nhuộm thuốc nhuộm bằng dung dịch tím tinh thể (crystal violet) trong khoảng 1 phút. Rửa bằng nước. Nhuộm tiếp bằng dung dịch iốt (dung dịch Lugol) trong một phút. Rửa bằng nước. Phủ lên vết bôi dung dịch etanol 95% : axeton (1 : 1) trong khoảng 1 phút. Lại rửa bằng nước. Sau đó nhuộm tiếp bằng thuốc nhuộm màu đỏ (như safranin hay Fuchsin Ziehl) trong 30-60 giây. Rửa qua nước, để khô rồi soi kính. Nhóm vi khuẩn Gram dương có đặc tính không bị dung môi hữu cơ (etanol, axeton) tẩy phức chất màu giữa tím kết tinh và iốt. Kết quả cuối cùng sẽ bắt màu tím. Nhóm vi khuẩn Gram âm bị dung môi tẩy màu thuốc nhuộm đầu do đó sẽ bắt màu với thuốc nhuộm bổ sung (đỏ vàng với Safranin hay đỏ tía với Fuchsin). Gram dương và Gram âm thường được viết tắt là G^+ và G^- .

Đáng chú ý là 2 nhóm vi khuẩn Gram dương và Gram âm có rất nhiều đặc điểm khác nhau mà chúng ta sẽ xem xét tới trong các phần sau.

Dưới đây là một số ví dụ về các chi vi khuẩn thuộc Gram dương và Gram âm :

Gram dương : *Micrococcus*, *Deinococcus*, *Planococcus*, *Marinococcus*, *Saccharococcus* (cầu khuẩn hiếu khí), *Staphylococcus*, *Aerococcus*, *Enterococcus*, *Gemella*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Melisococcus*, *Stomatococcus*, *Streptococcus* (cầu khuẩn kỵ khí không bắt buộc), *Peptococcus*, *Coprococcus*, *Peptostreptococcus*, *Ruminococcus*, *Sarcina* (cầu khuẩn kỵ khí), *Brochothrix*, *Carnobacterium*, *Lactobacillus*, *Caryophanon*, *Erysipelothrix*, *Kurthia*, *Listeria*, *Renibacterium*, (trực khuẩn không sinh bào tử), *Arthrobacter*, *Aureobacterium*, *Brachybacterium*, *Brevibacterium*, *Caseobacter*, *Clavibacter*, *Curtobacterium*, *Deinobacter*, *Exiguobacterium*, *Jonesia*, *Microbacterium*, *Pimelobacter* (trực khuẩn không sinh bào tử có hình không đều, hiếu khí), *Actinomyces*, *Agromyces*, *Arcanobacterium*, *Cellulomonas*, *Corynebacterium*, *Gardnerella*, *Propionibacterium*, *Rarobacter*, *Rothia* (như nhóm trên nhưng kỵ khí không bắt buộc), *Acetogenium*, *Bifidobacterium*, *Butyrivibrio*, *Coriobacterium*, *Eubacterium*, *Lachnospira*, *Thermoanaerobacter* (như nhóm trên nhưng kỵ khí).

Gram âm : *Aquaspirillum*, *Azospirillum*, *Bdellovibrio*, *Campylobacter*, *Herbaspirillum*, *Oceanospirillum*, *Spirillum*, *Vampirovibrio* (phẩy khuẩn, xoắn khuẩn di

động), *Flectobacillus*, *Meniscus*, *Ancylobacter*, *Runella*, *Spirosoma* (hình cong, không di động), các chi thuộc các họ Pseudomonadaceae, Azotobacteraceae, Rhizobiaceae, Methylococcaceae, Acetobacteraceae, Legionellaceae, Neisseriaceae, các chi *Achromobacter*, *Acidiphilium*, *Agromonas*, *Alcaligenes*, *Alteromonas*, *Beijerinckia*, *Bordetella*, *Brucella*, *Curpriauidus*, *Deleya*, *Derxia*, *Flavobacterium*, *Francisella*, *Halomonas*, *Janthinobacterium*, *Lampropedia*, *Marinomonas*, *Methylobacillus*, *Methylobacterium*, *Methylophaga*, *Methylophilus*, *Mycoplana*, *Ochrobacterium*, *Paracoccus*, *Rugamonas*, *Serpens*, *Sphingobacterium*, *Taylorella*, *Thermomicrobium*, *Thermus*, *Weeksella*, *Xanthobacter* (cầu khuẩn, trực khuẩn hiếu khí), các chi thuộc các họ Enterobacteriaceae, Vibronaceae, Pasteurellaceae, Aeromonadaceae, các chi *Chromobacterium*, *Zymomonas*, *Streptobacillus*, *Cardiobacterium*... (trực khuẩn kỵ khí không bắt buộc) v.v...

1.2. Thành tế bào (cell wall)

Thành tế bào là lớp cấu trúc ngoài cùng, có độ rắn chắc nhất định để duy trì hình dạng tế bào, có khả năng bảo vệ tế bào đối với một số điều kiện bất lợi. Nồng độ đường và muối bên trong tế bào thường cao hơn bên ngoài tế bào (áp suất thẩm thấu tương đương với dung dịch glucosơ 10-20%) do đó tế bào hấp thu khá nhiều nước từ bên ngoài vào, nếu không có thành tế bào vững chắc thì tế bào sẽ bị vỡ. Khi thực hiện quá trình cơ nguyên sinh rồi quan sát dưới kính hiển vi tiêu bản tế bào vi khuẩn ta có thể nhìn thấy lớp thành tế bào. Quan sát dưới kính hiển vi điện tử càng thấy rõ hơn nhiều.

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

Thể nguyên sinh (protoplast). Sau khi dùng lizozim để phá vỡ thành tế bào hoặc dùng penixilin để ức chế việc tổng hợp thành tế bào có thể tạo ra những tế bào chỉ được bao bọc bằng màng tế bào chất. Thường chỉ gặp ở vi khuẩn G^+ .

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

Vi khuẩn dạng L (L - formes hay L - phase variants). Năm 1935 Viện nghiên cứu y học dự phòng Lister ở Anh phát hiện ra một dạng đột biến không có thành tế bào ở trực khuẩn *Streptobacillus moniliformis*. Tế bào của chúng phình to lên và rất mẫn cảm với áp suất thẩm thấu, trên môi trường đặc, khuẩn lạc nhỏ bé và có dạng ộp lết. Dạng chữ L ở đây là lấy chữ đầu của Lister Institute (Viện Lister). Nhiều vi khuẩn cả G^+ lẫn G^- đều có thể hình thành ra dạng L . Trước kia nhiều người đã nhầm lẫn, xếp cả thể nguyên sinh và thể cầu vào dạng L . Hiện nay ta chỉ coi dạng L là chủng vi khuẩn thiếu thành tế bào được sinh ra do đột biến trong phòng thí nghiệm và có thể mang tính di truyền ổn định.

Micoplatma. Một dạng vi khuẩn không có thành tế bào sinh ra trong quá trình tiến hóa lâu dài của tự nhiên (xem phần sau).

Thể nguyên sinh và thể cầu có các đặc điểm chung là không có thành tế bào, tế bào trở nên có hình cầu, rất mẫn cảm với áp suất thẩm thấu, có thể có tiên mao nhưng không di động được, không mẫn cảm với thể thực khuẩn (phage, bacteriophage), tế bào không phân cắt được... Nếu trước khi hình thành thể nguyên sinh và thể cầu đã có sự xâm nhập của thể thực khuẩn thì các thể thực khuẩn này vẫn sinh sôi nảy

nở và làm phá vỡ tế bào. Cũng như vậy nếu đang hình thành bào tử trước khi sinh ra thể nguyên sinh thì bào tử này vẫn được hình thành một cách bình thường.

Thành tế bào có các chức năng chủ yếu sau đây :

- Duy trì ngoại hình của tế bào
- Hỗ trợ sự chuyển động của tiên mao
- Giúp tế bào đề kháng với các lực tác động từ bên ngoài (chẳng hạn vi khuẩn G^+ chịu được áp suất thẩm thấu tới 15-20 atm, vi khuẩn G^- chịu được tới 5 - 10atm).
- Cần thiết cho quá trình phân cắt bình thường của tế bào.
- Cản trở sự xâm nhập vào tế bào của một số chất có hại (chẳng hạn thành tế bào vi khuẩn G^- có thể ngăn cản sự xâm nhập của các chất kháng sinh có khối lượng phân tử vượt quá 800).
- Có liên quan mật thiết đến tính kháng nguyên, tính gây bệnh, chẳng hạn như khả năng sinh nội độc tố, tính mẫn cảm với thể thực khuẩn...

Thành phần cấu tạo của thành tế bào rất phức tạp. Cấu trúc của thành tế bào vi khuẩn G^+ và G^- rất khác nhau. Có thể nhắc đến một sai khác chủ yếu như sau về tỉ lệ các thành phần của thành tế bào :

Thành phần	Tỉ lệ % đối với khối lượng khô của thành tế bào vi khuẩn	
	G^+	G^-
Peptidoglican	30-95	5-20
Axit teicoic	cao	0
Lipoit	hầu như không có	20
Protein	không có hoặc ít	cao

Peptidoglican là loại polime xốp, không tan, khá cứng và bền vững, bao quanh tế bào như một mạng lưới. Cấu trúc cơ bản của peptidoglican gồm có 3 thành phần : N - axetylglucozamin (N - acetylglucosamine), axit N - axetylmuramic và tetrapeptit chứa cả L và D axit amin.

Để tạo thành mạng lưới cứng, tetrapeptit trên mỗi chuỗi peptidoglican (PG) liên kết chéo với các tetrapeptit trên chuỗi khác. Đồng thời các thành phần của lưới phải được liên tục mở ra bởi các enzym autolizin để polime mới có thể lấp thêm vào và tế bào có thể sinh trưởng, phân cắt.

Ở các vi khuẩn G^- lớp ngoài cùng của thành phần tế bào là 2 lớp lipopolisaccarit có đan xen với các phân tử protein. Các protein này đã được chứng minh là có khả năng chống lại sự tấn công của các vi khuẩn khác. Thành tế bào cho phép các chất dinh dưỡng đi qua nhưng lại có thể ngăn cản sự xâm nhập của một số chất có hại đối với tế bào (thuốc nhuộm, một số chất kháng sinh, muối mật, muối kim loại nặng, một số enzym phân giải).

Thành tế bào vi khuẩn G^+ có thể bị phá hủy hoàn toàn để trở thành thể nguyên sinh khi chịu tác động của lizozim (có chứa trong lòng trắng trứng, nước mắt, nước muối, đờm của thể thực khuẩn...). Thành tế bào vi khuẩn G^- có sức đề kháng lớn hơn với lizozim do đó bị phá hủy ít hơn với lizozim.

Ở vi khuẩn G^+ có tới 50% trở lên khối lượng khô của thành tế bào là peptidoglican trong khi ở vi khuẩn G^- tỉ lệ này chỉ khoảng 5-10% mà thôi. Hiện đã biết được tới 100 kiểu peptidoglican khác nhau được gọi là cầu trung gian (interbridge). Một số axit amin không bao giờ thấy có trong các cầu trung gian chẳng hạn như valin, I-oxin, izoloxin, xixtein, metionin, histidin, acginin, prolin, phenylalanin, tirozin.

Axit teicoic là một thành phần đặc trưng của tế bào vi khuẩn G^+ . Chữ "teichoic" là từ tiếng Hi Lạp "teichos" là thành, vách. Axit teicoic là polime của ribitol và glixerol photphat liên kết với PG hoặc màng tế bào chất. Loại liên kết với màng tế bào chất được gọi là axit lipoteicoic. Do tích điện âm axit teicoic giúp cho việc vận chuyển các ion dương vào, ra tế bào và giúp tế bào dự trữ photphat. Ngoài ra axit teicoic còn liên quan đến kháng nguyên bề mặt và tính gây bệnh của một số vi khuẩn G^+ . Chúng còn gọi là thụ thể hấp phụ đặc biệt đối với một số thể thực khuẩn.

Vi khuẩn G^- có thành tế bào với cấu trúc khá phức tạp. Trong cùng là một lớp PG mỏng. Cách một lớp không gian chu chất là tới lớp màng ngoài. Màng ngoài có cấu trúc gần giống với màng tế bào chất nhưng photpholipit hầu như chỉ gặp ở lớp trong, còn lớp ngoài là lipopolisaccarit (LPS). LPS dày khoảng 8-10nm và cấu tạo bởi 3 thành phần như sau :

- Lipit A : 2 phân tử N - axetylglucozamin, 5 chuỗi dài axit béo

- + Polisaccarit lõi :

Vùng lõi trong :

- + 3 phân tử KDO (ketodexyosonic acid)

- + 3 phân tử Hep (L - glixerin - D - heptose)

Vùng lõi ngoài : Các phân tử hexozơ (bao gồm glucozamin, galactozơ, glucozơ).

- + Kháng nguyên O : Phần polisaccarit vươn khỏi màng vào môi trường, gồm các phân tử hexozơ (bao gồm galactozơ, ramnozơ, mannozơ, abequozơ).

Phần lipit A là nội độc tố của vi khuẩn, gây ra sốt, tiêu chảy, phá hủy hồng cầu và dẫn đến sốc (shock) nguy hiểm.

Kháng nguyên O quyết định nhiều đặc tính huyết thanh của các vi khuẩn có chứa LPS và là vị trí gắn (thụ thể) của thể thực khuẩn.

Màng ngoài của vi khuẩn G^- còn có thể có một số loại protein, đó là :

- Protein cơ chất (matrix protein) : Chẳng hạn porin ở vi khuẩn *Escherichia coli*. Porin còn gọi là protein lỗ. Các protein này nằm xuyên suốt qua màng ngoài và cho phép đi qua chúng một số loại phân tử như đường (nhất là disaccarit), axit amin, dipeptit, tripeptit, penixilin và các ion vô cơ.

- Protein màng ngoài (outer membrane protein, OMP) : OMP là loại protein có năng lực vận chuyển chuyên biệt một số phân tử khá lớn và đưa chúng đi qua màng ngoài, như vitamin B_{12} , nucleotit, fericro, enterokelin.

- Lipoprotein : Rất nhiều chủng loại, chủ yếu là các lipoprotein có khối lượng phân tử 7200. Chúng có vai trò liên kết giữa lớp PG bên trong với lớp màng ngoài.

- Lớp không gian chu chất : Lớp không gian chu chất không chỉ ở giữa lớp màng ngoài và lớp PG mỏng ở thành tế bào vi khuẩn G^- mà còn có ở giữa lớp thành tế bào và lớp màng tế bào chất của cả vi khuẩn G^+ lẫn G^- . Trong lớp này có nhiều loại, chẳng hạn proteinaza, nucleaza, protein vận chuyển qua màng, protein thụ thể (làm chỗ bám của thể thực khuẩn)...

Trong quá trình nhuộm Gram tế bào trước hết được xử lí với tím tinh thể rồi với iốt. Kết quả là có sự tạo thành phức chất tím tinh thể - iốt bên trong tế bào. Khi vi khuẩn G^- bị tẩy cồn, lipit của lớp màng ngoài bị hòa tan làm tăng tính thấm của màng dẫn đến sự rửa trôi phức chất tím tinh thể - iốt và làm cho vi khuẩn mất màu. Khi nhuộm bổ sung chúng sẽ bắt màu với thuốc nhuộm này (màu đỏ vàng hay đỏ tía). Ở vi khuẩn G^+ cồn làm cho các lỗ trong PG co lại do đó phức chất tím tinh thể - iốt bị giữ lại trong tế bào.

1.3. Màng tế bào chất (cytoplasmic membrane)

Màng tế bào chất còn được gọi là màng tế bào hay màng chất (cytoplasmic membrane), viết tắt là CM. CM dày khoảng 4-5nm.

CM cấu tạo bởi 2 lớp photpholipit (PL), chiếm khoảng 30-40% khối lượng và các protein nằm phía trong, phía ngoài hay xuyên qua màng chiếm 60-70% khối lượng. Mỗi phân tử PL chứa một đầu tích điện phân cực (đầu photphat) và một đuôi không tích điện, không phân cực (đầu hidrocarbon). Đầu phân cực tan trong nước nằm phía trong. Đầu photphat còn gọi là đầu háo nước còn đầu hidrocarbon còn gọi là đầu kỵ nước. Các PL trong màng làm màng hóa lỏng và cho phép các protein di động tự do. Sự hóa lỏng động học này là cần thiết cho các chức năng của màng. Cách sắp xếp của PL và protein như vậy gọi là mô hình khảm lỏng.

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

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

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

Ở CM ta còn gặp các enzym tham gia vào các quá trình tổng hợp lipit màng, PG, axit teicoic, LPS, và còn gặp cả các polisaccarit đơn giản.

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

Ở nhiều vi khuẩn, nhất là vi khuẩn G^+ , CM xâm nhập vào tế bào chất và tạo thành các hệ thống ống gọi là mezoxom. Mezoxom nằm gần CM hay đâm sâu vào trong tế bào chất. Loại thứ hai có lẽ gắn với NST và có chức năng nhất định trong quá trình sao chép ADN và quá trình phân bào. Mezoxom loại đầu có vai trò nhất định trong việc sinh penixilinaza và một số enzym khác.

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

Nhìn chung, CM có các chức năng sau đây :

- Khống chế sự vận chuyển trao đổi ra, vào tế bào của các chất dinh dưỡng, các sản phẩm trao đổi chất.
- Duy trì một áp suất thẩm thấu bình thường bên trong tế bào.
- Là nơi sinh tổng hợp các thành phần của thành tế bào (GP, LPS, axit teicoic) và các polime của vỏ nhầy.
- Là nơi tiến hành các quá trình photphoryl oxi hóa và photphoryl quang hợp.
- Là nơi tổng hợp nhiều loại enzym (β - galactozidaza, các enzym liên quan đến tổng hợp thành tế bào, vỏ nhầy, ATP - aza), các protein của chuỗi hô hấp.
- Cung cấp năng lượng cho sự vận động của tiên mao (lông roi, flagella).

1.4. Tế bào chất (cytoplasm)

Tế bào chất (TBC) là vùng dịch thể ở dạng keo chứa các chất hòa tan trong suốt và các hạt như riboxom, gồm khoảng 80% nước. Trong TBC có protein, axit nucleic, hidratcacbon, lipit, các ion vô cơ và nhiều chất có khối lượng phân tử thấp khác. TBC của vi khuẩn không di động bên trong tế bào cũng không chứa bộ khung tế bào tức là mạng lưới các sợi giúp duy trì hình dạng của tế bào. Điều này khác hẳn với TBC của các tế bào nhân thật.

Riboxom nằm tự do trong TBC chiếm tới 70% khối lượng khô của tế bào vi khuẩn. Phần có chức năng tổng hợp các protein tiết gắn với phía trong của màng tế bào chất. Riboxom gồm 2 tiểu phần : 50S và 30S. Hai tiểu phần này kết hợp với nhau tạo thành monoxom 70S. S là đơn vị Svedberg, đại lượng đo tốc độ lắng của các hạt trong một huyền dịch khi li tâm cao tốc. Riboxom của vi khuẩn chịu tác động của nhiều chất kháng sinh như streptomixin, neomixin, tetraxiclin...

Trong môi trường giàu cacbon nhưng nghèo nitơ tế bào chất của nhiều vi khuẩn thường tích lũy các chất dự trữ. Các chất này không tan trong nước và trở về áp suất thẩm thấu.

Có thể chia các chất dự trữ thành các nhóm như sau :

A - Chất hữu cơ

(a). Nguồn C và năng lượng :

+ Glicogen

+ PHB (poly - β - hydroxybutyrate)

(b). Nguồn N :

+ Xianophixin

+ Phicoxianin

B - Chất vô cơ

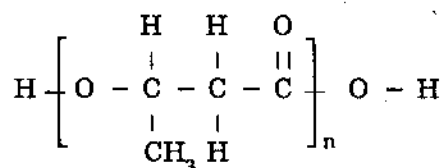
(a). Hạt dị nhiễm(metachromatic body)

(b). Hạt lưu huỳnh

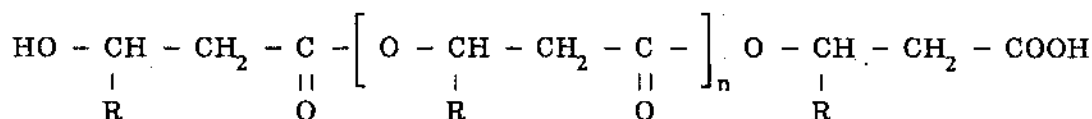
Khí nuôi cấy *Bacillus megatherium* trên môi trường có chứa axit axetic vì axit butiric lượng PHB tích lũy trong tế bào có thể đạt tới 60% khối lượng khô. Trong nang xác (kyste) của *Azotobacter* cũng có thấy có PHB.

11/10/196

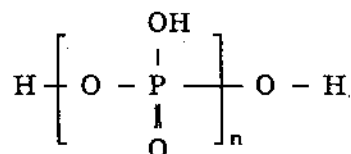
Công thức chung của PHB như sau :



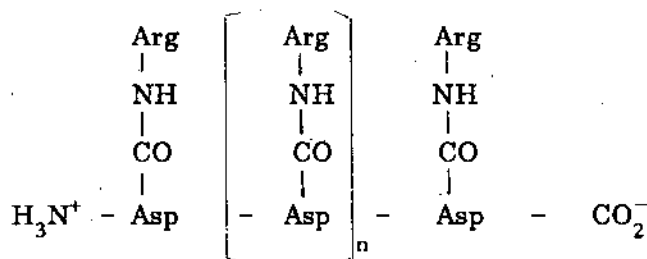
PHB ở vi khuẩn thường có số n khoảng 60. Gần đây ở nhiều vi khuẩn G^+ và G^- hiếu khí, vi khuẩn quang hợp kỵ khí người ta thấy những hợp chất tương tự như PHB nhưng gốc CH_3 có thể thay thế bằng một gốc R nào khác. Đó là chất polihidroxialkanoat :



Hạt dị nhiễm lần đầu phát hiện thấy trong tế bào vi khuẩn *Spirillum volutans*. Kích thước của hạt dị nhiễm vào khoảng 0,5-1,0 μm , có vai trò dự trữ P và năng lượng, cũng có thể giúp làm giảm thấp áp suất thẩm thấu. Kết cấu hóa học như sau :



Xianophixin có dạng hạt. Đó là một peptit phân nhánh của acginin và axit aspactic (tỉ lệ = 1 : 1), khối lượng phân tử khoảng 25.000 - 125.000. Xianophixin của *Anabaena cylindrica* có cấu trúc như sau :



Ở một số vi khuẩn tự dưỡng hóa năng còn thấy có trong tế bào chất những hạt nhưng không phải là chất dự trữ. Đó là cacboxixom. Chúng có kích thước như phần đầu của thể thực khuẩn (khoảng 10nm). Có thể thấy dễ dàng các hạt này ở tế bào các vi khuẩn *Thiobacillus thioparus*, *Thiobacillus neapolitanus*, *Beggiatoa* spp.,... Cacboxixom có vai trò nhất định trong quá trình cố định CO_2 ở các vi khuẩn tự dưỡng. Cacboxixom chứa ADN, ribulozơ - bis - P - cacboxylaza / oxigenaza.

Những loại hạt như vậy cùng với các hạt chất dự trữ đều được gọi là các thể ẩn nhập. Thuộc về các thể ẩn nhập còn có không bào khí, tinh thể diệt côn trùng...

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

Rhodopseudomonas ; các chi vi khuẩn lam như *Anabaena*, *Gloetrichia*, *Microcystis*, *Oscillatoria*...

Tinh thể diệp côn trùng có hình quả trám, có bản chất protein và có mặt trong tế bào một số vi khuẩn như *Bacillus thuringiensis*, *B. sphaericus*, *B. lentimorbus*...

1.5. Thể nhân (nuclear body)

Thể nhân là nhân nguyên thủy chưa có màng nhân đặc trưng cho các cơ thể thuộc giới Monera (hay Prokaryota). Thể nhân còn gọi là vùng nhân, thể giống nhân. Khi nhuộm bằng thuốc thử Feulgen có thể quan sát thấy thể nhân có hình dạng bất định và bắt màu tím. Thể nhân của vi khuẩn là một nhiễm sắc thể (NST) duy nhất cấu tạo bởi một sợi ADN xoắn kép (tuy nhiên ở *Streptomyces* cũng gặp NST ở dạng thẳng) còn gắn với màng tế bào chất. Như vậy là phần lớn các tế bào của sinh vật nhân nguyên thủy là tế bào đơn bội. NST của vi khuẩn có chiều dài thay đổi trong khoảng 0,25-3,0 μm (chiều dài ADN của vi khuẩn *E.coli* là khoảng 1 μm). NST của vi khuẩn chứa 6,6-13,0 $\times 10^6$ cặp bazơ nitơ. NST của vi khuẩn *E.coli* gồm 4,6 $\times 10^6$ cặp bazơ và có khối lượng phân tử là 3 $\times 10^9$. Số lượng hệ gen hay genom trong tế bào vi khuẩn thay đổi tùy thuộc vào loài và điều kiện nuôi cấy. Khi nuôi cấy tĩnh tế bào *E.coli* chứa 1 - 4 genom, tế bào *Azotobacter chroococcum* chứa 20-40 genom, tế bào *Desulfovibrio gigas* chứa 10-15 genom.

Ngoài NST, nhiều vi khuẩn còn có chứa ADN ngoài nhiễm sắc thể. Đây cũng là những sợi ADN kép, dạng vòng kín, có khả năng sao chép độc lập và gọi là plasmid. Một số xạ khuẩn, liên cầu khuẩn và *Nocardia opaca* có chứa loại plasmid này bằng cơ chế nào mà tránh được sự phân giải của enzym exonucleaza.

Thể nhân là cơ sở vật chất chứa đựng thông tin di truyền của vi khuẩn.

1.6. Bao nhầy (capsule)

Ở một số loài vi khuẩn bên ngoài thành tế bào còn có một lớp bao nhầy hay còn gọi là giáp mạc. Đó là một lớp vật chất dạng keo, có độ dày bất định.

Căn cứ vào mức độ kích thước của vỏ nhầy mà người ta chia thành :

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

Khối nhầy thực chất là các bao nhầy liên kết lại với nhau mà tạo thành.

Khi quan sát dưới kính hiển vi người ta dùng phương pháp nhuộm bằng mực tàu để thấy rõ bao nhầy màu trắng nổi lên trên một nền đen.

Thành phần chủ yếu của bao nhầy là polisaccarit, ngoài ra còn có polipeptit và protein. Bao nhầy polisaccarit chiếm tỉ lệ lớn (*Streptococcus mutans*, *Streptococcus salivarius*, *Xanthomonas*, *Corynebacterium*...). Ngoài glucosơ trong bao nhầy polisaccarit còn có glucosamin, ramnozơ, axit 2 keto - 3 deoxigalacturonic, axit uronic, axit piruvic, axit axetic.

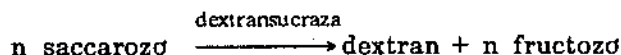
Ở vi khuẩn *Acetobacter xylinum* bao nhầy cấu tạo bởi xenlulozơ. Người ta dùng loại bao nhầy này để ăn khi nuôi cấy *A.xylinum* trên nước dừa. Loại sản phẩm có hương vị củi vải, củi nhãn này có tên gọi là "Nato de coco".

Bao nhầy của một số loài *Bacillus* (như *Bacillus anthracis*, *B. subtilis*...) cấu tạo bởi polipeptit, chủ yếu là axit poliglutamic.

Vi khuẩn *Leuconostoc mesenteroides* có lớp bao nhầy rất dày, tạo thành khối nhầy. Dạng này cũng gặp ở vi khuẩn *Acinetobacter*.

Vi khuẩn *Streptococcus pneumoniae* (typ VI) có bao nhầy chứa hetero polisaccarit, bao gồm các monome là glucozo, galactozo và ramnozo.

Bao nhầy của *Leuconostoc mesenteroides* cấu tạo bởi một loại polisaccarit là dextran, một polime được sản xuất để thay thế tạm huyết tương khi cấp cứu người mất máu nhiều. Mặt khác vì phá hủy đường saccarozo để tạo ra dextran cho nên vi khuẩn này có thể gây tác hại lớn cho các nhà máy đường nếu bị nhiễm vào các bể chứa nước ép mía. Cơ chế của quá trình tổng hợp dextran từ saccarozo là như sau :



Sản phẩm dextran - Fe được dùng làm thuốc bổ máu trong chăn nuôi.

Bao nhầy có thể có các chức năng sau đây :

- Bảo vệ vi khuẩn tránh bị thương tổn khi khô hạn, bảo vệ tránh khỏi hiện tượng thực bào (phagocytosis) của bạch cầu.

- Dự trữ thức ăn, để phòng khi thiếu thức ăn có thể sử dụng vỏ nhầy như nguồn chất dinh dưỡng.

- Tích lũy một số sản phẩm trao đổi chất.

- Nhờ bao nhầy và một số cấu tạo có liên quan mà giúp cho vi khuẩn bám được vào bề mặt của một số giá thể. Ví dụ trường hợp các vi khuẩn gây sâu răng *Streptococcus salivarius* và *Streptococcus mutans* đã sinh ra enzym hexozo transpheraza làm tạo ra hợp chất polime của fructozo, giúp cho vi khuẩn bám được trên bề mặt của răng, lên men đường sinh axit lactic và dần dần làm hỏng men răng, gây sâu răng. Bao nhầy tạo thành bao ở một số loài vi khuẩn thủy sinh đóng vai trò bám giữ vào các giá thể trong nước.

Ngoài Nato de coco, dextran, hiện nay người ta còn có nhiều ứng dụng quan trọng khác đối với bao nhầy. Chẳng hạn việc chế tạo ra sephadex để làm sắc kí phân tách, việc sản xuất xantan (xanthan, X_p) để làm chất phụ gia trong công nghệ dầu mỏ...

1.7. Tiên mao (flagella) và khuẩn mao (pilus hay fimbria)

Tiên mao (hay lông roi) là những sợi lông dài, uốn khúc, mọc ở mặt ngoài một số vi khuẩn và có tác dụng giúp các vi khuẩn này có thể chuyển động trong môi trường lỏng. Nhờ sự chuyển động của tiên mao mà có thể giúp cho vi khuẩn di động trong dịch lỏng với tốc độ khoảng $100\mu\text{m/s}$ (gấp 3000 lần chiều dài cơ thể/phút).

Quan sát tiên mao dễ dàng nhất là sử dụng kính hiển vi điện tử. Muốn thấy được dưới kính hiển vi phải xử lí tiêu bản và nhuộm theo những phương pháp nhuộm tiên mao đặc biệt. Khi quan sát sự di động của vi khuẩn trong giọt treo (dùng loại phiến kính đặc biệt có chỗ lõm ở giữa) ta có thể biết được từng loại vi khuẩn có tiên mao hay không ? Khi cấy trích sâu bằng que cấy đầu nhọn trên môi trường thạch mềm (chỉ chứa 0,4% aga - aga) cũng có thể xác định được khả năng di động nhờ tiên mao của vi khuẩn. Quan sát khuẩn lạc của vi khuẩn mọc trên môi trường đặc cũng có thể phán đoán được về khả năng sinh tiên mao của chúng. Nếu khuẩn lạc mỏng, lan nhanh, mép không đều, hình không tròn thì chứng tỏ đó là loại vi khuẩn có tiên mao và có

khả năng di động. Ngược lại nếu khuẩn lạc rất tròn, mép phẳng, khá dày thì thường là khuẩn lạc của các vi khuẩn không có tiên mao và không di động.

Tiên mao của vi khuẩn gồm các phần chủ yếu sau đây (lấy ví dụ ở vi khuẩn G^-) :

Thế gốc : gồm một trụ nhỏ được gắn với 4 đĩa tròn có dạng vòng, kí hiệu là L, P, S và M. Vòng L nằm ở ngoài cùng, tương ứng với lớp LPS của màng ngoài. Vòng P tiếp theo về phía trong, tương ứng với lớp PG. Vòng S ở sâu hơn, tương ứng với lớp không gian chu chất. Ở vi khuẩn G^+ chỉ thấy có 2 vòng gọi là vòng protein ngoài (nằm ở vị trí thành tế bào) và vòng protein trong (nằm ở vị trí màng tế bào chất). Trụ nhỏ (rod) xuyên chính giữa các vòng. Giữa vòng P và L còn có ống hình trụ nối 2 vòng với nhau. Bao bọc bên ngoài tiên mao ở phần phía ngoài lớp LPS là một bao hình móc (hook). Sợi tiên mao (filament) có chiều dài khoảng 10-20 μ m và có đường kính khoảng 13,5nm (đường kính ngoài của bao hình móc là 17nm). Khoảng cách giữa vòng S và vòng M là 3nm, giữa vòng P và vòng L là 9nm, giữa vòng P và vòng S là 12nm. Đường kính của các vòng là 22,5nm. Đường kính trụ nhỏ là 7nm. Đường kính lỗ ở các vòng là 10nm. Khoảng cách từ mặt ngoài của vòng L đến mặt trong của vòng M là 27nm.

Tiên mao hoạt động theo cách quay như kiểu vận nút chai. Nhờ các phản ứng hóa học mà các vòng của thế gốc có thể làm quay tiên mao. Bao hình móc giữ cho sợi tiên mao quay đều đặn quanh một trục dọc.

Sợi tiên mao cấu tạo bởi các phân tử của một loại protein đặc biệt gọi là flagellin. Các protein này được tổng hợp trong tế bào chất, sau đó chuyển qua trụ nhỏ (rỗng) mà dẫn đến sợi.

Không phải mọi vi khuẩn đều có tiên mao. Số lượng và vị trí gắn của tiên mao trên tế bào có giá trị trong phân loại, định tên vi khuẩn.

Có những hình thức khác nhau sau đây :

A. Mọc ở cực (cực mao)

(a). Mọc ở 1 cực :

+ Chỉ có 1 sợi (monotrichous) : ví dụ ở vi khuẩn *Vibrio cholerae*, *Bdellovibrio* spp., *Pseudomonas diminuta*...

+ Có 1 chùm (lophotrichous) : ví dụ ở *Pseudomonas fluorescens*.

(b). Mọc ở 2 cực (amphitrichous) :

+ Chỉ có 1 sợi : ví dụ ở *Spirochaeta morsusmaris*

+ Có 1 chùm : ví dụ ở *Spirillum rubrum*, *Spirillum serpens*.

B. Mọc khắp xung quanh bề mặt tế bào (peritrichous, chu mao) : Ví dụ ở các chi *Salmonella*, *Proteus*, *Escherichia*, *Shigella*, *Bacillus*, *Clostridium*...

C. Mọc từ giữa tế bào : Ví dụ ở *Selenomonas ruminantium*.

Xoắn thể (*Spirochaeta*) có dạng tiên mao đặc biệt gọi là tiên mao chu chất, xuất phát từ cực tế bào và quấn quanh cơ thể, phía dưới màng ngoài của thành tế bào. Tiên mao chu chất còn được gọi là sợi trục. Chúng sẽ giúp cho xoắn thể chuyển động được nhờ sự uốn vận tế bào theo kiểu vận nút chai.

Vi khuẩn di động trong môi trường lỏng theo kiểu nào phụ thuộc vào nhiều lí do khác nhau. Nhiều khi hoàn toàn là ngẫu nhiên. Cũng không ít trường hợp là do tìm đến hoặc tránh khỏi một yếu tố nào đó. Ví dụ tìm đến nguồn thức ăn, tìm tới chỗ có ánh sáng, tìm đến chỗ ẩm áp, tránh chỗ có axit, tránh chỗ nóng, tránh chỗ có hóa

chất độc hại... Nếu vi khuẩn tìm đến hoặc tránh khỏi một tác nhân hóa học thì hiện tượng đó được gọi là hóa hướng động. Hóa chất có tính dẫn dụ vi khuẩn được gọi là chất dẫn dụ còn hóa chất gây ra hóa hướng động âm được gọi là chất xua đuổi. Cùng một chất có khi ở nồng độ thấp là chất dẫn dụ nhưng ở nồng độ cao lại là chất xua đuổi. Đưa một ống thủy tinh có chứa chất dẫn dụ hay chất xua đuổi vào một môi trường dịch thể có chứa vi khuẩn. Sau một thời gian rút ra và tiến hành phân tích số lượng vi khuẩn trong ống thủy tinh ta có thể xác định được hóa chất có chứa trong ống là chất dẫn dụ hay chất xua đuổi. Người ta đã tìm thấy những protein truyền cảm ở vi khuẩn. Đó là những protein hóa hướng động tiếp nhận methyl (MCP_s, methyl - accepting chemotaxis proteins) hay còn gọi là những chất truyền cảm. Những chất truyền cảm này sẽ dẫn đến những quá trình hóa học làm tiên mao chuyển động một cách định hướng tùy thuộc vào hóa hướng động dương tính hoặc âm tính.

Sự sắp xếp của tiên mao có liên quan đến kiểu di động của vi khuẩn. Tiên mao ở cực giúp vi khuẩn di động theo kiểu tiến lùi. Chúng đảo ngược hướng bằng cách đảo ngược hướng quay của tiên mao. Vi khuẩn chu mao chuyển động tới hướng nào thì các tiên mao lại hoạt động ở hướng ngược lại. Khi bố tiên mao tản ra vi khuẩn không bơi về một phía mà nhào lộn theo các hướng lung tung.

Tiên mao thường gặp ở các chi vi khuẩn như *Vibrio*, *Spirillum*, *Pseudomonas*, *Escherichia*, *Shigella*, *Salmonella*, *Proteus*... Ở *Clostridium*, *Bacterium*, *Bacillus*... có loại có tiên mao có loại không. Ở cấu khuẩn chỉ có một chi (chi *Planococcus*) có khả năng di động nhờ tiên mao.

Nói chung tốc độ di động của vi khuẩn có tiên mao là khoảng 20-80 μ m/giây, nghĩa là có thể gấp 20-30 lần so với chiều dài của cơ thể chúng.

Khuẩn mao (pilus hoặc fimbria) có khi còn gọi là nhung mao. Chúng rất ngắn, rất nhỏ (đường kính 7-9nm), rỗng giữa (đường kính trong 2-2,5nm), số lượng rất nhiều (250-300 sợi/tế bào), có bản chất protein. Vi khuẩn G⁻ thường có khuẩn mao. Kết cấu của chúng giản đơn hơn so với của tiên mao. Chức năng của khuẩn mao là giúp vi khuẩn bám giữ vào giá thể (màng nhầy của đường hô hấp, đường tiêu hóa, đường tiết niệu - sinh dục của người và động vật). Rất nhiều vi khuẩn G⁻ có khuẩn mao là các vi khuẩn gây bệnh (chẳng hạn vi khuẩn gây bệnh lậu *Neisseria gonorrhoeae*).

Có một loại khuẩn mao đặc biệt gọi là khuẩn mao giới tính (sex pilus, F - pilus, sex fimbria). Nó giống khuẩn mao nhưng dài hơn nhiều. Mỗi vi khuẩn có thể có 1 - 4 khuẩn mao giới tính. Công dụng của chúng là làm cầu nối giữa 2 tế bào khác giới tính và qua cầu nối này những đoạn ADN từ tế bào này được chuyển sang tế bào khác. Khuẩn mao giới tính còn là thụ thể để cho các thể thực khuẩn ARN hấp phụ.

Dưới đây là một số tính chất so sánh giữa tiên mao và khuẩn mao :

	Tiên mao	Khuẩn mao
- Thành phần	Protein tiên mao	Protein khuẩn mao
- Kích thước	0,1-0,2 \times 2-70 μ m	0,007-0,09 \times 0,5-20 μ m
- Số lượng	1 - vài trăm	1 - vài trăm
- Chức năng	Vận động	Bám giữ, tiếp hợp
- Nơi sinh ra	Thế gốc nằm trong thành tế bào	Tế bào chất

1.8. Bào tử (spore, endospore)

Một số vi khuẩn vào cuối thời kì sinh trưởng phát triển sẽ sinh ra bên trong tế bào một thể nghỉ có dạng hình cầu hay hình bầu dục được gọi là bào tử hay nội bào tử. Vì mỗi tế bào chỉ sinh ra có 1 bào tử cho nên đây không phải là loại bào tử có chức năng sinh sôi nảy nở như ở nấm.

Bào tử có tính kháng nhiệt, kháng bức xạ, kháng hóa chất, kháng áp suất thẩm thấu. Chẳng hạn bào tử của vi khuẩn gây bệnh ngộ độc thịt *Clostridium botulinum* đun sôi 100°C trong 5,0 - 9,5 giờ mới chết, phải ở 121°C mới chết được sau 10 phút. Tế bào dinh dưỡng của vi khuẩn *Clostridium thermosaccharolyticum* ở 50°C cũng chết rất nhanh, nhưng bào tử của chúng có thể chịu được nhiệt độ rất cao, đưa lên đến 132°C trong 4,4 phút mà mới chỉ giết được khoảng 90% tế bào. Năng lực đề kháng với bức xạ tử ngoại của bào tử thường gấp đôi của tế bào dinh dưỡng. Năng lực đề kháng với tia phóng xạ của bào tử *Bacillus megaterium* gấp 36 lần so với của tế bào dinh dưỡng vi khuẩn *E.coli*.

Trong thời kì nghỉ không thấy bào tử vi khuẩn thể hiện bất kì một hoạt lực trao đổi chất nào cả. Người ta gọi đó là trạng thái sống ẩn (cryptobiosis). Bào tử có thể giữ sức sống từ vài năm đến vài chục năm. Đã có những chứng cứ về việc duy trì sức sống 200-300 năm của bào tử vi khuẩn *Bacillus subtilis*. Trong đất đá trầm tích dưới đáy các hồ sâu có những bào tử vi khuẩn duy trì được sức sống tới 500-1000 năm. Đã có những thông báo tìm được những bào tử trong các tiêu bản khảo cổ cách đây 3000 năm mà vẫn duy trì được sức sống.

Chỉ có một số chi vi khuẩn có năng lực sản sinh bào tử : *Bacillus*, *Clostridium*, *Sporosarcina* (G^+) và *Desulfotomaculum* (G^-). *Bacillus* và *Clostridium* đều có hình que nhưng khác nhau ở chỗ loại trước sống hiếu khí và khi sinh bào tử không biến dạng hình thái tế bào, loại sau sống kỵ khí và khi sinh bào tử biến tế bào thành hình thoi, hình đinh ghim... *Sporosarcina* có hình khối gồm 8 cầu khuẩn. *Desulfotomaculum* là vi khuẩn khử lưu huỳnh có hình que cong, đứng riêng rẽ hay xếp thành chuỗi.

Ở vi khuẩn sinh bào tử thì nang bào là vỏ tế bào mẹ. Màng ngoài nằm ở ngoài cùng, đó là các phần còn sót lại của tế bào mẹ, khi có khi không, khi dày, khi xốp, chiếm khoảng 2-10% khối lượng khô của bào tử. Màng ngoài gồm có 2 lớp, lớp ngoài dày 6nm, lớp trong dày 19nm. Thành phần chủ yếu là lipoprotein, cũng có chứa một lượng nhỏ axit amin, có tính thẩm thấu kém. Đã có tài liệu phân tích thấy màng ngoài chứa 52% protein, 20% hidrat cacbon, 12,5% lipid ; 5,5% photphat và 3,8% chất khoáng. Có thể thấy rõ màng ngoài khi quan sát bào tử của vi khuẩn *Bacillus cereus*.

Lớp áo bào tử (spore coat) nằm dưới màng ngoài dày khoảng 3nm, cấu tạo bởi 3-15 lớp, chủ yếu là protein sừng (chiếm 50-80% protein tổng số của bào tử) và một ít photpholipoprotein. Áo bào tử có sức đề kháng rất cao với lizozim, proteinaza, các chất hoạt động bề mặt, có tính thẩm thấu kém đối với các cation.

Dưới áo bào tử là lớp vỏ bào tử. Vỏ bào tử chiếm thể tích rất lớn (36-60%) trong bào tử. Vỏ bào tử chứa một lượng lớn peptidoglican đặc biệt, ít liên kết chéo, ngoài ra còn có 7-10% (tính theo khối lượng khô của bào tử) chất dipicolinat canxi (DPA - Ca), không chứa axit teicoic. Áp suất thẩm thấu của lớp vỏ bào tử cao tới 20atm, lượng chứa nước là 70% (lượng chứa nước của tế bào dinh dưỡng là 80%), cao hơn nhiều so với lượng chứa nước bình quân trong bào tử (khoảng 40%).

Dưới lớp vỏ bào tử là lõi bào tử còn gọi là thể chất nguyên sinh của bào tử. Lõi cấu tạo bởi 4 thành phần : thành bào tử, màng bào tử, bào tử chất và vùng nhân.

ĐẠI HỌC
SÀI GÒN

Lượng chứa nước trong lõi rất thấp. Ngoài việc không thấy có axit teicoic nhưng lại có DPA - Ca trong bào tử chất, còn thì các thành phần khác của lõi bào tử cũng tương tự như ở các tế bào bình thường của vi khuẩn.

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

- Hình thành những búi chất nhiễm sắc.
- Tế bào bắt đầu phân cắt không đối xứng, tạo ra một vùng nhỏ gọi là tiền bào tử.
- Tiền bào tử hình thành 2 lớp màng, tăng cao tính kháng bức xạ.
- Lớp vỏ sơ khai hình thành giữa 2 lớp màng của bào tử sau khi đã tích lũy nhiều PG và tổng hợp DPA, tích lũy canxi. Tính chiết quang tăng cao.
- Kết thúc việc hình thành áo bào tử.
- Kết thúc việc hình thành vỏ bào tử. Bào tử bắt đầu thành thực, bắt đầu có tính kháng nhiệt.
- Bào nang vỡ ra, bào tử thoát ra ngoài.

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

- *Hoạt hóa* : Có thể hoạt hóa bằng cách nâng nhiệt trong thời gian ngắn, hạ thấp pH, xử lý bằng hóa chất khử. Chẳng hạn sau khi cho bào tử của *Bacillus subtilis* tồn tại ở trạng thái nghỉ 7 ngày ta xử lý ở 60°C trong 5 phút có thể làm xúc tiến sự nảy mầm. Cũng có khi phải hoạt hóa bằng cách xử lý ở 100°C trong 10 phút. Sau khi xử lý chuyển bào tử vào môi trường nuôi cấy thích hợp sẽ thực hiện được mục đích của hoạt hóa. Có một số hóa chất đặc biệt có thể xúc tiến quá trình nảy mầm của bào tử. Các chất này được gọi là thuốc nảy mầm. Thuộc về loại này có thể kể đến L - alanin, Mn^{2+} , chất hoạt động bề mặt, glucozơ... Cũng có những chất lại có tác dụng ức chế quá trình nảy mầm (ví dụ như D - alanin, natri bicacbonat...).

- *Nảy mầm* : Protein có chứa nhiều xixtein trong áo bào tử hóa xóp lên làm cho tăng tính thấm, xúc tiến sự hoạt động của enzym proteinaza. Khi đó lượng protein trong bào tử áo giảm xuống. Các cation bên ngoài có thể xâm nhập vào lớp vỏ bào tử và làm trương lớp vỏ lên, sau đó làm tan ra và tiêu thoái đi. Khi đó nước bên ngoài sẽ xâm nhập vào lớp lõi bào tử, làm cho lõi trương to lên, các loại enzym bắt đầu được hoạt hóa lên, bắt đầu quá trình tổng hợp thành tế bào. Trong quá trình nảy mầm các đặc tính chịu nhiệt, chiết quang cao... bắt đầu giảm dần, lượng BPA - Ca, axit amin, polipeptit dần dần mất đi, bắt đầu xảy ra việc tổng hợp ADN, ARN và protein trong lõi bào tử. Bào tử chuyển sang thành tế bào dinh dưỡng. Khi nảy mầm, bào tử mầm có thể đâm ra theo phía cực hoặc đâm ngang ra. Lúc đó thành tế bào còn rất mỏng và chưa hoàn chỉnh do đó nâng cao khả năng tiếp nhận thêm ADN ngoại lai để thực hiện quá trình biến nạp.

Về cơ chế kháng nhiệt của bào tử chưa có những giải thích thật đầy đủ. Những kết quả nghiên cứu gần đây của lý thuyết điều tiết thẩm thấu và trương vỏ (osmoregulatory expanded cortex theory) cho thấy do có sự chênh lệch cao về các cation và tính thấm nước giữa lớp áo và lớp vỏ của bào tử làm cho lớp vỏ có áp suất thẩm thấu cao, hút hết nước của lõi bào tử. Kết quả là lớp vỏ thì trương to lên còn các chất sống ở lõi

thì mất nước rất nhiều, khiến nâng cao được tính kháng nhiệt. Lớp vỏ bào tử chứa loại PG bào tử mang điện âm cao, lượng liên kết chéo thấp làm cho có áp suất thẩm thấu cao. Lúc đó lượng nước trong lớp vỏ tăng lên, thể tích cũng tăng lên. Với tổng thể tích bào tử mà nói thì lượng chứa nước không thấp nhiều lắm so với tế bào dinh dưỡng nhưng lại tồn tại sự chênh lệch lớn về lượng chứa nước giữa lớp vỏ và lớp lõi của bào tử, do đó có thể hiểu được vì sao tính chịu nhiệt của bào tử khác biệt rất xa so với tính chịu nhiệt của tế bào dinh dưỡng.

Cũng có lý thuyết cho rằng việc kết hợp của Ca^{2+} với DPA sẽ dẫn đến sự ngưng kết của các polime sinh học trong bào tử và do đó làm tăng khả năng chịu nhiệt của bào tử.

2. XẠ KHUẨN

Xạ khuẩn (Actinomycetes) là một nhóm vi khuẩn thật (Bacteria) phân bố rất rộng rãi trong tự nhiên. Trong mỗi g đất nơi chúng thường có trên 1 triệu xạ khuẩn (tính theo số khuẩn lạc mọc trên môi trường thạch). Phần lớn xạ khuẩn là các tế bào Gram dương, hiếu khí, hoại sinh, có cấu tạo dạng sợi phân nhánh (khuẩn ti). Xạ khuẩn được nghiên cứu một cách sâu sắc vì có thể sản sinh nhiều sản phẩm trao đổi chất quan trọng. Trong số 8000 chất kháng sinh hiện đã được biết đến trên thế giới thì trên 80% là do xạ khuẩn sinh ra. Xạ khuẩn còn được dùng để sản xuất nhiều loại enzym (như proteinaza, amilaza, xenulaza, glucoizomeraza...), một số vitamin và axit hữu cơ. Một số ít xạ khuẩn kỵ khí hoặc vi hiếu khí có thể gây ra các bệnh cho người, cho động vật và cho cây trồng. Một số xạ khuẩn (thuộc chi Frankia) có thể tạo nốt sần trên rễ một số cây không thuộc bộ Đậu và có khả năng cố định nitơ.

2.1. Vị trí của xạ khuẩn trong vi sinh vật

Trước thế kỉ 19 người ta xếp xạ khuẩn vào nấm. Về sau do nghiên cứu sâu hơn người ta mới thấy chúng có nhân nguyên thủy, có kích thước nhỏ bé như vi khuẩn nên xếp vào vi khuẩn thật.

Năm 1978 Gibbens và Murray chia các vi khuẩn nhân nguyên thủy thành 4 ngành : ngành Gracilicutes (gồm các vi khuẩn Gram âm), ngành Tenericutes (gồm xạ khuẩn và các vi khuẩn Gram dương), ngành Mendosicutes (gồm các vi khuẩn mà thành tế bào không chứa peptidoglican) và ngành Mollicutes (gồm các vi khuẩn chưa có thành tế bào).

Năm 1977 và 1980 Woese và cộng sự chia vi khuẩn nhân nguyên thủy thành 2 giới : giới Vi khuẩn thật (Eubacteria) tương đương với 3 ngành Gracilicutes, Tenericutes và Mollicutes theo Gibbens và Murray, giới Vi khuẩn cổ (Archaeobacteria) tương đương với ngành Mendosicutes.

Theo hệ thống phân loại của Bergey xuất bản gần đây (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 1994) thì xạ khuẩn có mặt trong tập 2 và tập 4. Trong tập 2 có chi *Mycobacterium* (thuộc họ Mycobacteriaceae) và các chi thuộc Nocardioform actinomycetes (bao gồm 9 chi *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Nocardioides*, *Pseudonocardia*, *Oerskovia*, *Saccharopolyspora*, *Micropolyspora*, *Promicromonospora*, *Intrasporangium*. Trong tập 4 thuộc về Nocardioform còn có *Faenia* (*Micropolyspora*), *Actinopolyspora*,

Saccharomonospora, *Amycolatopsis*, *Amycolata*. Thuộc về các xạ khuẩn có nang bao tử nhiều múi (multi-locular sporangia) có các chi *Geodermatophilus*, *Dermatophilus*, *Frankia*. Thuộc về các xạ khuẩn di động (*Actinoplanetes*) có các chi *Actinoplanes*, *Ampullariella*, *Pilimelia*, *Dactylosporangium*, *Micromonospora*. Thuộc về *Streptomyces* và các chi có liên quan gồm các chi *Streptomyces*, *Streptoverticillium*, *Kineosporia*, *Sporichthya*. Thuộc về nhóm xạ khuẩn *Madura* (*Maduromycetes*) có các chi *Actinomadura*, *Microbispora*, *Microtetraspora*, *Planobispora*, *Planomonospora*, *Streptosporangium*. Thuộc về xạ khuẩn đơn bào ưa nhiệt và các chi có liên quan gồm các chi *Thermomonospora*, *Actinosynnema*, *Nocardopsis*, *Streptoalloteichus*. Thuộc về xạ khuẩn ưa nhiệt có chi *Thermoactinomyces*. Thuộc về các chi xạ khuẩn còn lại có *Glycomyces*, *Kibdelosporangium*, *Kitasatospora*, *Saccharothrix*.

Ngoài các chi nói trên còn phải kể thêm 2 chi xạ khuẩn do Lechevalier (1986) phát hiện là *Amycolata*, *Amycolatopsis* và 4 chi xạ khuẩn do các nhà khoa học Trung Quốc (Nguyễn Kế Sinh, 1990) phát hiện là *Microstreptospora*, *Actinoalloteichus*, *Trichotomospora*, *Streptomycoides*.

2.2. Đặc điểm hình thái của xạ khuẩn

Hệ sợi của xạ khuẩn chia ra thành khuẩn ti cơ chất và khuẩn ti khí sinh. Chi *Actinomyces* và vài chi khác chỉ có khuẩn ti khí sinh. Loại khuẩn ti không mang bào tử được gọi chung là khuẩn ti dinh dưỡng.

Đường kính khuẩn ti xạ khuẩn thay đổi trong khoảng từ 0,2 - 1,0 μm đến 2 - 3 μm . Đa số xạ khuẩn có khuẩn ti không có vách ngăn và không tự đứt đoạn. Màu sắc của khuẩn ti ở xạ khuẩn hết sức phong phú. Có thể gặp các màu trắng, vàng, da cam, đỏ, lục, lam, tím, nâu, đen... Khuẩn ti cơ chất có thể tiết ra môi trường một số loại sắc tố. Có sắc tố tan trong nước, có sắc tố chỉ tan trong dung môi hữu cơ.

Khuẩn ti cơ chất phát triển một thời gian thì dài ra trong không khí thành những khuẩn ti khí sinh. Người ta còn gọi khuẩn ti khí sinh là khuẩn ti thứ cấp để phân biệt với khuẩn ti sơ cấp là loại khuẩn ti bắt đầu phát triển từ các bào tử nảy mầm.

Sau một thời gian phát triển trên đỉnh khuẩn ti khí sinh sẽ xuất hiện các sợi bào tử. Sợi bào tử có thể có nhiều loại hình dạng khác nhau : thẳng, lượn sóng, xoắn, mọc đơn, mọc vòng... Có loại mọc vòng đơn cấp, có loại mọc vòng hai cấp. Những đặc điểm này đều rất quan trọng khi định tên xạ khuẩn. Một số xạ khuẩn có sinh nang bào tử bên trong có chứa các bào tử nang.

Bào tử của xạ khuẩn được hình thành theo ba phương thức sau đây :

- Phương thức phát triển toàn bộ : toàn bộ hay một bộ phận của thành khuẩn ti hình thành ra thành của bào tử.
- Phương thức phát triển trong thành : thành bào tử sinh ra từ tầng nằm giữa màng nguyên sinh chất và thành khuẩn ti. Trường hợp này gặp ở *Planomonospora*.
- Phương thức phát triển bào tử nội sinh thật : thành khuẩn ti không tham gia vào quá trình hình thành ra bào tử. Trường hợp này gặp ở *Thermoactinomyces*.

Bào tử trần (conidiospore) của xạ khuẩn có thể có hình tròn, hình bầu dục, hình que, hình trụ... Hình dạng và kích thước của bào tử có vai trò quan trọng trong định tên xạ khuẩn. Bề mặt của bào tử xạ khuẩn có dạng trơn nhẵn, xù xì, có vẩy, có gai, có lông...

Một số xạ khuẩn có bao sợi là một bao mỏng bọc quanh bên ngoài khuẩn ti khí sinh, có thể thấy rất rõ khi phân hóa thành bào tử. Bao sợi được tạo thành từ các yếu tố sợi của ống rỗng.

Thành tế bào xạ khuẩn có dạng kết cấu lưới, dày khoảng 10 - 20nm, có tác dụng duy trì hình dáng của khuẩn ti và bảo vệ tế bào.

Căn cứ vào kết cấu hóa học người ta chia thành tế bào của xạ khuẩn ra thành 4 nhóm :

- Nhóm CW I : có chứa L, L-DAP (diaminopimelat) và glixin.
- Nhóm VW II : có chứa mezo-DAP (meso-diaminopimelat) và glixin.
- Nhóm CW III : chứa mezo-DAP.
- Nhóm CW IV : có chứa mezo-DAP, arabinozơ và galactozơ.

Thuộc nhóm CW I có *Streptomyces*, *Streptoverticillium*, *Sporichthya*, *Nocardioidea*.

Thuộc nhóm CW II có *Micromonospora*, *Actinoplanes*, *Ampullariella*.

Thuộc nhóm CW III có *Dermatophilus*, *Geodermatophilus*, *Frankia*, *Actinomadura*, *Nocardiosis*, *Microbispora*, *Thermoactinomyces*, *Thermomonospora*, *Planomonospora*, *Planobispora*, *Streptosporangium*, *Actinosynnema*.

Thuộc nhóm CW IV có *Nocaridia*, *Oerskovia*, *Promicromonospora*, *Pseudonocardia*, *Rhodococcus*, *Mycobacterium*, *Saccharomonospora*, *Saccharopopyspora*, *Actinopolyspora*.

Màng tế bào chất của xạ khuẩn dày khoảng 7,5 - 10,0nm. Chúng có cấu trúc và công năng cũng tương tự như màng tế bào chất của vi khuẩn.

Thế trung gian hay mezoxom nằm ở phía trong của màng tế bào chất (CM) và có hình phiến, hình bong hay hình ống. Công dụng của thế trung gian là làm tăng diện tiếp xúc của CM và do đó làm tăng cường hoạt tính enzym, tăng chuyển điện tử...

Các vật thể ẩn nhập trong tế bào chất của xạ khuẩn gồm có các hạt poliphosphat (hình cầu, bắt màu với thuốc nhuộm Soudan III), các hạt polisaccarit (bắt màu với dung dịch Lugol).

Bào tử trần là cơ quan sinh sản chủ yếu của xạ khuẩn. Bào tử trần được hình thành theo 2 phương thức khác nhau :

- Vách ngăn hình thành dần từ phía trong của CM và tiến dần vào trong tạo ra những vách ngăn không hoàn chỉnh sau đó sợi bào tử mới phân cắt thành các bào tử trần.

- Thành tế bào (CW) và CM đồng thời xuất hiện vách ngăn tiến dần vào phía trong và làm cho sợi bào tử phân cắt đồng thời tạo thành một chuỗi bào tử trần.

Khuẩn lạc và xạ khuẩn rất đặc biệt, nó không trơn ướt như ở vi khuẩn, nấm men mà thường có dạng thô ráp, dạng phấn, không trong suốt, có các nếp tỏa ra theo hình phóng xạ vì vậy mới có tên xạ khuẩn (actinomycetes, tiếng Hi Lạp : Aktis, aktinos là "tia", mykes là "nấm"). Dùng que cấy không di được khuẩn lạc của xạ khuẩn vì khuẩn ti cơ chất bám sâu vào trong thạch. Tuy vậy khuẩn lạc của xạ khuẩn cũng không thể lẫn được với khuẩn lạc của nấm vì khuẩn ti nấm có đường kính thường gấp tới 10 lần đường kính khuẩn ti xạ khuẩn.

3. VI KHUẨN LAM^(*)

Trước đây Vi khuẩn lam (Cyanobacteria) thường được gọi là Tảo lam (Cyanophyta hay blue algae) hay Tảo lam lục (blue green algae). Thực ra thì đây là một nhóm vi sinh vật nhân nguyên thủy thuộc vi khuẩn thật. Vi khuẩn lam có khả năng tự dưỡng quang năng nhờ chứa sắc tố quang hợp là chất diệp lục a. Quá trình quang hợp của vi khuẩn lam là quá trình photophoryl hóa quang hợp phi tuần hoàn, có giải phóng oxi như ở cây xanh. Quá trình này khác hẳn với quá trình photophoryl hóa quang hợp tuần hoàn không giải phóng oxi ở nhóm vi khuẩn kỵ khí màu tía không chứa lưu huỳnh trong tế bào thuộc bộ Rhodospirillales.

Vi khuẩn lam không thể gọi là tảo vì chúng khác biệt rất lớn với tảo : Vi khuẩn lam không có lục lạp, không có nhân thực, có ribosom 70S, thành tế bào có chứa peptidoglican do đó rất mẫn cảm với penixilin và lizozim.

Vi khuẩn lam phân bố rất rộng rãi trong tự nhiên. Đại bộ phận vi khuẩn lam sống trong nước ngọt và tạo thành thực vật phù du của các thủy vực. Một số phân bố trong những vùng nước mặn giàu chất hữu cơ hoặc trong nước lợ. Một số vi khuẩn lam sống cộng sinh, chẳng hạn loài *Anabaena azollae* cộng sinh trong bèo hoa dâu (*Azolla*), một số sống cộng sinh trong rễ các cây thuộc chi *Cycas*, *Gunera*, một số cộng sinh với nấm trong địa y. Nhiều vi khuẩn lam có khả năng cố định nitơ và có sức đề kháng cao với các điều kiện bất lợi cho nên có thể gặp vi khuẩn lam trên bề mặt các tảng đá hoặc trong vùng sa mạc. Người ta cho rằng vi khuẩn lam là "những sinh vật tiên phong", đã có những dấu hiệu của vi khuẩn lam ở những nơi có niên đại cách đây tới 3 tỉ năm. Đã tìm thấy vi khuẩn lam ở cả trong các suối nước nóng có nhiệt độ cao tới 87°C trong các vùng biển có nồng độ muối tới 0,7%. Ở đáy ao hồ thường gặp các chi vi khuẩn lam là *Oscillatoria*, *Lyngbya*. Ở bề mặt ao hồ vào mùa hè có lúc vi khuẩn lam (thường thuộc các chi *Microcystis*, *Merismopedia*, *Anabaena*) phát triển quá mạnh tạo ra hiện tượng "nước nở hoa". Khi đó nước có màu xanh xỉn và có mùi vị khó chịu, làm giảm lượng oxi trong nước, làm dơi động vật phù du, gây hại cho cá, nhiều khi ảnh hưởng tới nguồn nước cung cấp cho các đô thị, các khu công nghiệp.

Một số vi khuẩn lam vì có giá trị dinh dưỡng cao, có chứa một số hoạt chất có giá trị y học, lại có tốc độ phát triển nhanh, khó nhiễm tạp khuẩn vì thích hợp được với các điều kiện môi trường khá đặc biệt (ví dụ *Spirulina* thích hợp với pH rất cao) cho nên đã được sản xuất ở quy mô công nghiệp để thu nhận sinh khối. Tảo *Spirulina* đã được nuôi thử ở quy mô khá lớn từ nguồn nước khoáng ở Bình Thuận hoặc từ nguồn nước thải của nhà máy phân đạm Bắc Giang. Việc nuôi cấy tảo *Spirulina* từ nước thải của các bể khí sinh học (bể metan) có thể phát triển rộng lớn ở các vùng nông thôn để vừa góp phần cải thiện điều kiện môi trường sống vừa tạo ra nguồn thức ăn bổ sung cho chăn nuôi hoặc cho nghề nuôi tôm cá.

Những chủng vi khuẩn lam có hoạt tính cố định nitơ cao (thường thuộc các chi *Nostoc*, *Anabaena*, *Gloeotrichia*, *Tolypothrix*, *Scytonema*...) đã được sản xuất thành các chế phẩm dùng để lây nhiễm cho ruộng lúa nhằm giảm bớt việc tiêu dùng phân đạm hóa học. Các thực nghiệm ở một số vùng thuộc tỉnh Hà Tây cho thấy mỗi sào lúa có thể tiết kiệm được mỗi vụ tới 2 - 3kg ure. Trên thế giới người ta đã tìm được trên 100 loài vi khuẩn lam cố định nitơ, 40 loài trong số này đã được tìm thấy ở nước ta.

Vi khuẩn lam có hình dạng và kích thước rất khác nhau. Chúng có thể là đơn bào hoặc là dạng sợi đa bào.

(*) Phần này được biên soạn với sự cộng tác của GS. TS Dương Đức Tiến.

198.1178.
Theo hệ thống Bergey (1994) thì vi khuẩn lam được xếp vào 5 bộ khác nhau khá rõ rệt về hình thái :

- Bộ Chroococcales (gồm các chi *Chamaesiphon*, *Gloeobacter*, *Gloeotheca*) : đơn bào hoặc sống thành tập đoàn, sinh sản theo lối chia đôi tế bào (Binary fission).

- Bộ Pleurocapsales (gồm các chi *Dermocarpa*, *Xenococcus*, *Dermocarpella*, *Myxosarcina*, *Chroococcidiopsis*) : đơn bào phân cắt nhiều lần, có thể tạo thành dạng sợi, thường có dạng tản (thallus).

- Bộ Oscillatoriales (gồm các chi *Spirulina*, *Arthrospira*, *Oscillatoria*, *Lyngbya*, *Pseudanabaena*, *Starria*, *Crinalium*, *Microcoleus*) : đa bào, dạng sợi, không có các tế bào dị hình (heterocyst).

- Bộ Nostocales (gồm các chi *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Nodularia*, *Cylindrospermum*, *Nostoc*, *Scytonema*, *Calothrix*) : đa bào, dạng sợi, có các tế bào dị hình tham gia vào hoạt động cố định nitơ (nitrogen fixation).

- Bộ Stigonematales (gồm các chi *Chlorogloeopsis*, *Fischerella*, *Stigonema*, *Geitleria*) : đa bào, dạng sợi phân nhánh thực hay phân nhánh lưỡng phân, thường có dị tản (heterotrichous) nghĩa là có sự phân hóa ngang và thẳng.

Theo hệ thống phân loại của Gollerbac (1977) thì có bộ Chamaesiphonales nhưng không có bộ Oscillatoriales. Ông xếp các chi *Lyngbya*, *Oscillatoria*... vào bộ Nostocales.

Tế bào sinh dưỡng của vi khuẩn lam có thể có hình cầu, hình elip rộng, hình quả lê, hình trứng, hình kéo dài về một phía, hình elip kéo dài, hình thoi, hình ống. Có tế bào đường kính chỉ khoảng 1 μm (như chi *Synechococcus*) nhưng cũng có tế bào chiều ngang của sợi vượt quá 30 μm (như chi *Oscillatoria*).

Tế bào vi khuẩn lam gắn gũi với cấu tạo của vi khuẩn G⁻. Thành tế bào khá dày phân thành 2 tầng, tầng ngoài là tầng lipopolisaccarit, tầng trong là tầng peptidoglican. Nhiều vi khuẩn lam còn tiết ra bên ngoài một lớp bao nhầy có cấu tạo polisaccarit. Bao nhầy có thể có nhiều hình thái khác nhau : lớp dịch nhầy, vỏ nhầy, bao nhầy.

Bộ phận thực hiện quá trình quang hợp trong tế bào vi khuẩn lam được gọi là tilacoit (thylakoids), chúng có số lượng rất nhiều, có dạng bản xếp song song hay có dạng uốn khúc nằm ở gần màng tế bào chất. Trên màng của tilacoit có chứa chất diệp lục a, β -caroten, caroteno (như myxoxanthophyll, zeaxanthin, ...) và các thành phần có liên quan đến chuỗi chuyển điện tử trong quang hợp. Trên mặt ngoài của tilacoit có chứa phicobilixom (một cấu trúc protein có dạng đĩa cấu tạo với 75% phicoxianin, 12% phicoeritrin, 12% allophicoxianin. Sự hiện diện của phicobilixom và sự vắng mặt của clorophin b là đặc trưng của vi khuẩn lam và chứng tỏ vi khuẩn lam có nguồn gốc cổ xưa (trước khi xuất hiện clorophin b của thực vật).

Chức năng hấp thu ánh sáng được thực hiện bởi hai sắc tố là phicoxianin màu lam và phicoeritrin màu đỏ. Chúng đưa ánh sáng vào hệ thống quang hợp II còn clorophin a thì lại phát huy tác dụng trong hệ thống quang hợp I. Tùy điều kiện môi trường, ví dụ trong ánh sáng lam, lục thì việc tổng hợp phicoeritrin chiếm ưu thế, còn trong ánh sáng đỏ thì việc tổng hợp phicoxianin lại chiếm ưu thế. Nhờ đó mà vi khuẩn lam có khả năng thích ứng cao với từng sinh cảnh.

Các chất dự trữ gặp trong tế bào vi khuẩn lam là glicogen (glycogen), poli- β -hidroxibutirat (poly- β -hydroxybutyrate, PHB), volutin (poliphosphat), xianophixin (cyanophycin)...

Trong tế bào vi khuẩn lam có những cơ quan khá đặc trưng, đó là tế bào dị hình (dị hình bào, heterocyst), là bào tử nghỉ (akinetete), tảo đoạn (hormogonia), vi tiểu bào nang (mannocyst), hạt sinh sản (gonidium)...

Tế bào dị hình có thành dày, màu nhạt, không chứa sắc tố quang hợp, không chứa các hạt dự trữ, hình thành từ tế bào dinh dưỡng trên các vị trí khác nhau của sợi. Tế bào dị hình có thể hình thành đơn độc ở đầu sợi (như ở *Gloeotrichia*, *Cylindrospermum*) nhưng thường xếp thành dãy (từ 2 đến 10 tế bào dị hình). Tùy vị trí mà tế bào dị hình có một nút (khi ở đầu hay ở bên) hoặc 2 - 3 lỗ (khi nằm ở giữa). Những lỗ này có thành dày và nối tiếp giữa tế bào dị hình với các tế bào dinh dưỡng kế tiếp. Nhiều nghiên cứu cho biết tế bào dị hình là nơi có khả năng thực hiện quá trình cố định nitơ khi có oxy.

Bào tử nghỉ (hay bào tử tĩnh) là loại tế bào nằm ở đầu hoặc ở giữa sợi, có thành dày, màu thâm và có tác dụng chống chịu cao đối với các điều kiện bất lợi của môi trường sống.

Tảo đoạn (hay đoạn sợi liền) là chuỗi các tế bào ngắn được đứt ra từ sợi vi khuẩn lam. Đó là kiểu sinh sôi nảy nở đặc trưng của một số chi vi khuẩn lam. Tảo đoạn có khả năng chuyển động trong nước nhờ khả năng tiết ra chất nhầy. Khi dừng chuyển động tảo đoạn có thể phát triển thành một sợi mới. Trong tảo đoạn có thể gặp các không bào khí. Cấu trúc này giúp cho vi khuẩn lam có thể trôi nổi gần mặt nước.

Vi tiểu bào nang là các túi nhỏ bé được sinh ra từ bên trong tế bào mẹ do sự co nguyên sinh.

Hạt sinh sản là một tế bào có màng nhầy được tách ra từ sợi vi khuẩn lam và làm chức năng sinh sản.

Ở bộ Nostocales thường gặp dạng bào tử của vi khuẩn lam. Bào tử hình thành từng chiếc một từ tế bào dinh dưỡng và có thành dày. Ở một số chi (như *Gloeotrichia*, *Anabaena*) bào tử có thể được sinh ra do sự dính kết một số tế bào dinh dưỡng lại, chiều dài của chúng có thể đạt tới 0,5mm. Thành bào tử có lớp trong và lớp ngoài, giúp cho vi khuẩn lam chống chịu được với các điều kiện sống bất lợi. Khi có điều kiện thuận lợi bào tử sẽ nảy mầm để tạo ra một đoạn sợi mới.

Có trường hợp bào tử được hình thành với số lượng lớn (trên 100) bằng cách phân chia liên tục tế bào chất của tế bào mẹ và phân hóa dần thành các bào tử.

Ở vi khuẩn lam chưa phát hiện thấy các hình thức sinh sản hữu tính.

4. NHÓM VI KHUẨN NGUYÊN THỦY

Nhóm vi khuẩn nguyên thủy có kích thước rất nhỏ bao gồm ba loại : Micoplátma, Ricketxi và Clamidia. Nhiều tác giả cho rằng ba loại này có vị trí trung gian giữa virus và vi khuẩn.

4.1. Micoplátma (Mycoplasma)

Năm 1898, E.Nocard và cộng sự lần đầu tiên phân lập được Micoplátma từ bò bị bệnh viêm phổi màng phổi truyền nhiễm. Khi đó được gọi là vi sinh vật viêm phổi

màng phổi (PPO, pleuropneumonia organism). Về sau người ta tiếp tục phân lập được PPO từ các động vật khác và đổi tên là vi sinh vật loại viêm phổi màng phổi (PPLO, pleuropneumonia-like organisms). Từ năm 1955 PPO và PPLO được chính thức đổi thành Micoplatma.

Năm 1967 các nhà khoa học Nhật Bản phát hiện ra các loại Micoplatma gây bệnh cho thực vật (dâu, khoai tây, ...). Các loại Micoplatma gây bệnh thực vật hiện được gọi là MLO - vi sinh vật loại Micoplatma (Mycoplasma - like organisms).

Micoplatma là vi sinh vật nguyên thủy chưa có thành tế bào, đó là loại sinh vật nhỏ nhất trong sinh giới có đời sống dinh dưỡng độc lập.

Nhiều loại Micoplatma gây bệnh cho động vật (bò, cừu, dê, lợn, gà, vịt...) và gây bệnh cho người. Một số loại MLO gây bệnh cho lúa, ngô, dâu, khoai tây, tre, nứa. Một số Micoplatma có đời sống hoại sinh, thường gặp trong đất, trong nước bẩn, trong phân ứ. Micoplatma có thể làm nhiễm bẩn các dung dịch dùng để nuôi cấy tổ chức động vật.

Micoplatma có kích thước ngang khoảng 150-300nm thường là 250 nm, khó thấy được dưới kính hiển vi quang học bình thường. Micoplatma không có thành tế bào, bắt màu G⁻, có tính đa hình thái, có dạng nhỏ đến mức lọt qua nển lọc vi khuẩn, dễ mất cảm với áp suất thẩm thấu, mất cảm với cồn, với các chất hoạt động bề mặt (xà phòng, bột giặt...), không mất cảm với penixilin, xicloserin, xephalosporin, baxitrxin và các chất kháng sinh khác ức chế quá trình tổng hợp thành tế bào.

Micoplatma tạo ra những khuẩn lạc rất nhỏ trên môi trường thạch, đường kính khuẩn lạc thường chỉ vào khoảng 0,1 - 1,0mm, nhiều khi có dạng như trứng óp lép (trứng rắn có lòng đỏ ở giữa).

Micoplatma thường sinh sản theo phương thức cắt đôi. Chúng có thể sinh trưởng độc lập trên các môi trường nuôi cấy nhân tạo giàu chất dinh dưỡng (có chứa máu hoặc cao nấm men. Micoplatma có thể phát triển cả trong điều kiện hiếu khí (aerobic) lẫn kỵ khí (anaerobic) nghĩa là có cả kiểu trao đổi chất oxi hóa lẫn kiểu trao đổi chất lên men.

Micoplatma chịu ức chế bởi các chất kháng sinh ngăn cản quá trình sinh tổng hợp protein (như eritromixin, tetraxiclin, lincomixin, gentamixin, kanamixin...).

Màng tế bào chất của Micoplatma có chứa sterol cho nên rất mất cảm với các chất kháng sinh thuộc nhóm polien như nistatin, amphoterixin, candixidin ...

Hiện nay đã biết được khoảng 80 loài micoplatma. Theo hệ thống phân loại Bergey (1994) thì thuộc về bộ Micoplasmatales có 3 họ : Họ Micoplasmataceae (gồm chi *Mycoplasma* và *Ureaplasma*), họ Acholeplasmataceae (chi *Acholoplasma*), họ Spiroplasmataceae (có chi *Spiroplasma*). Không thuộc bộ Mycoplasmatales có các chi *Anaeroplasma*, *Thermoplasma* và các MLO (micoplatma gây bệnh ở thực vật). Bộ Micoplasmatales thuộc về lớp Mollicutes, ngành Tenericutes.

4.2. Ricketxi (Rickettsia)

Năm 1909, H.T. Ricketts (1871 - 1910) lần đầu tiên phát hiện ra mầm bệnh của bệnh sốt thương hàn phát ban (sau này gọi là bệnh sốt Ricketxi phát ban). Năm 1910 ông đã hi sinh trong khi nghiên cứu bệnh này. Nhóm vi sinh vật này về sau được gọi là Ricketxi để kỉ niệm công lao của nhà khoa học này.

Ricketxi là loại vi sinh vật nhân nguyên thủy G⁻ chỉ có thể tồn tại trong tế bào các sinh vật nhân thật. Chúng khác với *Micoplatma* ở chỗ đã có thành tế bào và không thể sống độc lập trong các môi trường nhân tạo. Chúng khác với *Clamidia* ở chỗ tế bào lớn hơn, không có dạng qua lọc, năng lực sinh tổng hợp khá mạnh và không tạo thành các thể bao hàm.

Trước đây người ta cho rằng Ricketxi chỉ kí sinh ở động vật, nhưng năm 1972 I.M. Windsor đã tìm thấy những loại Ricketxi kí sinh trên thực vật. Người ta gọi nhóm này là RLO (*Rickettsia-like organism*, cơ thể loại Ricketxi hoặc là RLB (*Rickettsia-like bacteria*, vi khuẩn loại Ricketxi). Tính đến năm 1985 người ta đã phát hiện được 30 loài ricketxi.

Ricketxi có các đặc điểm chung sau đây :

- Tế bào có kích thước thay đổi, loại nhỏ nhất chỉ là $0,25 \times 1,0 \mu\text{m}$, loại lớn nhất là $0,6 \times 1,2 \mu\text{m}$ hoặc $0,8 - 2,0 \mu\text{m}$.

- Tế bào có hình thái biến hóa, có thể có hình que, hình cầu, hình song cầu, hình sợi... Trong tế bào bị cảm nhiễm Ricketxi sắp xếp vô quy tắc nhưng thường tụ tập thành từng khối dày đặc.

- Có thành tế bào, bắt màu G⁻ nhưng khó nhuộm, thường dùng các phương pháp nhuộm Giemsa, Giménez, Macchiavello.

- Kí sinh bắt buộc trong tế bào các sinh vật nhân thật.

Vật chủ thường là các động vật có chân đốt như ve, bét, bọ, rận... Đáng chú ý là các loài *Dermacentor andersoni*, *Dermacentor variabilis*, *Pediculus humanus*, *Xenopsylla cheopis*. Các động vật nhỏ bé này sẽ truyền mầm bệnh qua người và các động vật có xương sống khác.

- Sinh sản bằng phương thức phân cắt thành 2 phần đều nhau.

- Mẫn cảm với các chất kháng sinh như penixilin, tetraxiclin, cloramphenicol, lincomixin...

- Có các chu trình trao đổi năng lượng không hoàn chỉnh, phần lớn chỉ có thể sử dụng axit glutamic để sinh năng lượng chứ không sử dụng được glucosơ.

- Thường được nuôi cấy trong phôi gà, trong các động vật mẫn cảm, trong các tổ chức nuôi cấy (như dòng tế bào Hela).

- Mẫn cảm với nhiệt độ. Nói chung bị chết ở 56°C trở lên sau 30 phút.

Theo hệ thống phân loại Bergey (1994) thì tất cả Ricketxi được xếp vào một bộ, bộ Rickettsiales. Trong bộ này có 3 họ với tất cả 14 chi :

A. Họ Rickettsiaceae

(a). Tộc (Tribe) Rickettsieae.

- + Chi *Rickettsia*
- + Chi *Rochalimaea*
- + Chi *Coxiella*

(b). Tộc Ehrlichieae

- + Chi *Ehrlichia*
- + Chi *Cowdria*
- + Chi *Neorickettsia*

(c). Tộc Wolbachieae

+ Chi *Wolbachia*

+ Chi *Rickettsiella*

B. Họ Bartonellaceae

+ Chi *Bartonella*

+ Chi *Grahamella*

C. Họ Anaplasmataceae

+ Chi *Anaplasma*

+ Chi *Aegyptianella*

+ Chi *Haemobartonella*

+ Chi *Eperythrozoon*

Các loài ricketxi gây bệnh chủ yếu ở người gồm có *Rickettsia prowazekii* (gây bệnh sốt ricketxi phát ban), *R. tsutsugamushi* (hay còn gọi là *R. orientalis* gây bệnh tsutsugamushi), *R. mooseri* (hay còn gọi là *R. typhi*, gây bệnh sốt ricketxi phát ban địa phương), *Rochalimaea quintana* (gây bệnh sốt chiến hào hay còn gọi là sốt năm ngày), *Coxiella burnetii* (gây bệnh sốt Q, hay còn gọi là sốt Query), *R. rickettsii* (sốt phát ban núi đá - Rocky mountain spotted fever).

4.3. Clamidia (chlamydia)

Năm 1907 hai học giả Tiệp Khắc (cũ) lần đầu tiên phát hiện ra thể bao hàm trong tế bào kết mạc của các bệnh nhân đau mắt hột (trachoma). Về sau nhiều học giả cho rằng các thể bao hàm mắt hột là tập đoàn của những virus có kích thước lớn. Thuật ngữ Chlamydia (từ gốc Hilạp Chlamys là cái áo choàng) được Jones, Rake và Stearns đề xuất từ năm 1945. Năm 1950 Zhdanov và Korenblit gọi là *Rickettsiaformis*, năm 1953 Coles gọi là *Prowazekia*, năm 1953 Meyer gọi là *Bedsonia*, năm 1964 Levaditi và cộng sự lại gọi là *Rakeia*. Mãi đến năm 1970 tại Hội nghị quốc tế về mắt hột tại Mi mới chính thức gọi nhóm vi sinh vật này là *Chlamydia*.

Đó là một loại vi khuẩn rất bé nhỏ, qua lọc, G^- , có chu kì phát triển độc đáo, kí sinh bắt buộc trong tế bào các sinh vật nhân thật.

Clamidia khác virus ở các điểm sau đây :

- Có cấu tạo tế bào
- Có chứa đồng thời hai loại axit nucleic : ADN và ARN
- Có thành phần tế bào chứa peptidoglican đặc trưng cho vi khuẩn G^- .
- Có riboxom trong tế bào
- Có hệ thống enzym không hoàn chỉnh, thiếu các enzym tham gia vào quá trình trao đổi sinh năng lượng, do đó bắt buộc phải kí sinh trong các tế bào có nhân thật.
- Phân cắt thành 2 phần bằng nhau lúc sinh sôi nảy nở
- Rất mẫn cảm với các chất kháng sinh và sunphamit (riêng *Chlamydia psittaci* có tính đề kháng cao đối với sunphamit)
- Trong phòng thí nghiệm có thể nuôi cấy trong màng bao lòng đỏ trứng gà, trong khoang bụng chuột bạch, trên tế bào Hela...

Clamidia có một chu kì sống khá đặc biệt : dạng cá thể có khả năng xâm nhiễm được gọi là *nguyên thể*. Đó là loại tế bào hình cầu có thể chuyển động, đường kính

nhỏ bé (0,2 - 0,5 μm), nhuộm Giemsa bắt màu tím, nhuộm Macchiavello bắt màu đỏ. Nguyên thể bám chắc được vào mặt ngoài của tế bào vật chủ và có tính cảm nhiễm cao. Lúc nguyên thể gặp tế bào dễ cảm nhiễm phần không chịu nhiệt ở bề mặt nguyên thể hấp phụ lên phần thụ thể miễn cảm với men của tụy tạng. Nhờ tác dụng thực bào của tế bào vật chủ mà nguyên thể xâm nhập vào trong tế bào, phần màng bao quanh nguyên thể biến thành không bào. Nguyên thể lớn dần lên trong không bào và biến thành thủy thể.

Thủy thể (thủy = nguyên thủy), còn gọi là thể dạng lưới, là loại tế bào hình cầu màng mỏng, khá lớn (đường kính 0,8 - 1,5 μm). Thủy thể liên tiếp phân cắt thành hai phần đều nhau và tạo thành vi khuẩn lạc trong tế bào chất của vật chủ. Về sau một lượng lớn các tế bào con này lại phân hóa thành các nguyên thể nhỏ hơn nữa, màng dày và có tính cảm nhiễm. Khi tế bào vật chủ bị phá vỡ các nguyên thể được giải phóng ra sẽ xâm nhiễm vào các tế bào khác. Dưới đây là tóm tắt vài đặc điểm so sánh giữa nguyên thể và thủy thể của *Chlamidia*.

	Nguyên thể	Thủy thể
Kích thước	0,2 - 0,5 μm	0,8 - 1,5 μm
Thành tế bào	Vững chắc, không cho các cao phân tử đi qua	Mềm yếu, cho các cao phân tử đi qua
ADN	Dày đặc	Phân tán
ARN : ADN	1 : 1	3 : 1
Metionin, Xixtein	Có	Không có
Hoạt tính trao đổi chất	Thấp	Cao
Năng lực đề kháng	Mạnh	Yếu
Chức năng sinh học	Cảm nhiễm	Sinh sản (phân cắt)

Theo hệ thống phân loại Bergey thì *Chlamydia* chỉ là một chi, thuộc họ Chlamydiaceae, bộ Chlamydiales. Nhiều loài *Chlamydia* gây ra các bệnh nguy hiểm cho người, cho động vật.

Chlamydia mắt hột gây bệnh mắt hột ở người và ở chuột nhắt, có tên chung là *Chlamydia trachomatis*. Thuộc loài này có ba biến chủng : BT (Biovar trachoma), LGV (Biovar lymphogranuloma venereum) và BM (Biovar mouse).

Biến chủng BT của *Chlamydia trachomatis* gây ra bệnh đau mắt hột cho người từ cách đây ít ra là 3000 năm. Theo Tổ chức Y tế thế giới (WHO) thì hiện có khoảng 400 triệu người bị đau mắt hột và đã có khoảng 6 - 10 triệu người bị mù vì bệnh này. Biến chủng LGV gây bệnh u hạt limpho đường sinh dục (lây truyền qua đường tình dục).

Ngoài *Chlamydia trachomatis* còn có một số loài *Chlamydia* khác gây bệnh cho động vật : *C. psittaci*, *C. ornithosis*, *C. miningo-pneumonitis*, *C. feline pneumonitis*, *C. guinea pig conjunctivitis*, *C. bovine encephalomyelitis*.



Cầu khuẩn



Trực khuẩn



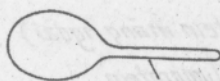
Xoắn khuẩn



Xoắn thể

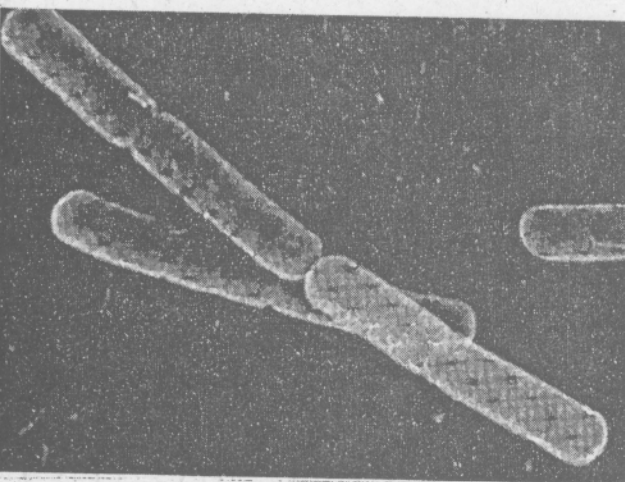
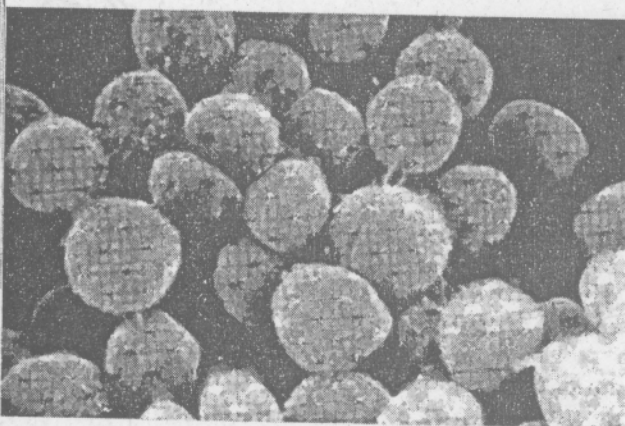
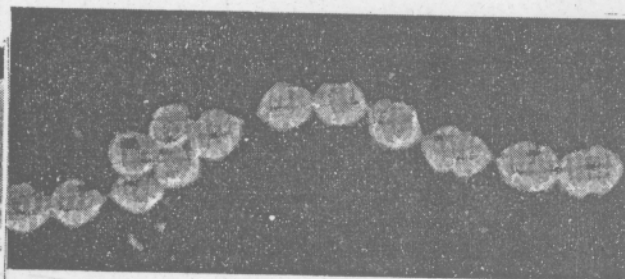
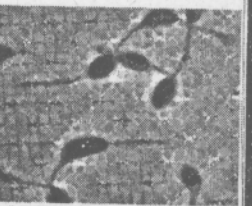
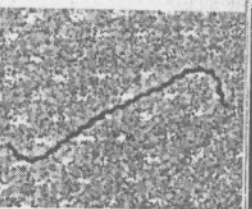
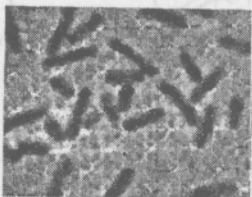
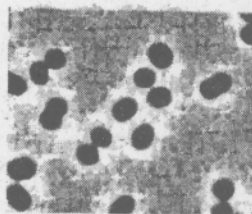


cường

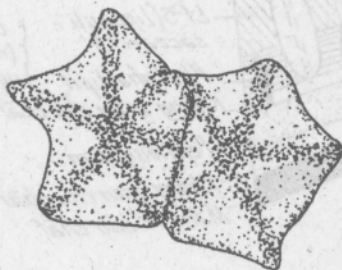


sợi

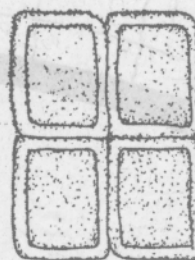
Các nhóm hình thái chủ yếu của vi khuẩn



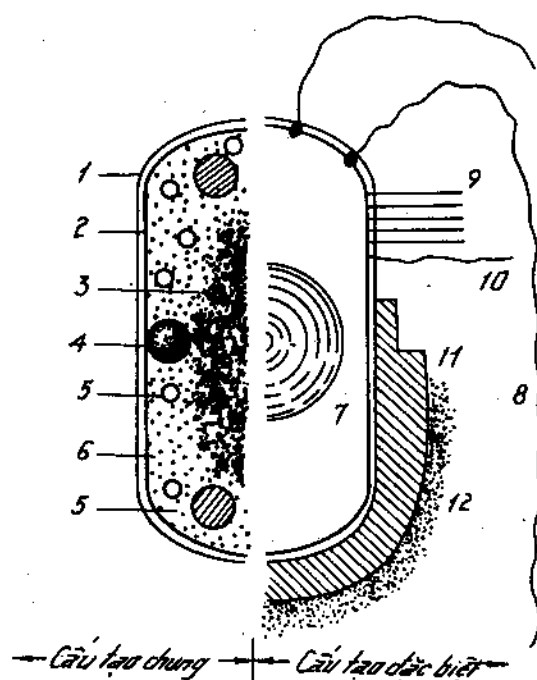
Chụp qua kính hiển vi điện tử quét. Từ trên xuống :
Liên cầu khuẩn, Tụ cầu khuẩn, Liên trực khuẩn



Vi khuẩn hình sao (chi *Stella*)

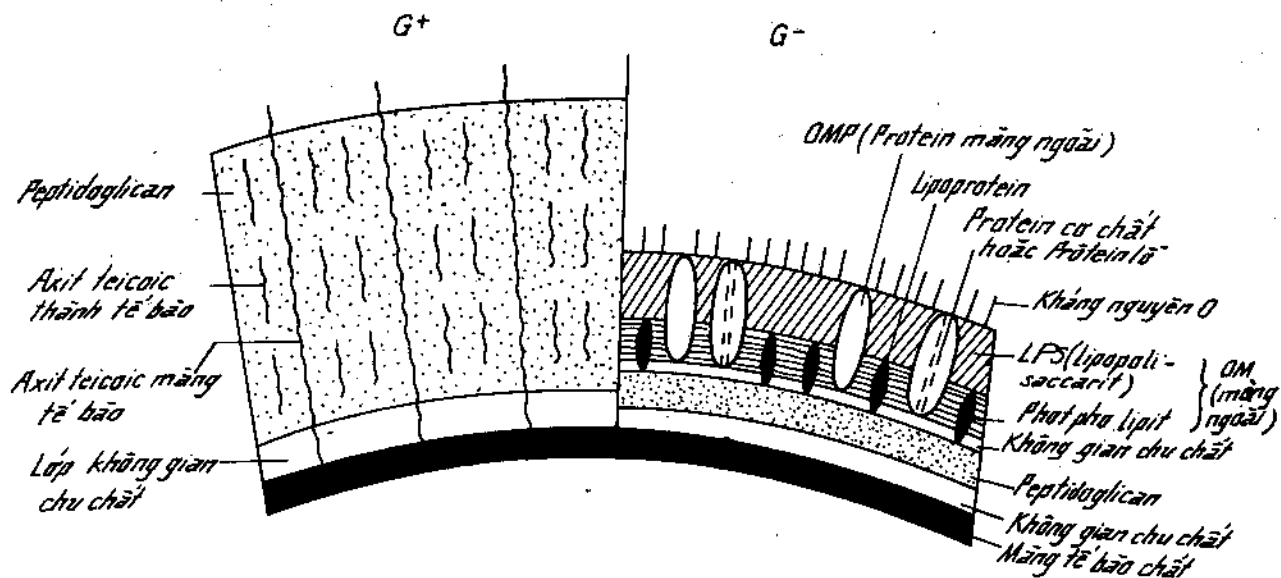


Vi khuẩn hình khối (chi *Haloarcula*)

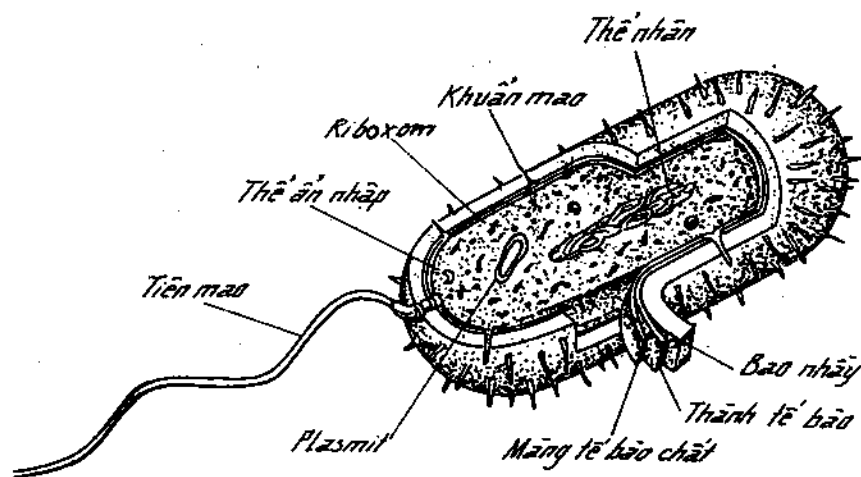


- 1 - Thành tế bào
- 2 - Màng tế bào chất
- 3 - Thể nhân
- 4 - Mezoxom
- 5 - Chất dự trữ
- 6 - Tế bào chất
- 7 - Bào tử
- 8 - Tiên mao
- 9 - Khuẩn mao
- 10 - Khuẩn mao giới tính
- 11 - Bao nhảy
- 12 - Tầng dịch nhầy

Mô hình cấu trúc tế bào vi khuẩn

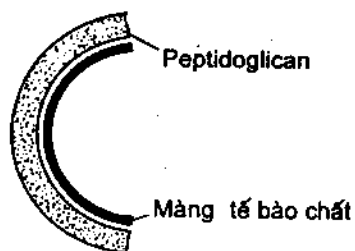


Mô hình cấu trúc của thành tế bào vi khuẩn G^+ và vi khuẩn G^-

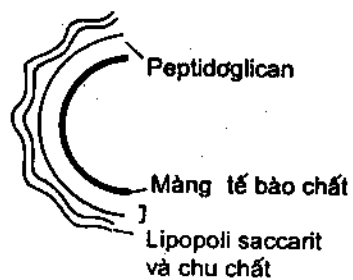


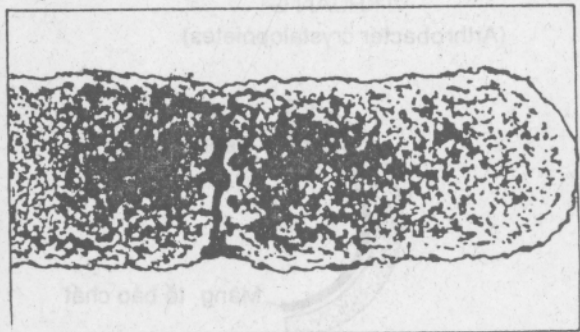
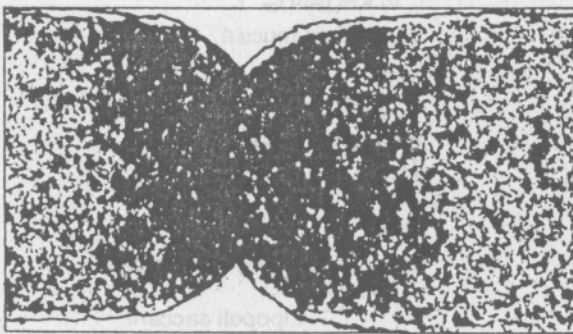
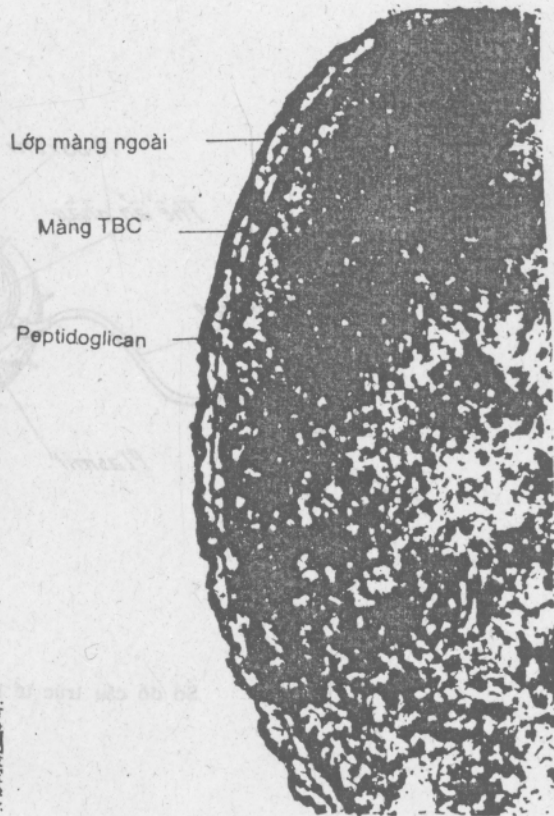
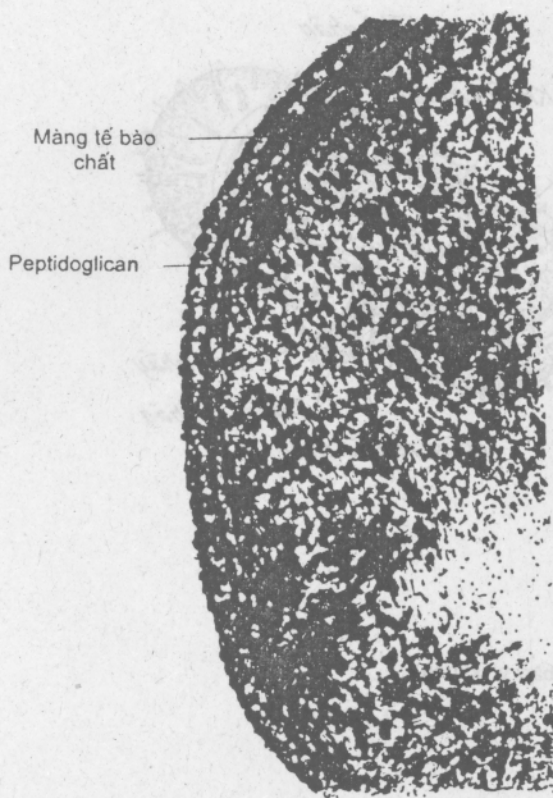
Sơ đồ cấu trúc tế bào vi khuẩn

VI KHUẨN G^+
(*Arthrobacter crystallopoietes*)



VI KHUẨN G^-
(*Leuwinthrix mucor*)

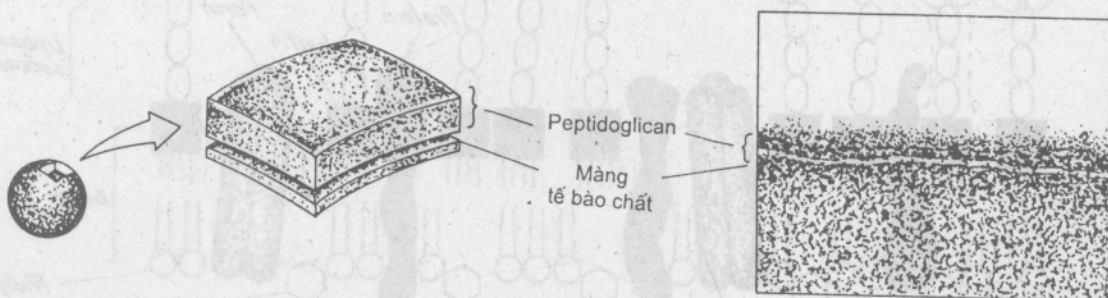




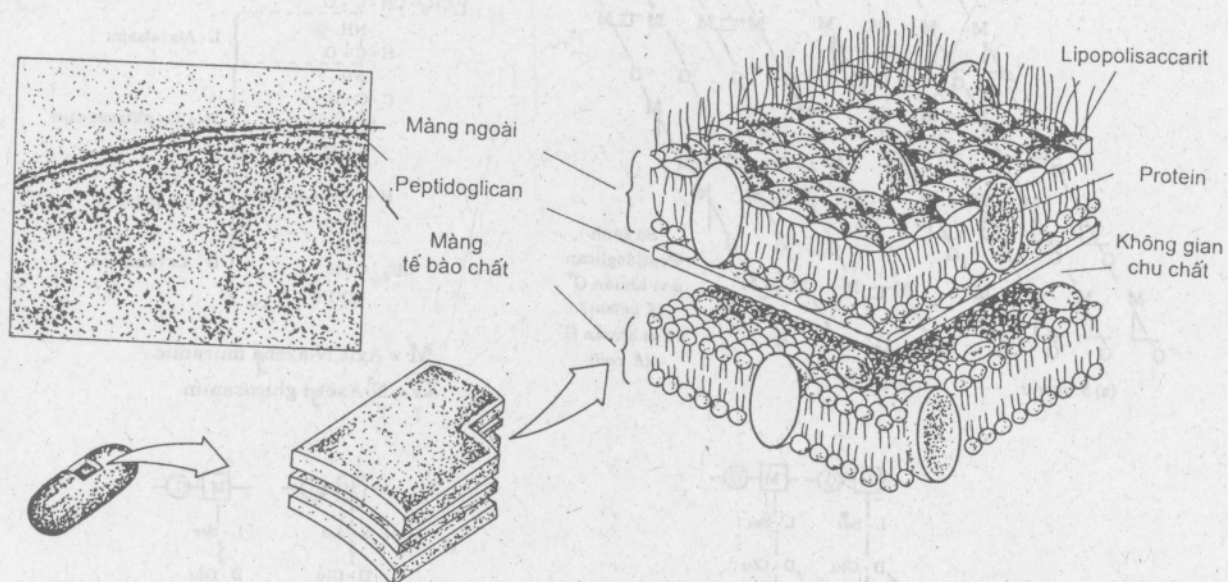
B. subtilis (G^+)

E. coli (G^-)

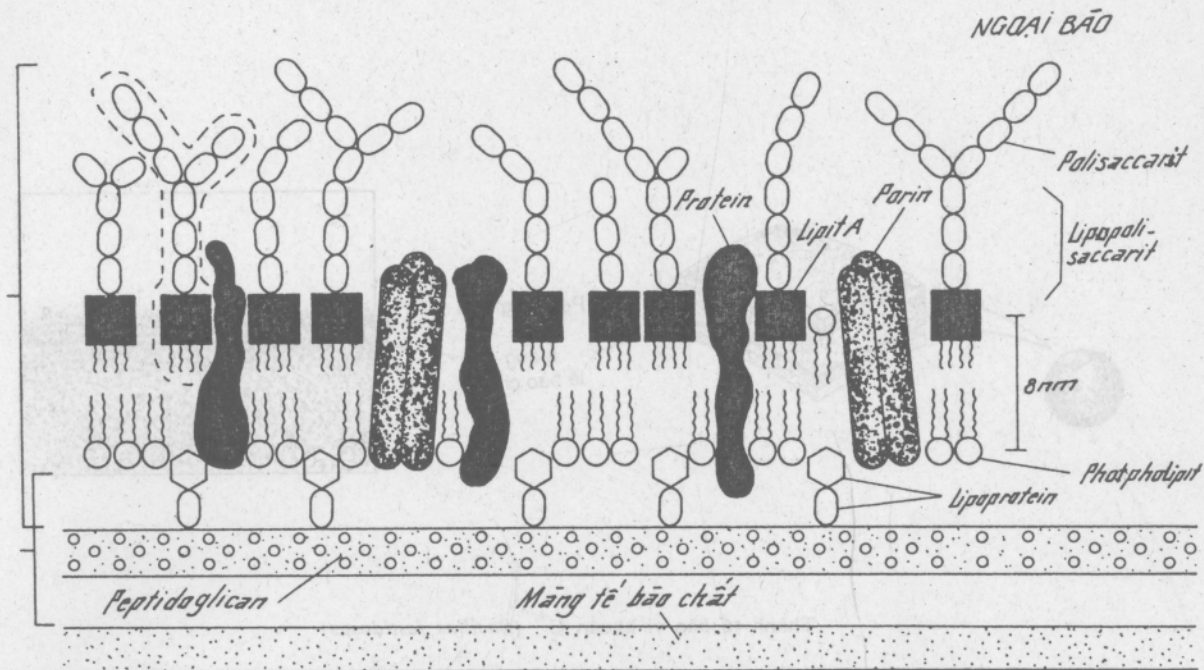
So sánh tế bào vi khuẩn G^+ và G^-



Thành tế bào vi khuẩn G^+ (*Bacillus fastidiosus*)

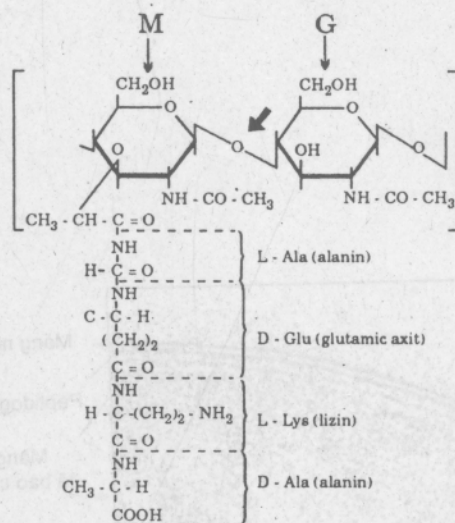


Thành tế bào vi khuẩn G^- (*Azotomonas insignis*)



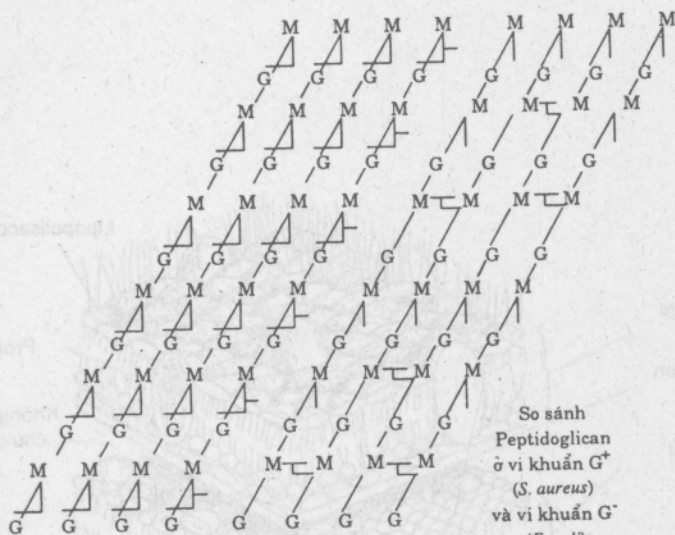
Cấu trúc thành tế bào vi khuẩn G⁻

NỘI BÀO



M = Axit N-axetyl muramic

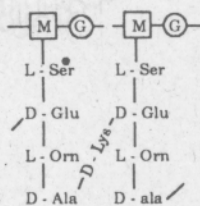
G = N-Axetyl glucosamin



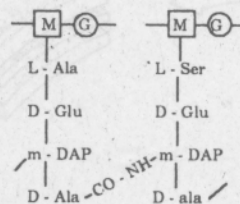
(a) *S. aureus*

(b) *E. coli*

So sánh
Peptidoglican
ở vi khuẩn G⁺
(*S. aureus*)
và vi khuẩn G⁻
(*E. coli*)



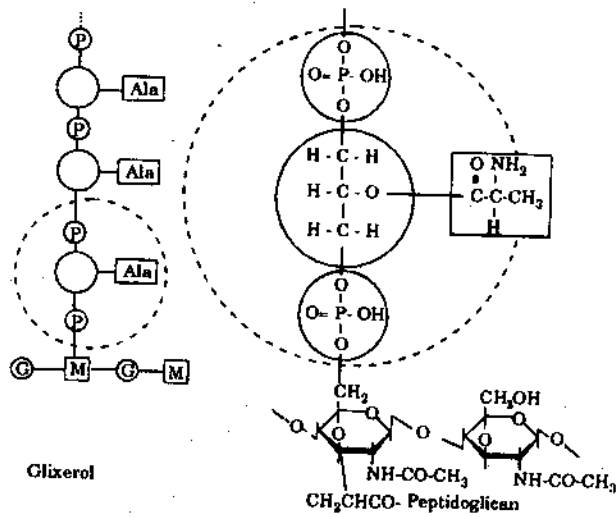
PG ở *Corynebacterium poinsettiae*



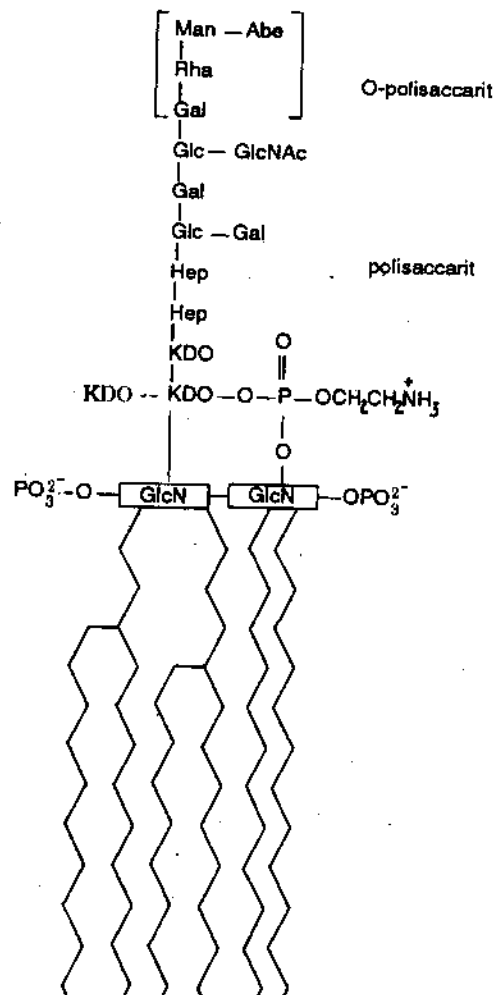
PG ở *E. coli*

Cấu trúc của peptidoglican (PG) ở thành tế bào vi khuẩn

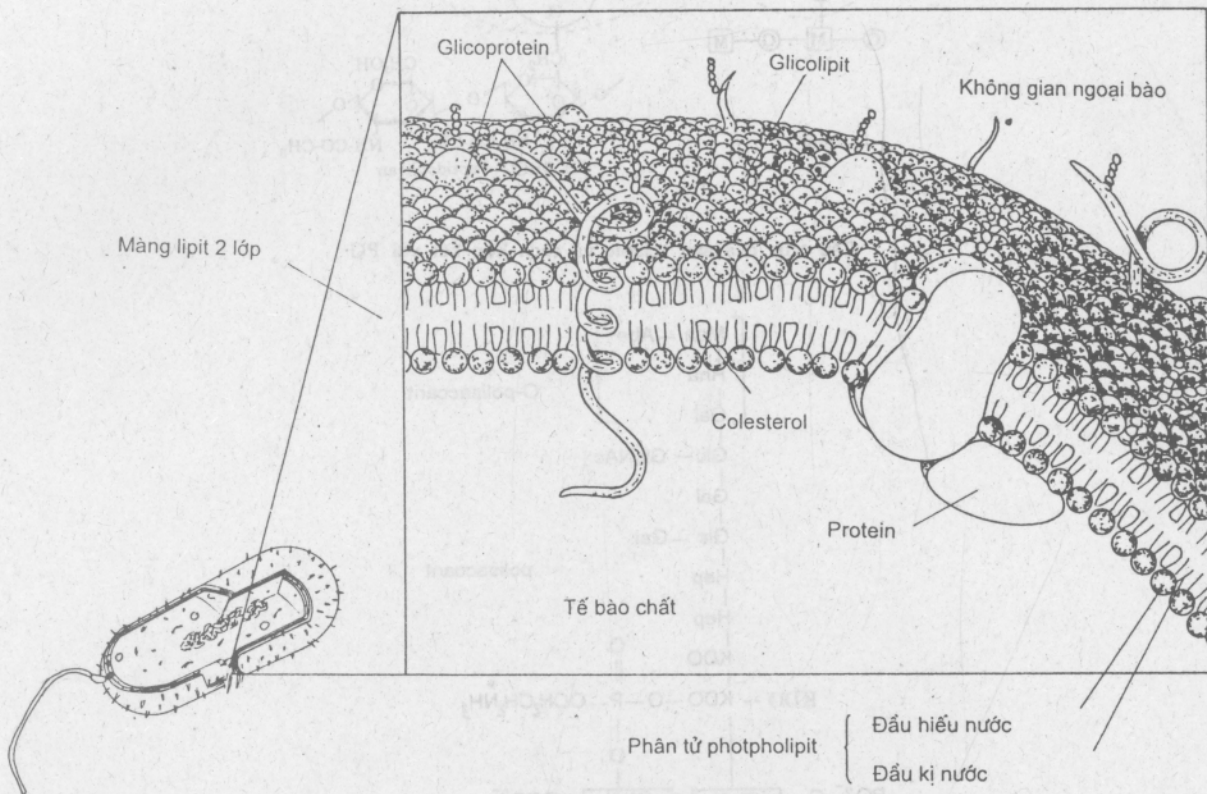
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
66
67
68
69
70
71
72
73
74
75
76
77
78
79
80
81
82
83
84
85
86
87
88
89
90
91
92
93
94
95
96
97
98
99
100



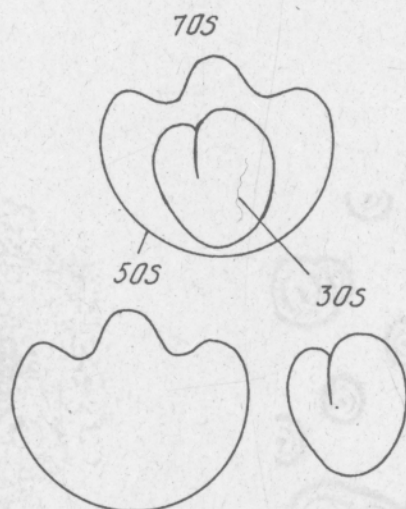
Cấu trúc của axit teicoic và cách liên kết với PG



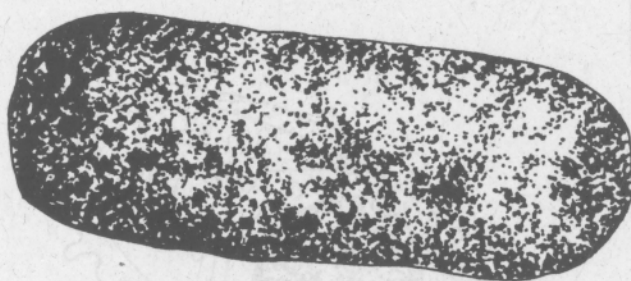
Cấu trúc của LPS (Lipopolisaccarit)



Cấu trúc của màng tế bào chất và phân tử photpholipit



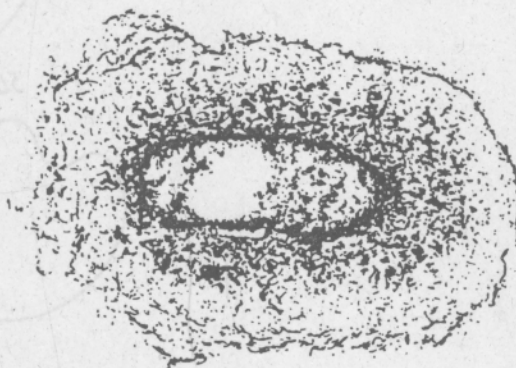
Riboxom của vi khuẩn



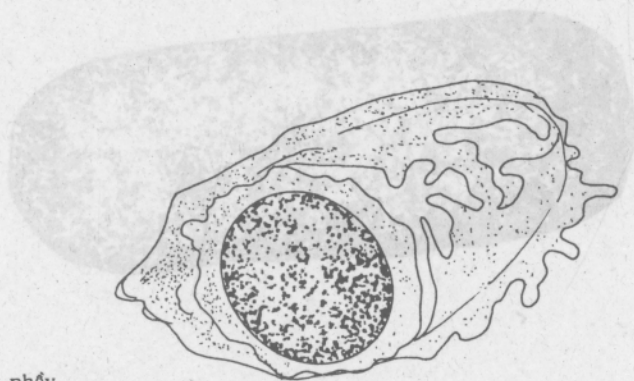
Thể nhân ở vi khuẩn (ảnh chụp qua kính hiển vi điện tử lát cắt mỏng qua tế bào *E. coli*)



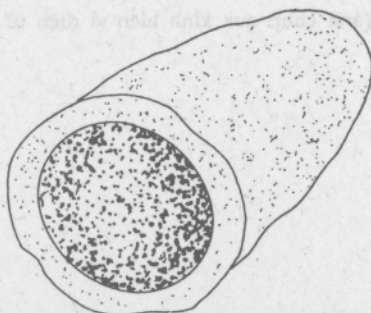
Bao nhảy của vi khuẩn *Acinetobacter* sp.
(nhuộm mực tàu và chụp qua kính hiển vi quang học)



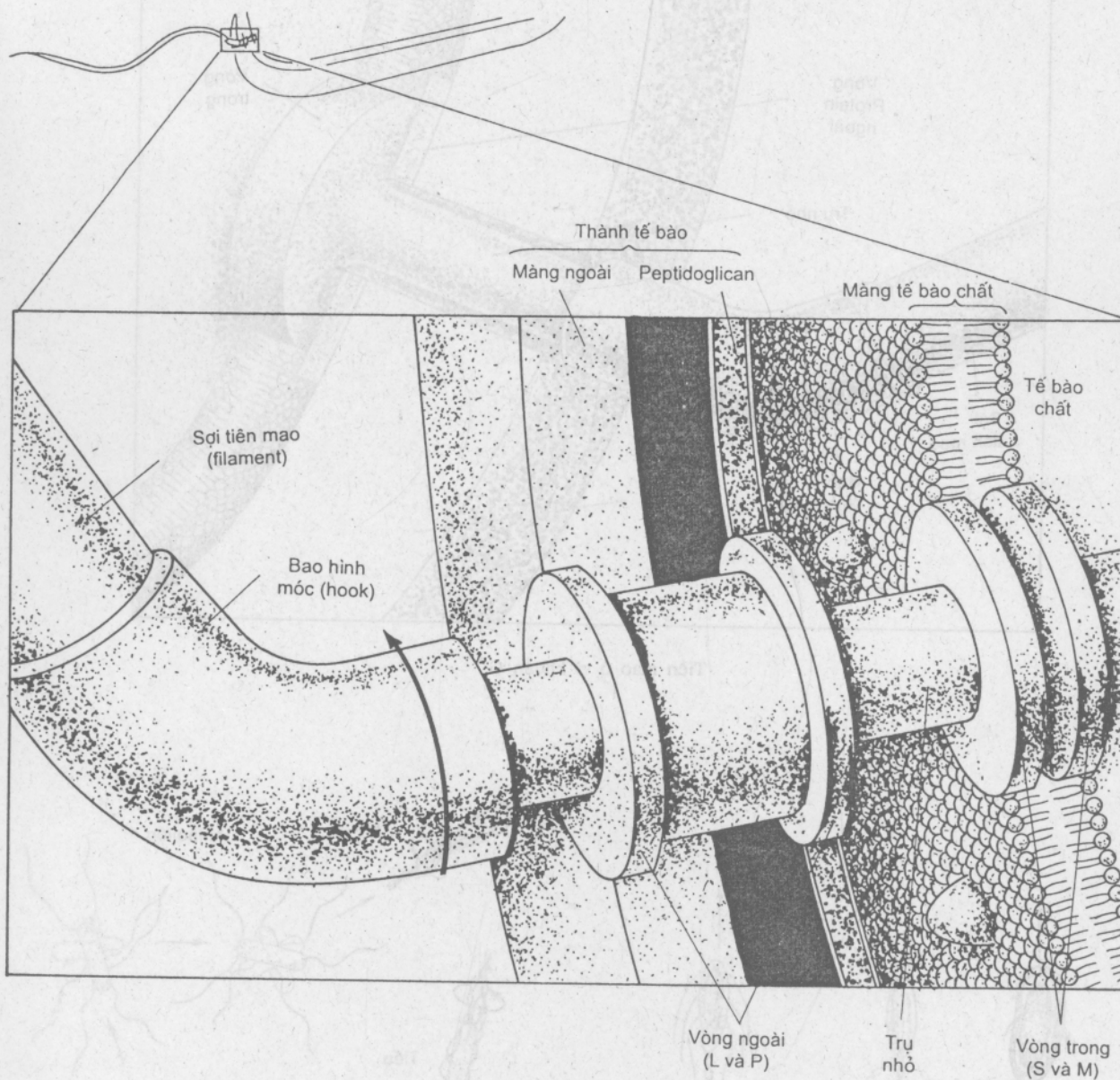
Bao nhảy của vi khuẩn *Rhizobium trifolii*
(chụp qua kính hiển vi điện tử)



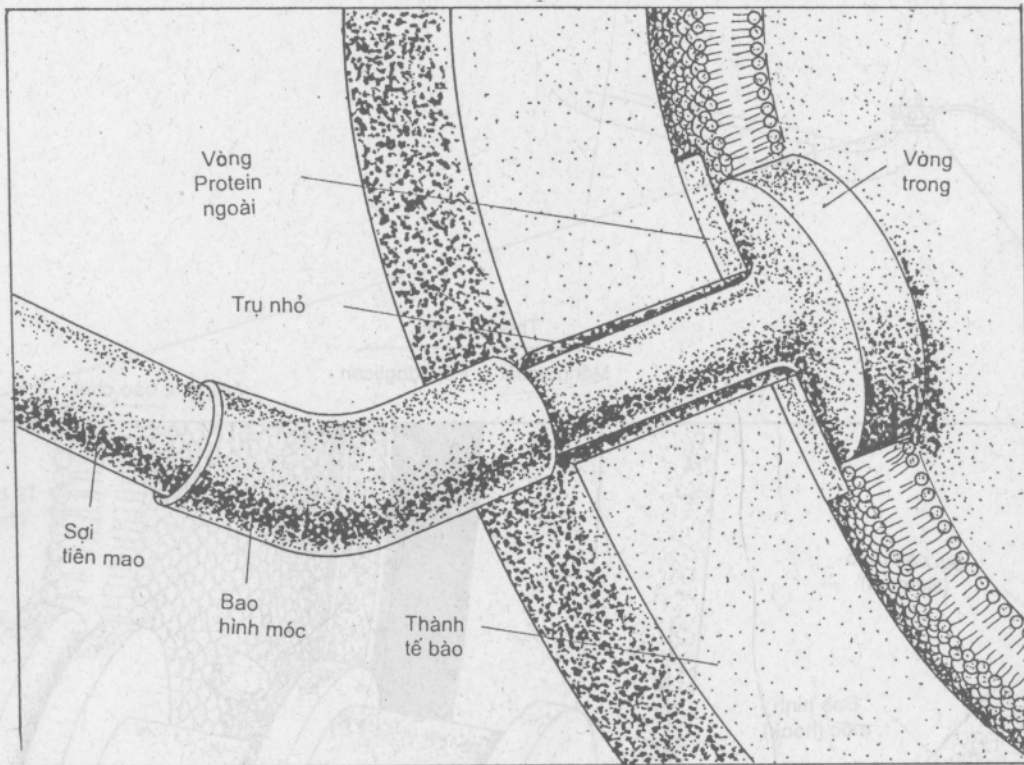
Lớp dịch nhảy



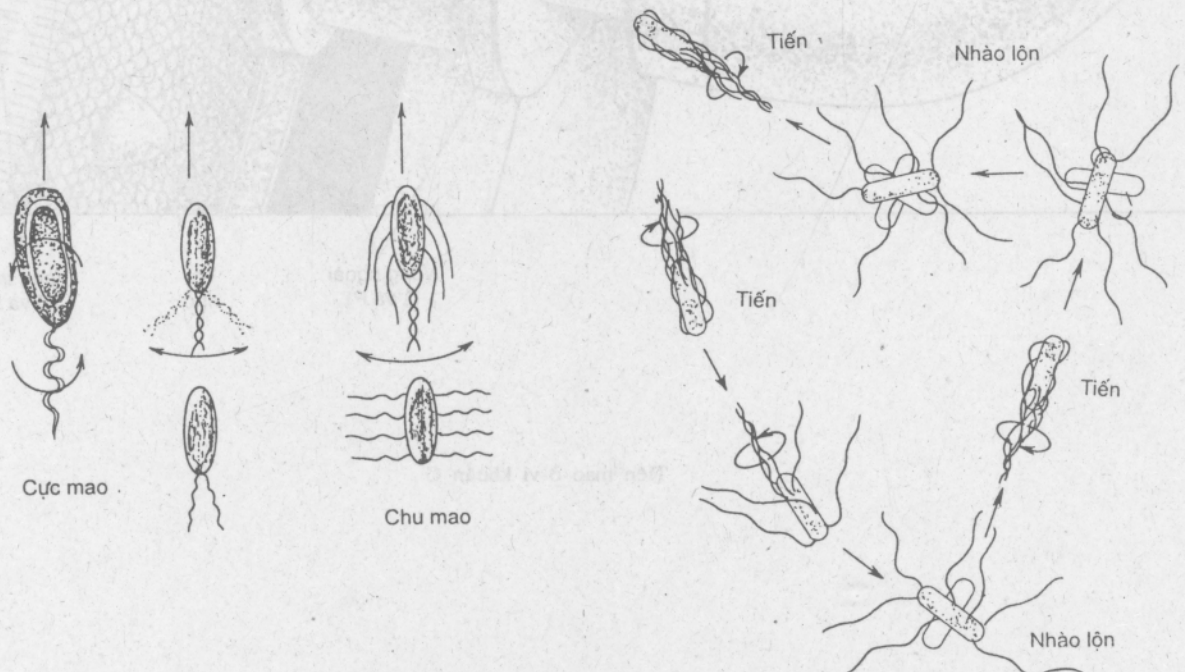
Bao nhảy



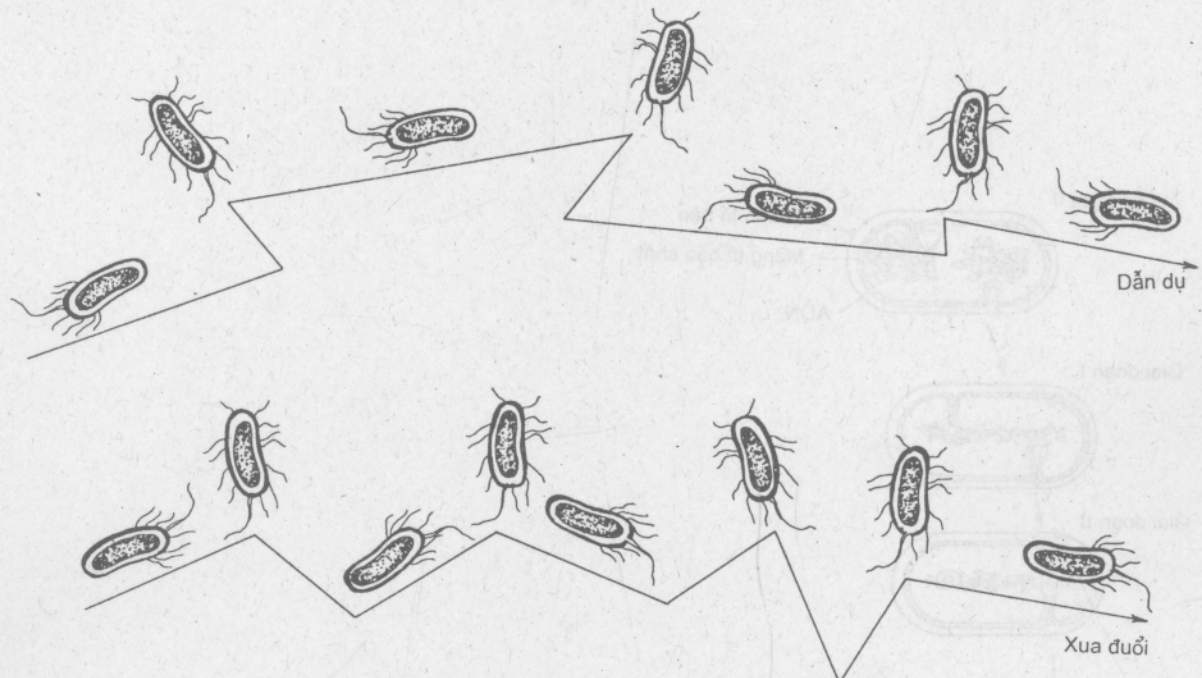
Tiên mao ở vi khuẩn G⁻



Tiên mao ở vi khuẩn G^+



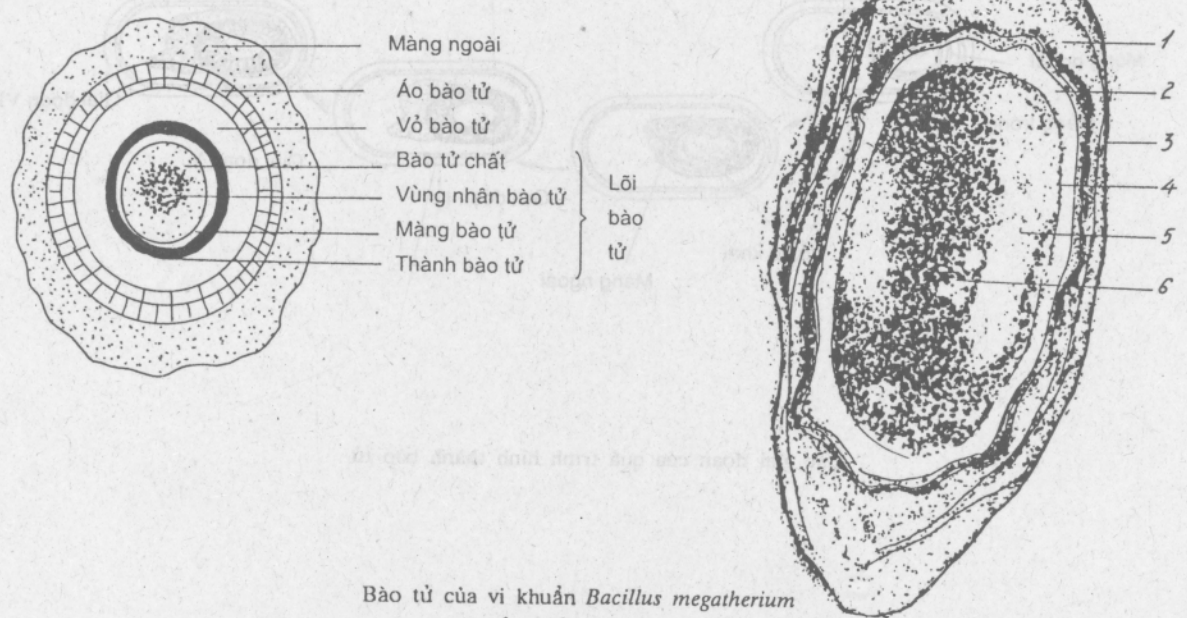
Di động nhờ tiên mao ở vi khuẩn



Nồng độ tăng

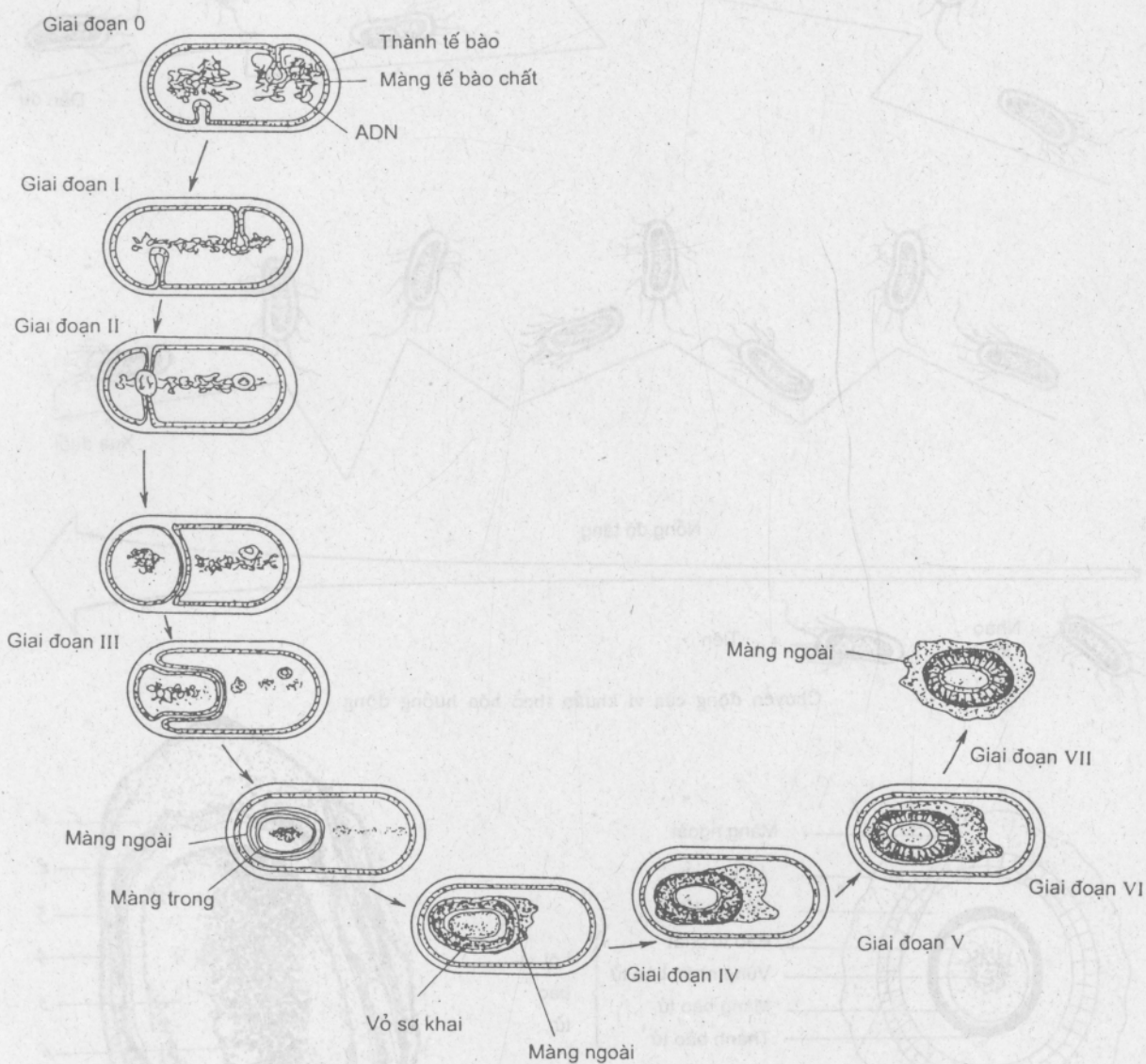
Nhào lộn = Tiến

Chuyển động của vi khuẩn theo hóa hướng động

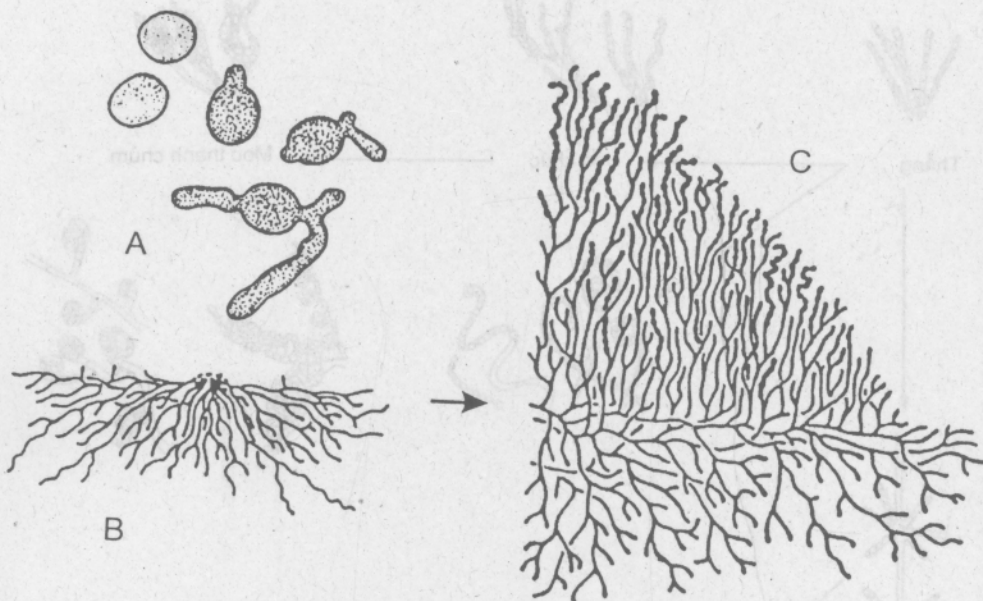


Bào tử của vi khuẩn *Bacillus megatherium*

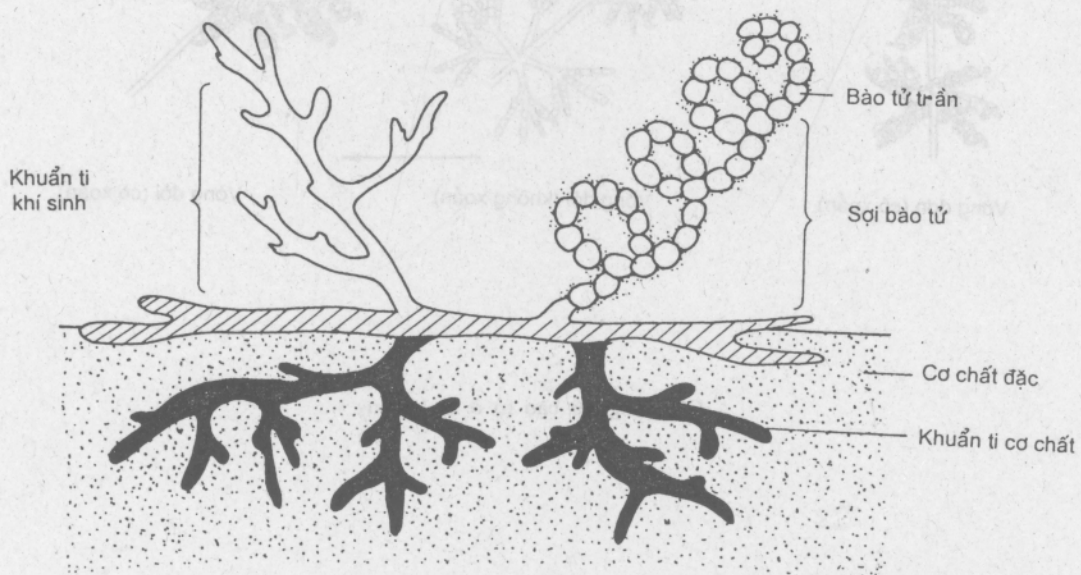
- 1 - Áo bào tử
- 2 - Vỏ bào tử
- 3 - Màng ngoài
- 4 - Thành lõi (core wall)
- 5 - ADN ; 6 - Riboxom



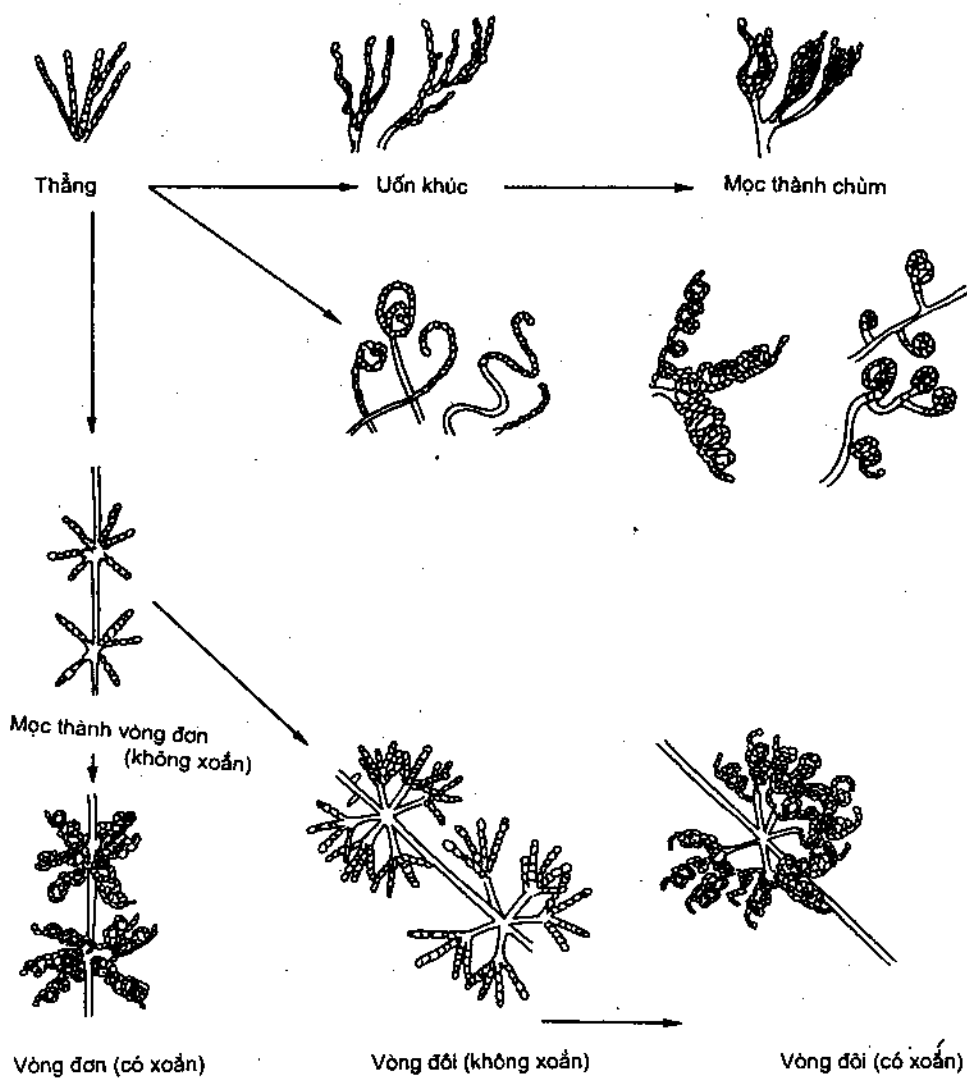
Các giai đoạn của quá trình hình thành bào tử



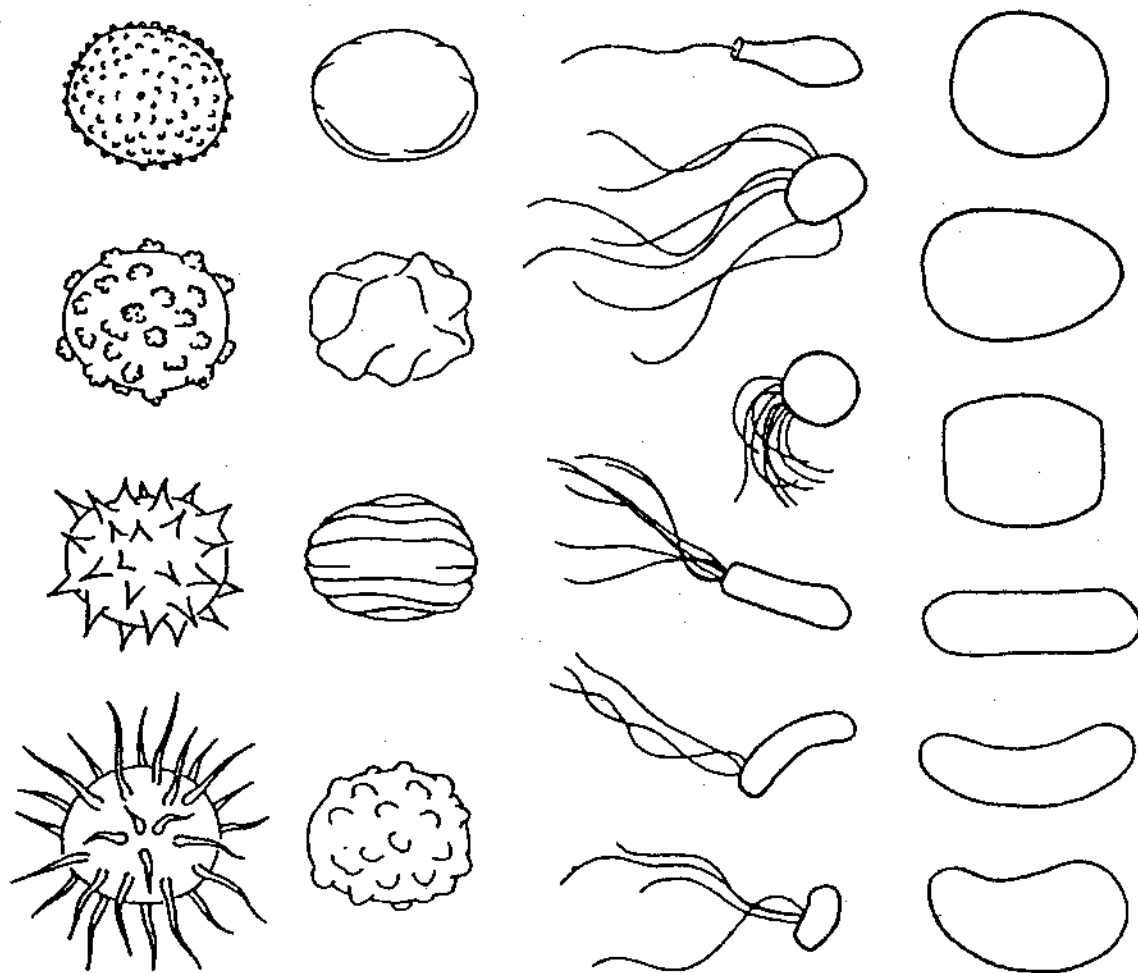
Sự phát triển của khuẩn ti ở xạ khuẩn
 A : Bào tử nảy mầm ; B : Hình thành khuẩn ti cơ chất ;
 C : Hình thành khuẩn ti khí sinh.



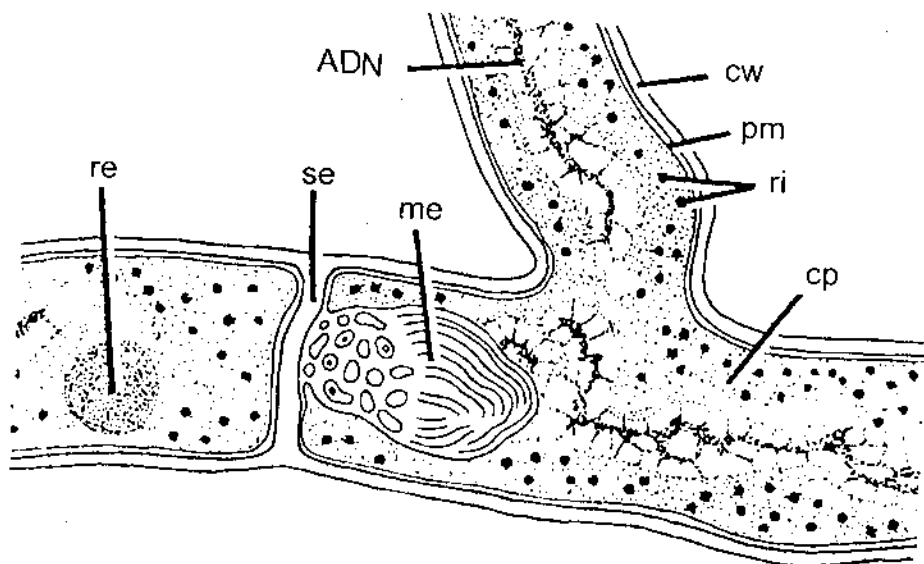
Các loại khuẩn ti ở xạ khuẩn



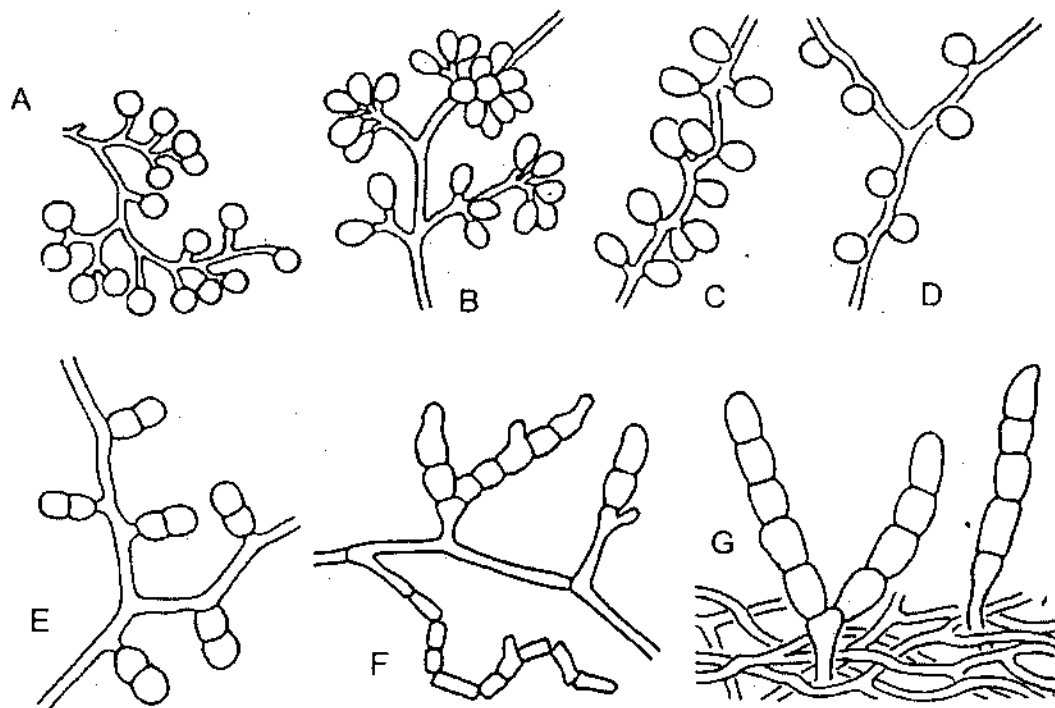
Các dạng sợi bào tử ở xạ khuẩn



Các dạng bào tử ở xạ khuẩn

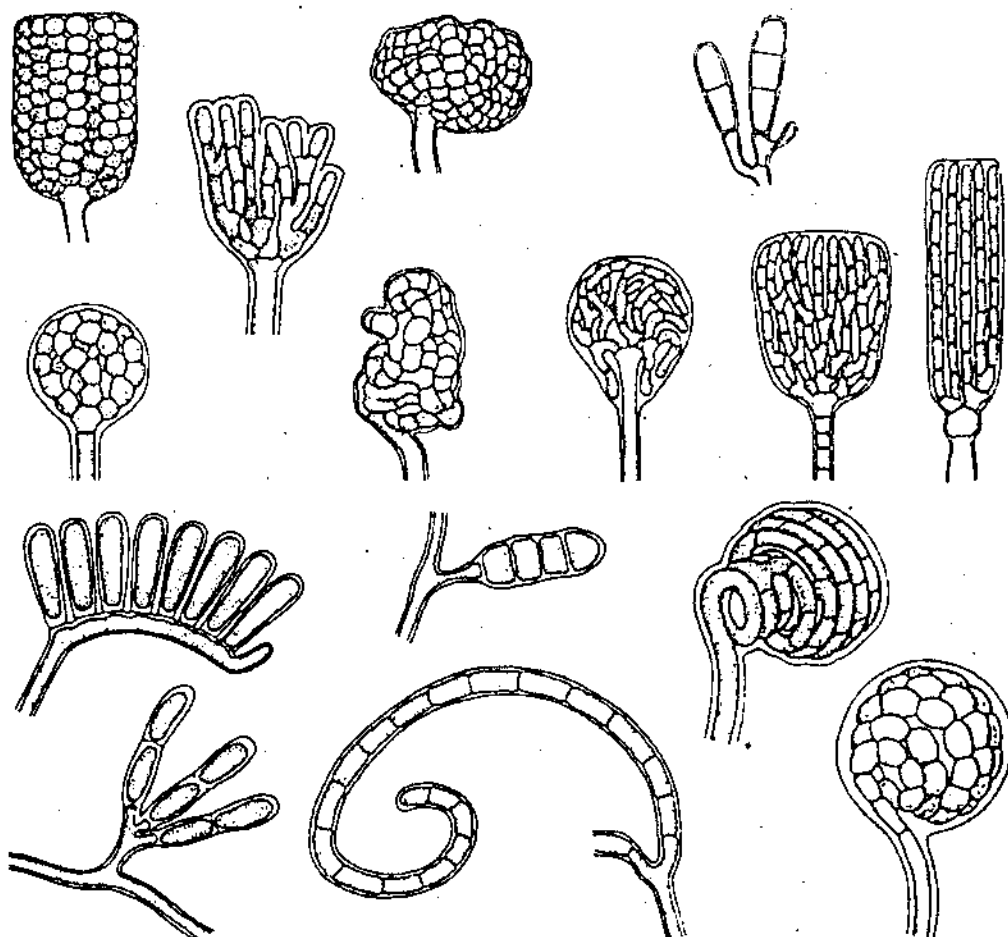


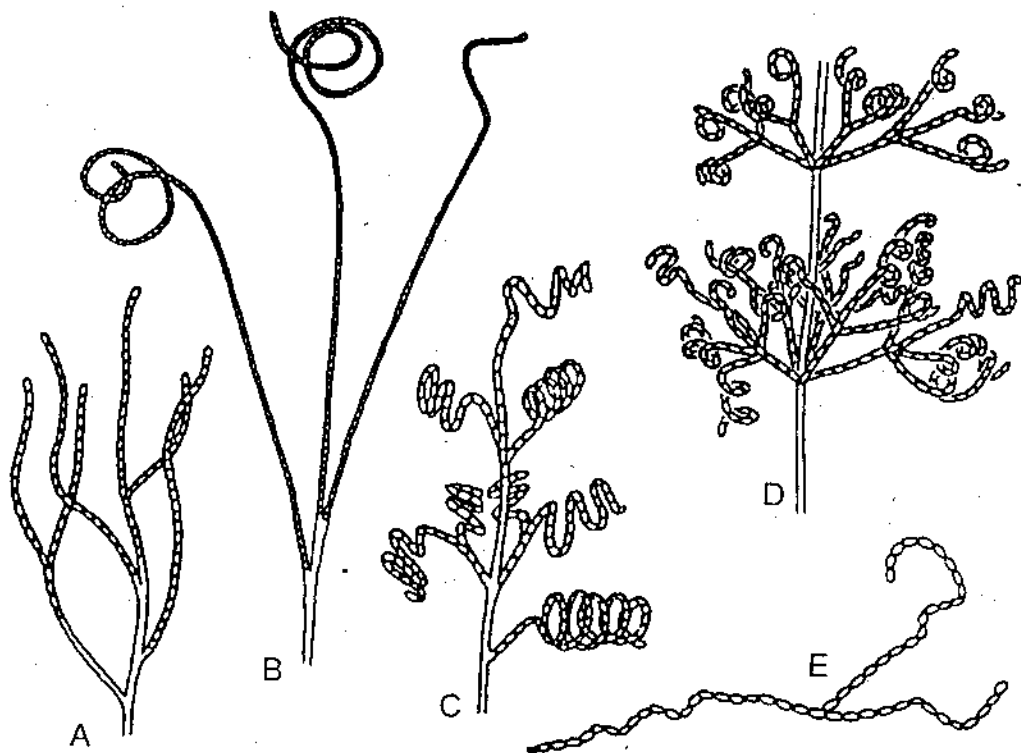
Cấu trúc của khuẩn ti ở xạ khuẩn
 cp : tế bào chất
 pm : màng tế bào chất
 cw : thành tế bào
 me : mezosom
 se : vách ngăn
 ri : riboxom
 re : chất dự trữ



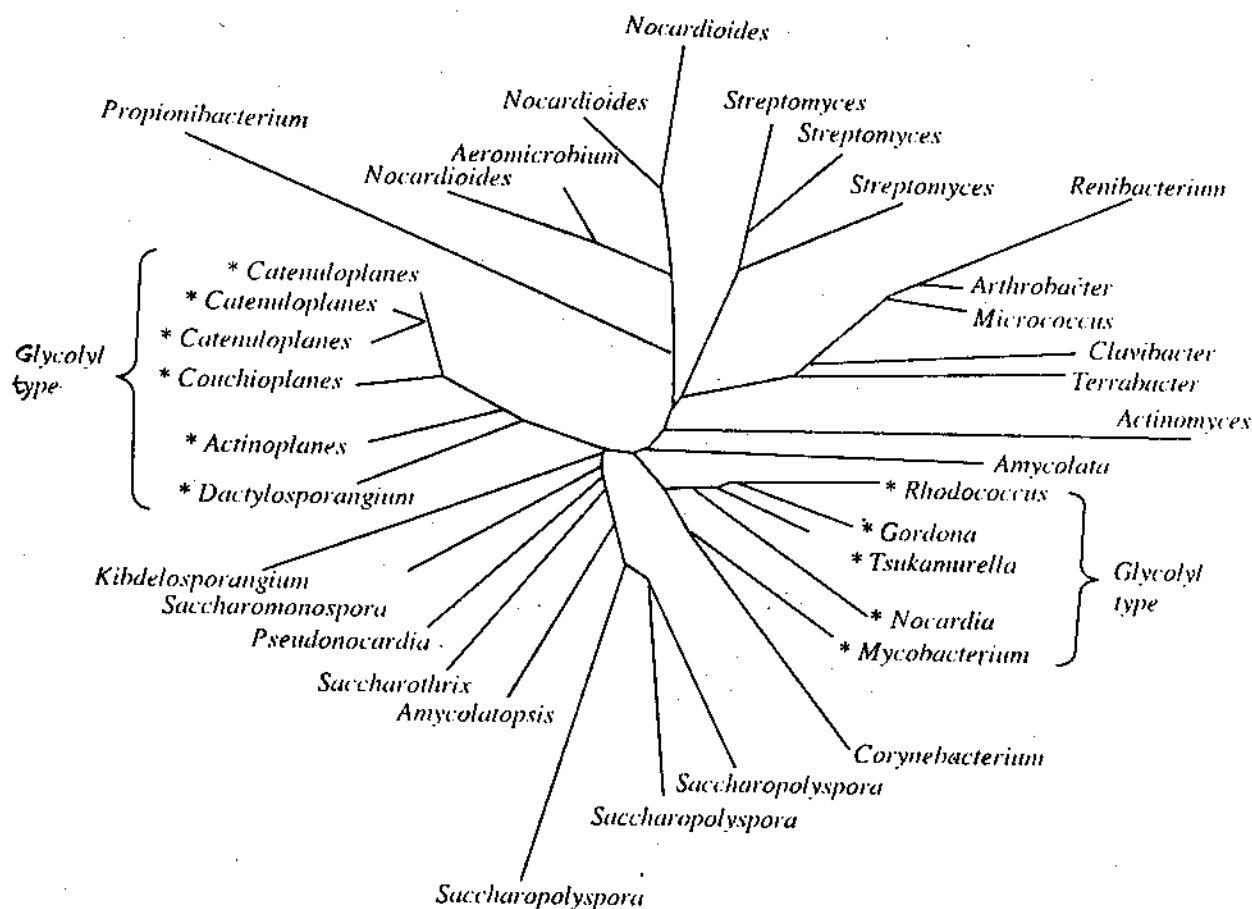
Một số dạng bào tử ở xạ khuẩn

- Bào tử đơn (Monosporous) : *Micromonospora* (A) ; *Thermomonospora* (B) ; *Saccharomonospora* (C) ; *Thermoactinomyces* (D).
- Bào tử kép (Disporous) : *Microbispora* (E).
- Chuỗi bào tử ngắn (Oligosporous) : *Nocardia brevicatena* (F) ; *Catellatospora* (G).





Sự hình thành chuỗi bào tử dài ở xạ khuẩn chi *Streptomyces* (A, B, C, D) ; chi *Nocardiopsis* (E).



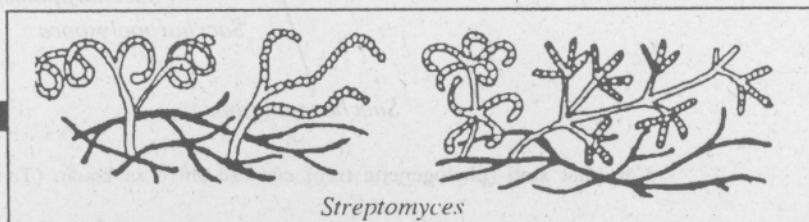
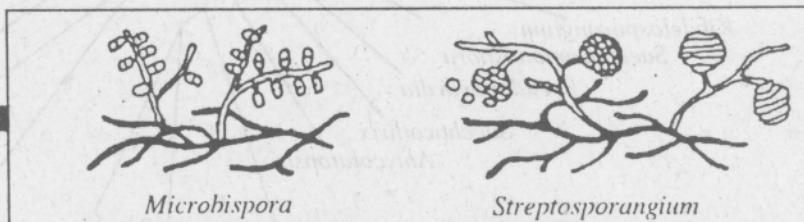
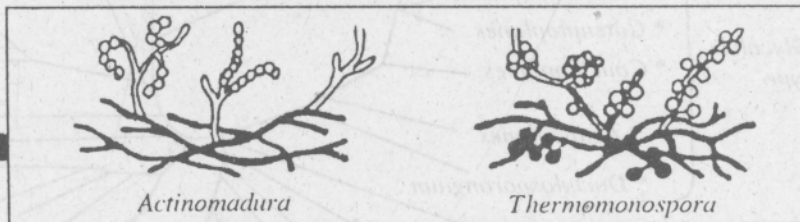
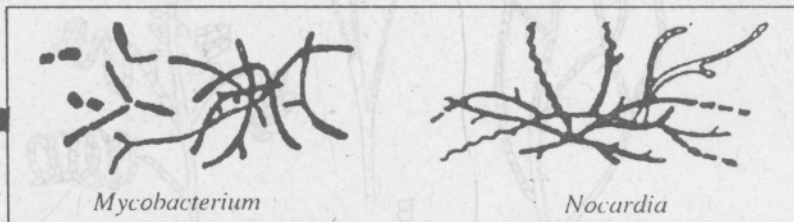
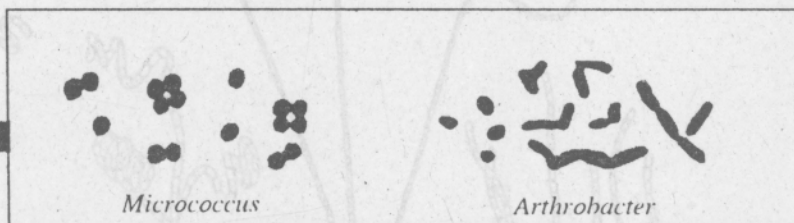
Cây phát sinh (phylogenetic tree) của các chi ở xạ khuẩn (Tamura và cộng sự, 1994).

Tỉ lệ G + X thấp
(<50%)

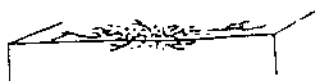
Gram dương

Tỉ lệ G + X cao
(>50%)

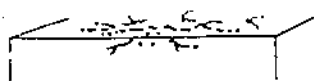
Mối quan hệ
phát sinh
(phylogentic
relationship)
của xạ khuẩn
và một số vi
khuẩn G⁺
trên cơ sở phân
tích tần số
nucleotit ở
16s của ARN
ribosom (rARN)



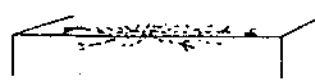
SƠ ĐỒ CÁC CHI XÁ KHUẨN (BERGCY - 2000)



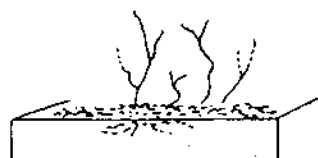
Actinomyces
Rothia
Agromyces



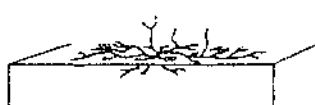
Jonesia



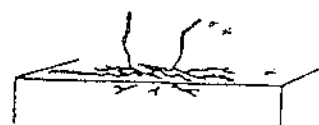
Gordona
Rhodococcus
Tsukamurelia



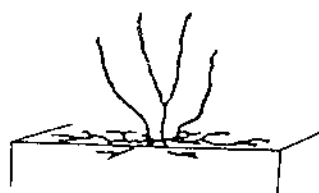
Nocardia



Actinobispora



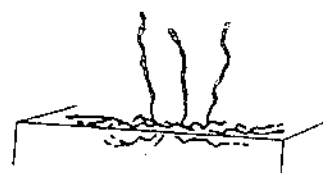
Actinokineospora



Actinopolyspora



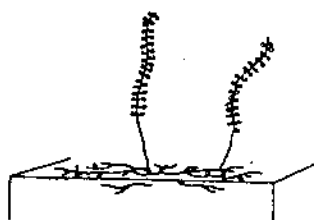
Amycolata
Amycolatopsis
Pseudomycolata



Pseudonocardia



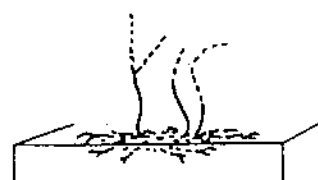
Kibdelosporangium



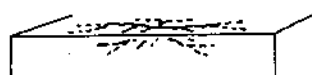
Saccharomonospora



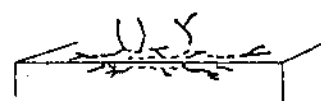
Saccharopolyspora



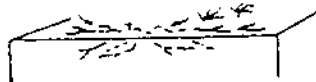
Nocardioidea



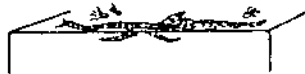
Terrabacter



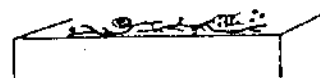
Promicromonospora



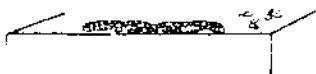
Oerskovia



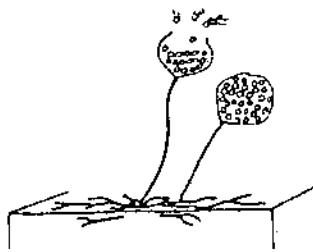
Dermatophilus



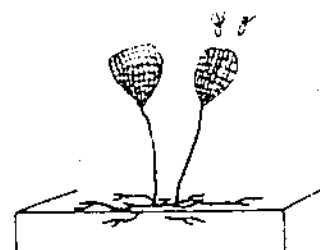
Frankia



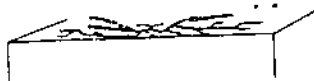
Geodermatophilus



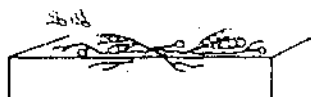
Actinoplanes



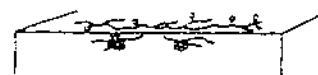
*Ampullariella
Pilimelia*



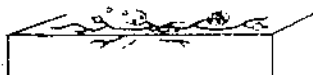
Catellospora



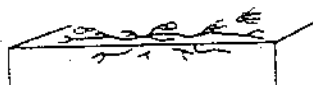
Dactylosporangium



Micromonospora



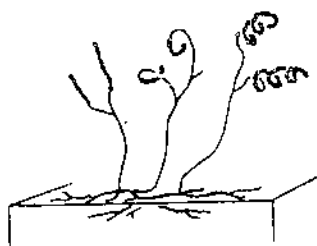
Intrasporangium



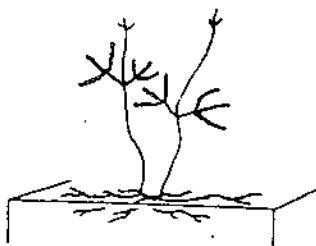
Kineosporia



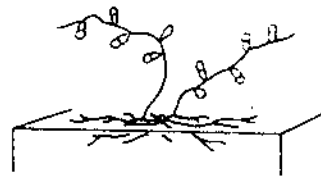
Sporichthya



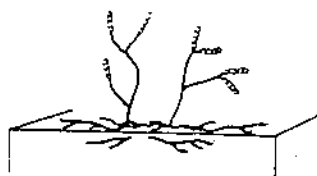
Streptomyces



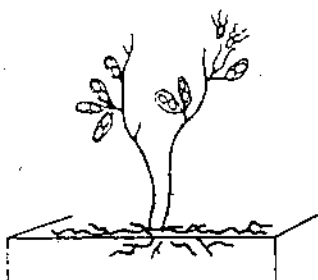
Streptoverticillium



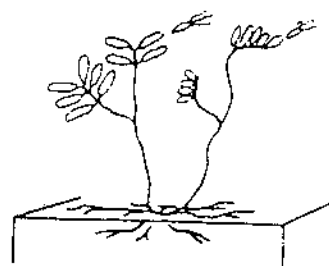
Microbispora



Microtetrapora



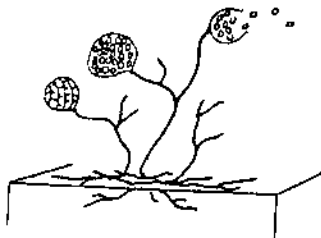
Planobispora



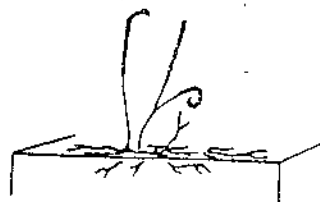
Planomonospora



Spirillospora



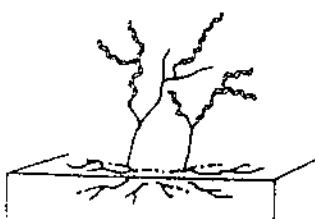
Streptosporangium



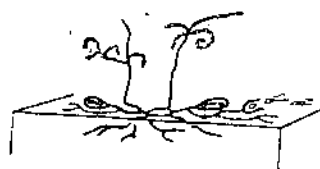
Actinomadura



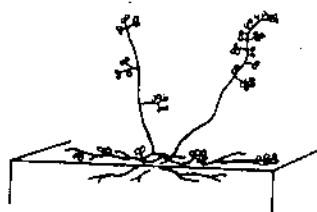
Actinosynnema



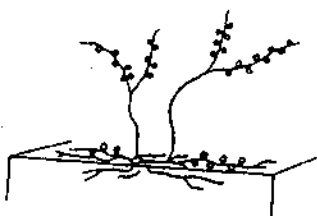
Nocardiosis



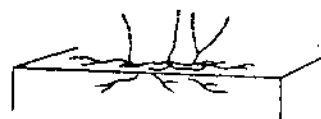
Streptoalloteichus



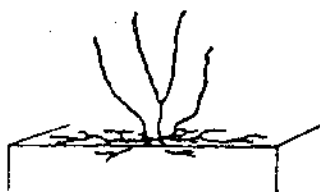
Thermomonospora



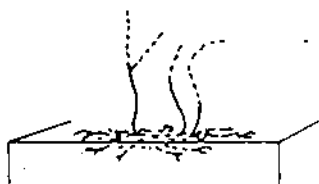
Thermoactinomyces



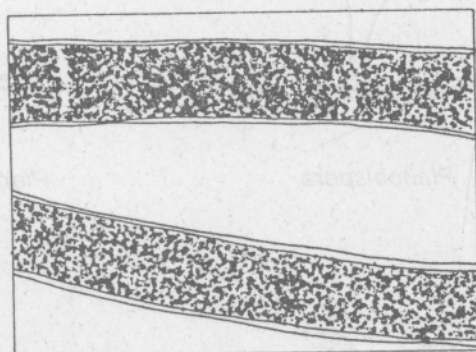
Glycomyces



Kitasatosporia



Saccharothrix



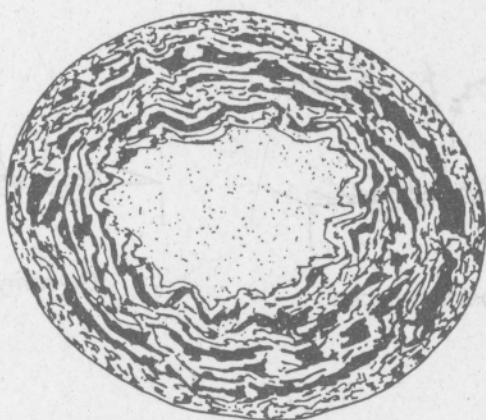
Tảo đoạn (hormogonium)
đang tách ra khỏi sợi
vi khuẩn lam



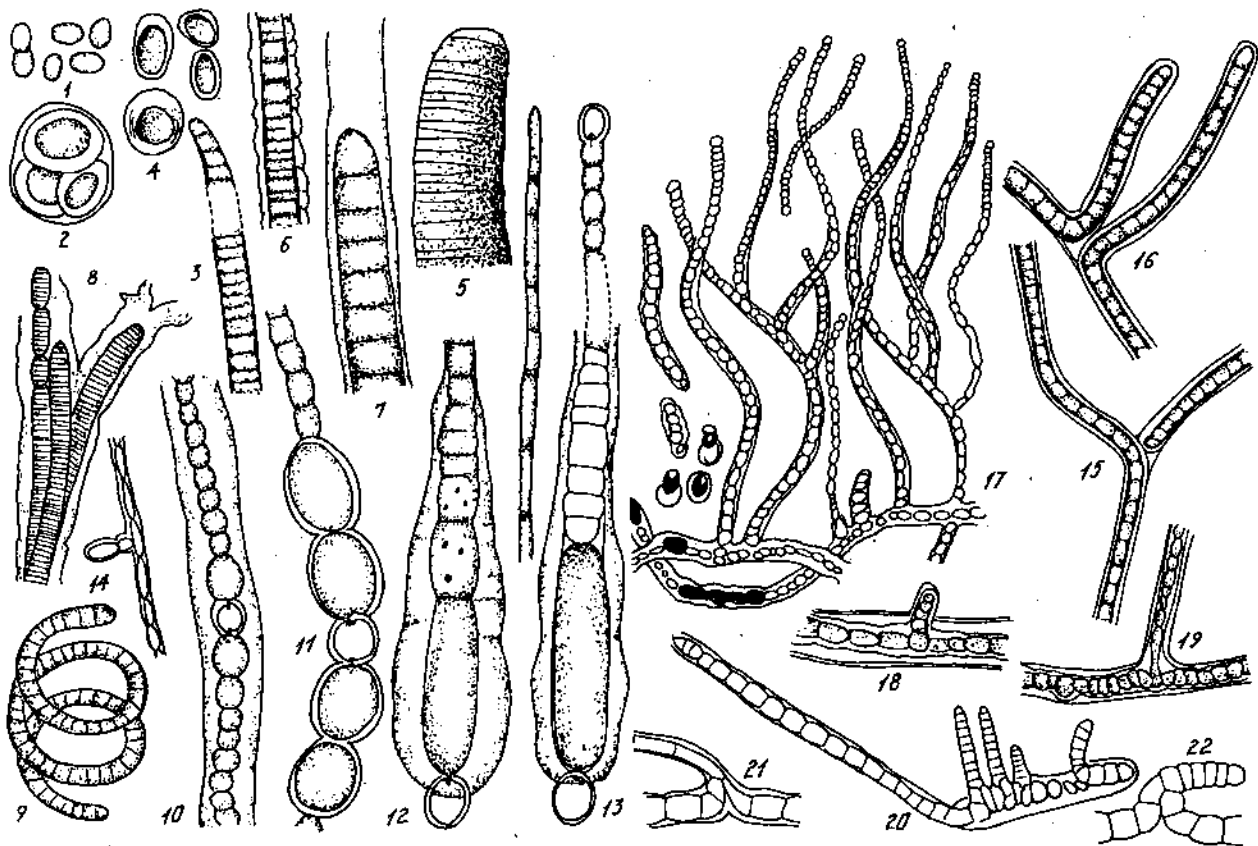
Tảo đoạn.



Bào tử nghỉ
(akinete)

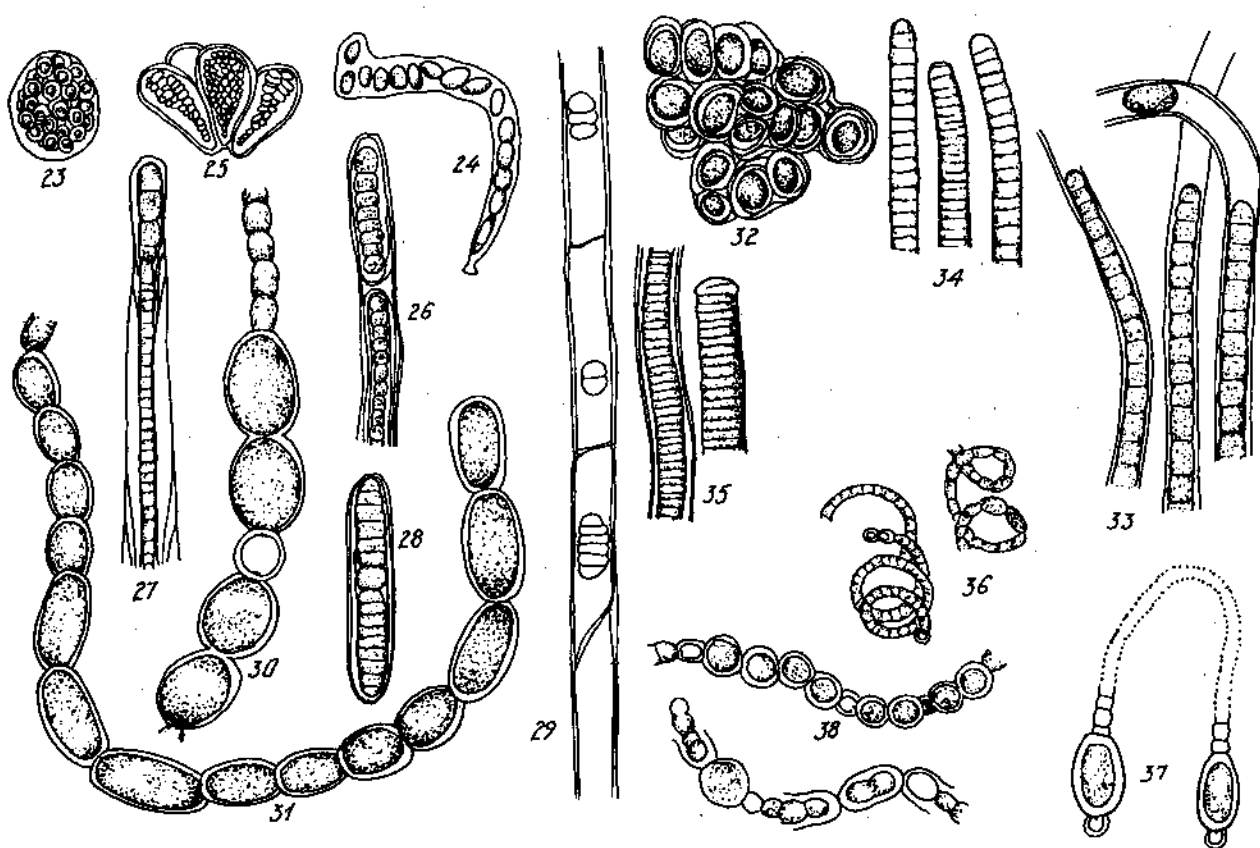


Vi khuẩn lam *Prochloron* (ảnh chụp bản cắt siêu hiển vi). Đường kính tế bào khoảng $10\mu\text{m}$

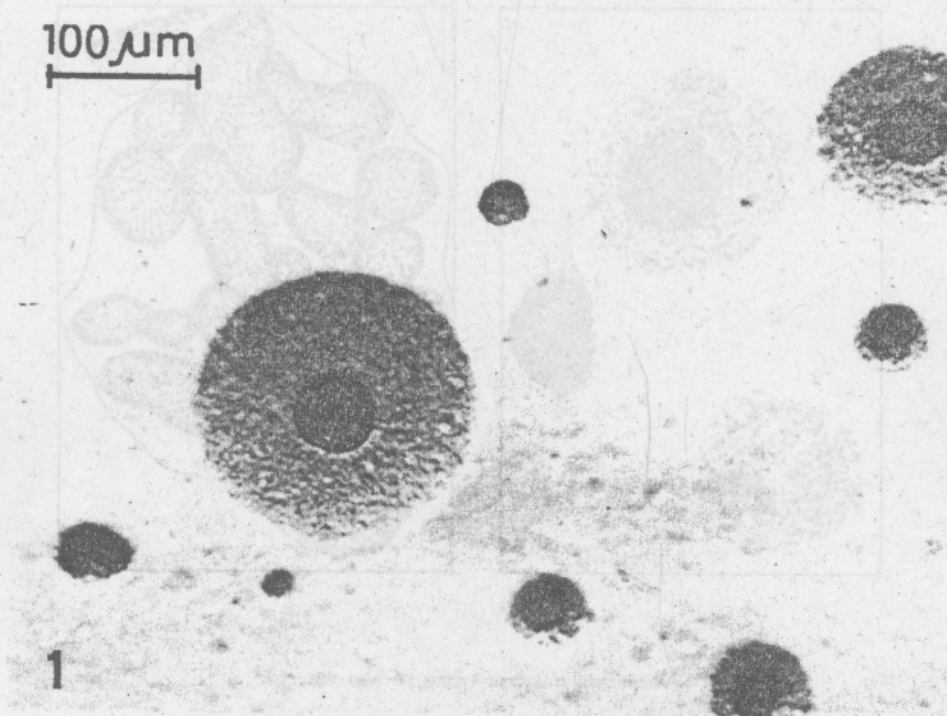


Hình thái chung của vi khuẩn lam

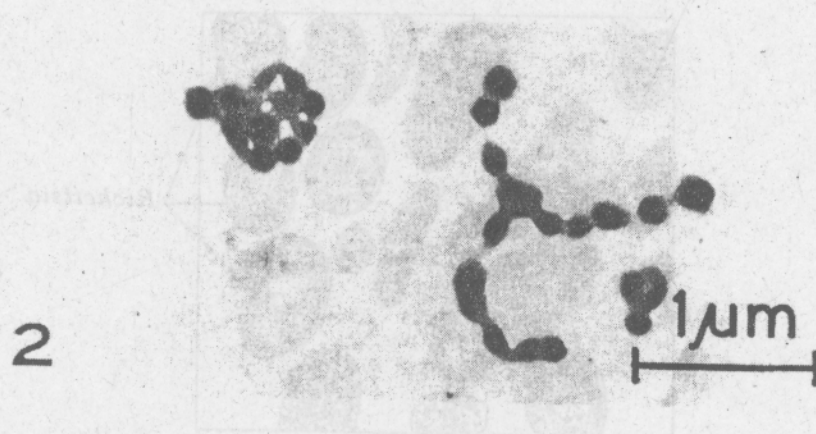
- 1 . Dạng đơn bào không có màng nhầy ; 2 . Dạng tập đoàn ; 3 . Dạng sợi ;
- 4 . Hình trụ, hình cầu, hình elip (có màng nhầy) ; 5 . *Oscillatoria* ; 6 . *Phormidium* ;
- 7 . *Lyngbya* ; 8 . *Schizothrix*, *Hydrocoleus* ; 9 . *Spirulina*, *Arthrospira* ;
- 10 . Dạng sợi có tế bào dị hình ; 11 . Dạng sợi có bào tử ; 12 . Sợi dính với bào tử ;
- 13 . Sợi ở cách xa bào tử ; 14 . Tế bào dị hình ở bên cạnh sợi ; 15 . Nhánh giả đơn độc ;
- 16 . Nhánh giả từng đôi một ; 17 . Sợi phân nhánh thực ;
- 18 . Phân nhánh ở sợi có bao (nhánh mới nảy sinh) ;
- 19 . Phân nhánh ở sợi có bao (nhánh đã phát triển) ; 20 . Phân nhánh bên ;
- 21 . Phân nhánh đôi ; 22 . Phân nhánh dạng chữ V ngược



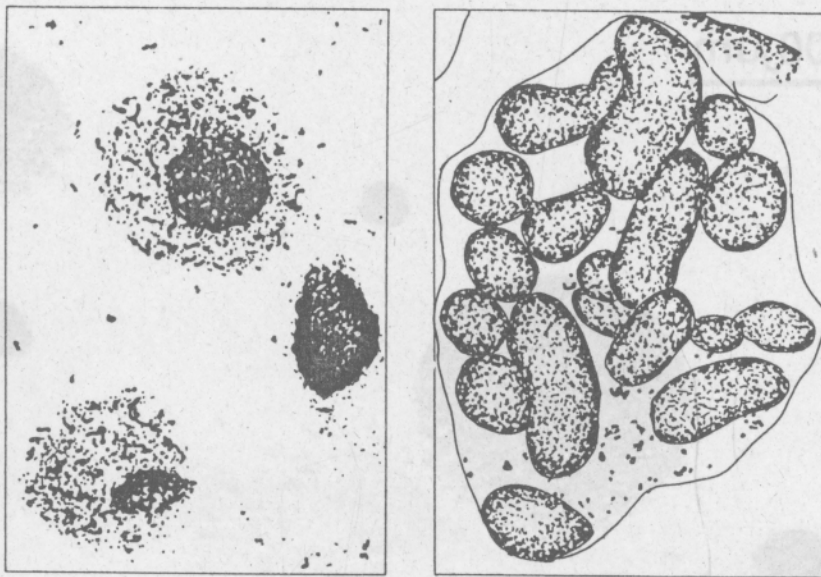
23. Vi tiểu bào nang (nannocyst) ;
24. Sự hình thành ngoại bào tử ;
25. Sự hình thành nội bào tử ;
26. Hormocyst ;
27. Hormocyst ;
28. Pseudohormogonia ;
29. Tảo đoạn (hormogonia)
30. Bào tử nghỉ (akinetete) ở 2 phía của tế bào dị hình ;
31. Bào tử nghỉ ở xa tế bào dị hình ;
32. *Gloeocapsa* ;
33. *Lyngbya* ;
34. *Oscillatoria* ;
35. *Phormidium* ;
36. *Anabaenopsis* ;
37. *Cylindrospermum* ;
38. *Anabaena*.



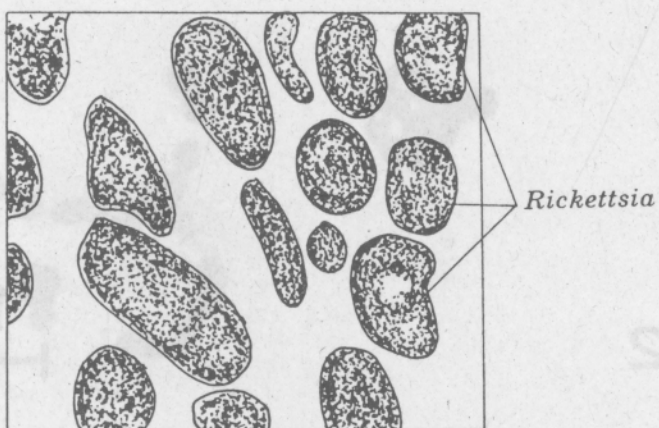
Khuẩn lạc của *Mycoplasma hominis* (lớn, màu nhạt có dạng trứng ốp-lếp)
và của *Ureaplasma urealyticum* (nhỏ, màu đậm)



Mycoplasma mycoides dạng cầu nối thành sợi dài
(ảnh chụp hiển vi điện tử)

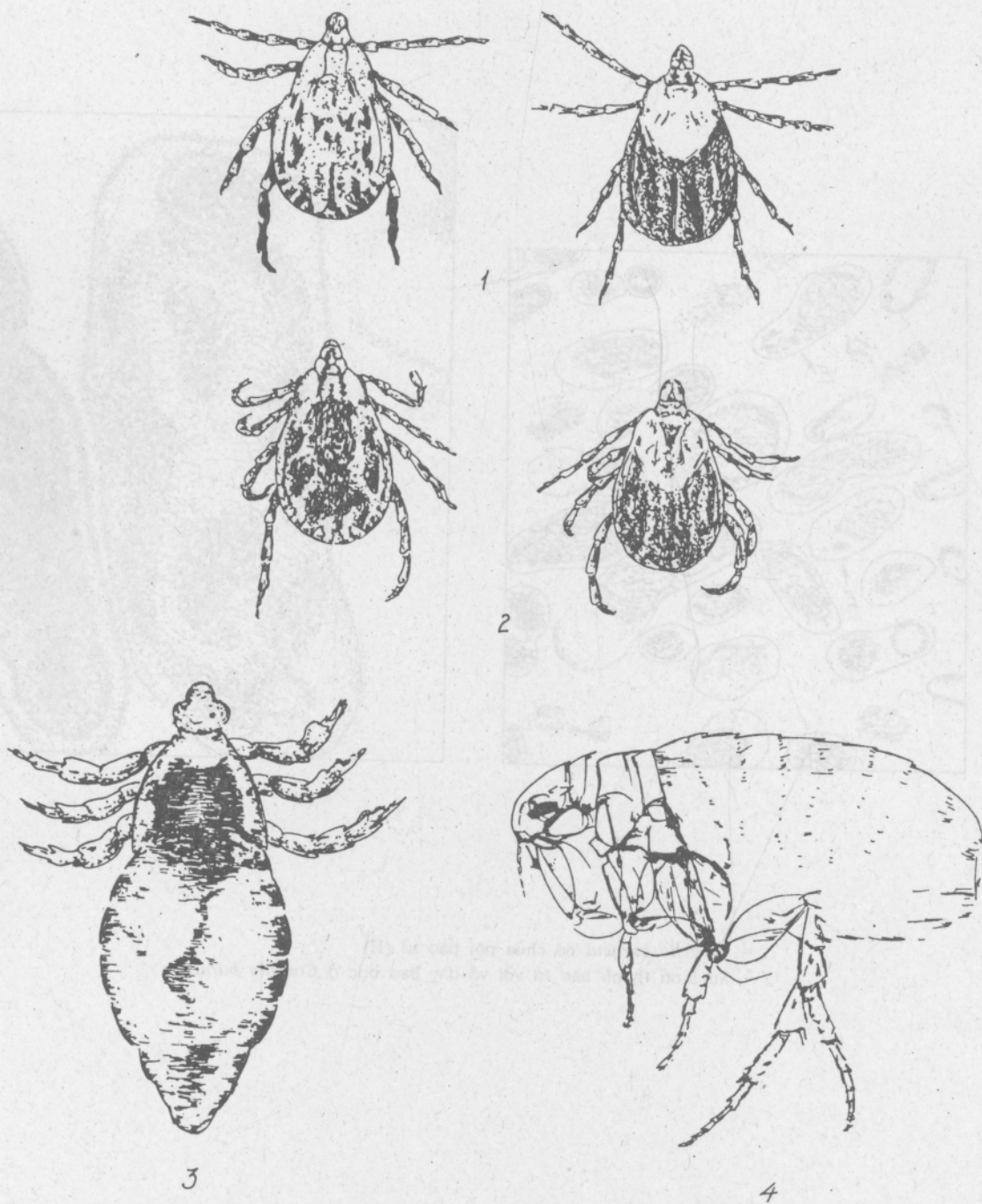


Rickettsia rickettsii trong tế bào vật chủ



Rickettsia trong tế bào vật chủ (ảnh phóng đại $\times 59.000$ lần)

841.841.
1880
1988.19



Các vật chủ trung gian truyền *Rickettsia*

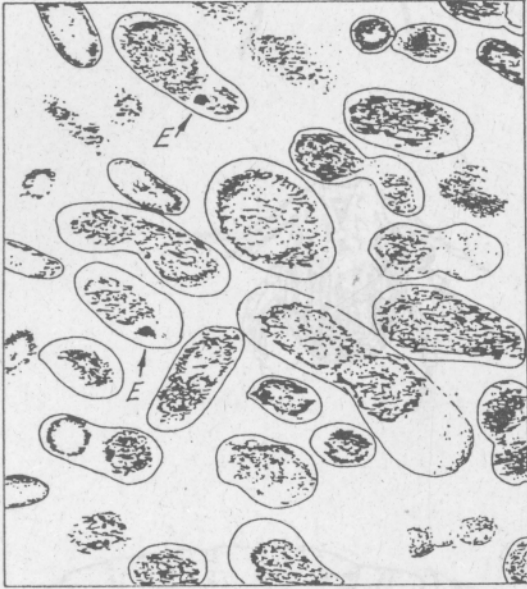
1 - *Dermacentor andersoni*

2 - *Dermacentor variabilis*

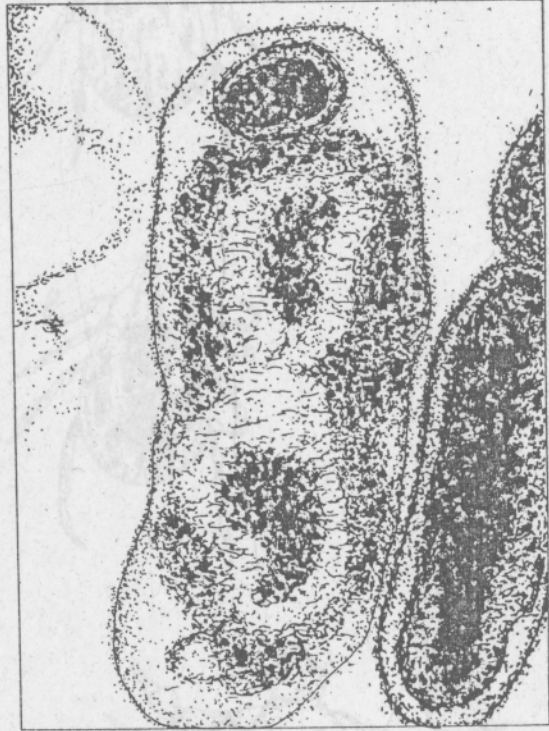
3 - *Pediculus humanus*

4 - *Xenopsylla cheopis*

B41-B47
00-XX
00-XX
00-XX

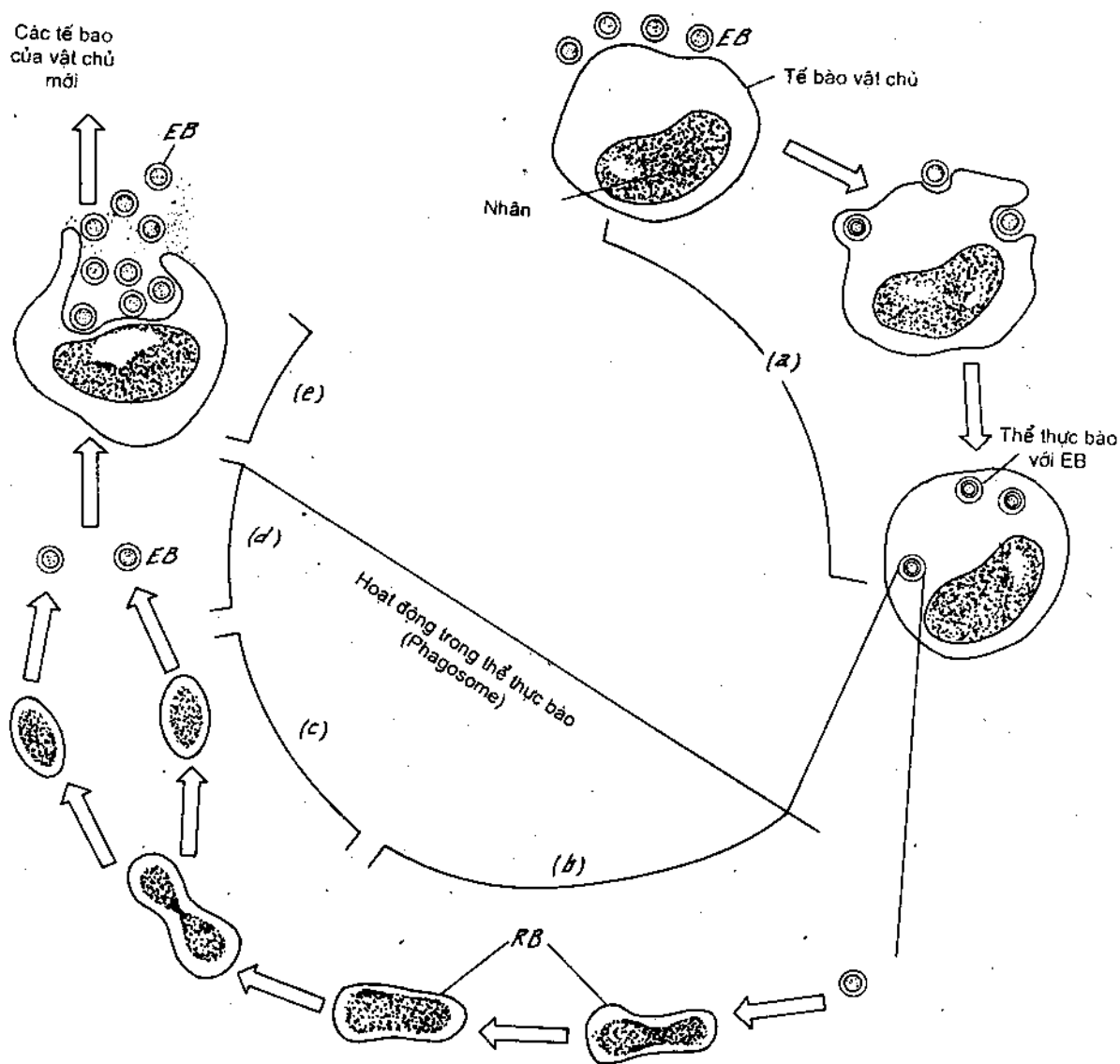


1

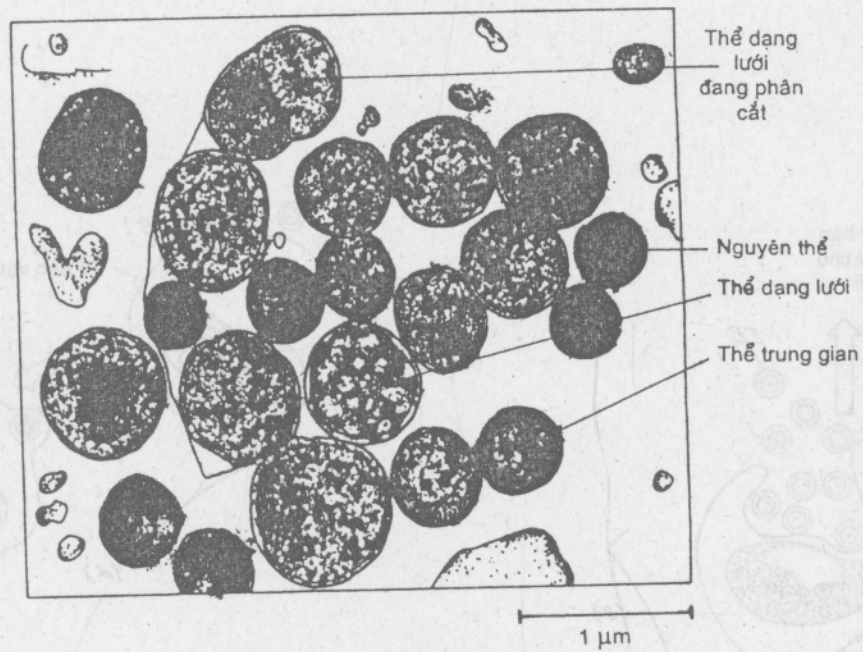


2

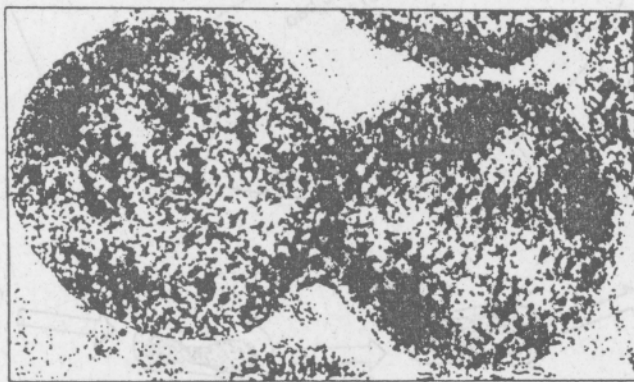
- 1 - *Coxiella burnetii* có chứa nội bào tử (E)
2 - Sự hình thành bào tử với vỏ dày bao bọc ở *Coxiella burnetii*



Chu kì sống của *Chlamydia*
 EB = nguyên thể (Elementary body)
 RB = IB = Thể dạng lưới (Reticulate body) hay thủy thể (Initial body)



Chlamydia psittaci trong tế bào vật chủ



Ảnh chụp hiển vi điện tử tế bào *Chlamydia psittaci* khi đang phân cắt

CHƯƠNG III

HÌNH THÁI VÀ CẤU TẠO TẾ BÀO CÁC VI SINH VẬT NHÂN THẬT (EUKARYOTES)

Vi sinh vật nhân thật bao gồm các vi nấm (microfungi), một số động vật nguyên sinh, một số tảo đơn bào. Vi nấm lại được chia thành nấm men (yeast) và nấm sợi (filamentous fungi). Về việc các động vật nguyên sinh và tảo đơn bào được coi là vi sinh vật chính là do có cơ thể nhỏ bé, cấu tạo đơn giản, chúng được xếp vào giới Nguyên sinh theo hệ thống phân loại 5 giới của R.H. Whittaker (xem chương I).

Trong chương này chúng ta chỉ xem xét về vi nấm.

1. ĐẶC ĐIỂM CHUNG CỦA VI NẤM

Vi nấm gồm tất cả các loài nấm men và các nấm sợi không sinh thể quả lớn (mũ nấm). Các nấm sinh thể quả dạng lớn thường được gọi là nấm lớn (mushroom). Tuy nhiên giai đoạn sợi nấm của các nấm lớn cũng vẫn là đối tượng nghiên cứu của vi sinh vật học.

Nấm nói chung là các sinh vật thuộc một giới riêng biệt (giới Nấm - Fungi), chúng có chung 7 đặc điểm sau đây :

a. Cơ thể nấm là một tản (thallus), tức là một cơ thể có bộ máy dinh dưỡng chưa phân hóa thành các cơ quan riêng biệt. Tản của nấm có thể là đơn bào hoặc đa bào, đa số có dạng sợi gọi là sợi nấm hay khuẩn ti (hypha). Sợi nấm có thể có hoặc không có vách ngang (sept). Sợi nấm có đường kính trung bình là $5-10\mu m$, đôi khi rất lớn (tới $25\mu m$) nhưng cũng có khi rất nhỏ ($1-2\mu m$). Đặc biệt sợi nấm của loài *Achlya conspicua* có đường kính rộng tới $160-170\mu m$. Có sợi nấm trong suốt, không màu, có sợi có màu. Một số sợi nấm tiết sắc tố vào môi trường nuôi cấy. Một số sợi nấm khác có thể tiết ra các chất hữu cơ, kết tinh trên bề mặt sợi nấm. Đa số sợi nấm phân nhánh nhiều lần nhưng cũng có loại sợi nấm không phân nhánh. Từ một bào tử hay một đoạn sợi nấm gặp điều kiện thuận tiện sợi nấm sẽ phát triển ra theo cả ba chiều tạo thành một khối sợi nấm, ta gọi là hệ sợi nấm hay khuẩn ti thể (mycelium). Ở một số nấm các sợi nấm quấn chặt với nhau, thậm chí dính liền với nhau theo chiều dọc tạo ra những dạng hình thái đặc biệt của nấm như thể đệm (stroma), hạch nấm (aclarotium), rễ giả (rhizoid), bó sợi nấm (synnema), thể quả (fruiting body hay sporocarp) v.v....

b. Các vách ngang ở sợi nấm ngăn vách đều có lỗ thông. Tùy loại nấm mà vách ngang có thể có một lỗ thông khá lớn ở chính giữa (ví dụ ở Nấm túi và Nấm bất toàn), có thể có nhiều những lỗ thông tương đối nhỏ (ví dụ ở *Geotrichum candidum*

và nhiều loài *Fusarium*), cũng có thể có một lỗ thông ở chính giữa nhưng mép lỗ dầy lên bên ngoài có một màng mỏng che phủ (màng parenthesome). Qua lỗ thông không những chất nguyên sinh có thể đi qua mà nhân tế bào cũng có thể thót nhỏ lại để chui qua. Nhân tế bào trong sợi nấm thường di chuyển tới những phần sợi nấm đang có hoạt động sinh lí mạnh mẽ. Như vậy là ở cả sợi nấm không ngăn vách lẫn ở sợi nấm có ngăn vách về thực chất chỉ là những ống dài chứa chất nguyên sinh và nhiều nhân tế bào. Trừ các tế bào nấm men đơn bào còn sợi nấm rõ ràng chưa có cấu tạo tế bào điển hình như ở các sinh vật nhân thật khác. Mỗi tế bào trong một sợi nấm chưa có hoạt động trao đổi chất độc lập vì chưa có giới hạn rõ rệt.

c. Dù sao thì nấm cũng có rất nhiều đặc điểm chung, với các sinh vật có nhân thật, nhất là về cấu tạo của nhân. Nấm khác hẳn về nhiều mặt với các vi sinh vật thuộc nhóm nhân nguyên thủy như vi khuẩn và vi khuẩn lam.

d. Nấm có những đặc điểm riêng biệt về mặt hóa học tế bào. Nấm không có cấu trúc thống nhất giữa các nhóm về thành phần của thành tế bào. Chỉ có một số ít có chứa xenlulozơ trong thành tế bào. Chất dự trữ của nấm không phải là tinh bột như ở thực vật mà là glicogen như ở động vật.

Thành tế bào của các nhóm nấm chủ yếu có cấu trúc như sau :

Nhóm nấm	Thành phần chính của thành tế bào
+ Ngành Myxomycota (Gymnomycota)	
- Myxomycetes	Xenlulozơ
- Acrasiomycetes.	Xenlulozơ - Glicogen
+ Ngành Eumycota :	
. Ngành phụ Mastigomycotina	
- Plasmodiophoromycetes	Kitin
- Oomycetes	Xenlulozơ - Glucan
- Hyphochytridiomycetes	Xenlulozơ - Kitin
- Chytridiomycetes	Kitin - Glucan
. Ngành phụ Zygomycotina	
- Zygomycetes	Kitin - Kitozan
- Trichomycetes	Poligalactozamin - Galactan
. Ngành phụ Ascomycotina và Deuteromycotina	Kitin - Glucan
Loại trừ :	
- Saccharomycetaceae	Glucan - Mannan
và Cryptococcaceae	
- Rhodotorulaceae	
và Sporobolomycetaceae	Kitin - Mannan
Ngành phụ Basidiomycetes	Kitin - Glucan

Xenlulozơ là hợp chất cao phân tử của D - glucozơ, mannan là hợp chất cao phân tử của D - mannozơ. Glucan là homopolisaccarit của glucozơ. Poligalactozamin là homopolisaccarit của galactozamin. Glicogen có cấu tạo như amilopectin nhưng số gốc glucozơ nhiều hơn ở tinh bột (thường tới 600.000 gốc glucozơ).

e. Khác với thực vật và các vi khuẩn quang hợp nấm không chứa trong tế bào các sắc tố quang hợp và vì vậy không có khả năng quang hợp, không có khả năng sống tự dưỡng. Nấm chỉ có đời sống hoại sinh (trên chất hữu cơ chết), kí sinh (trên cơ thể sống) hoặc cộng sinh (với tảo hoặc vi khuẩn lam trong địa y, với rễ cây trong nấm rễ hay khuẩn căn (mycorrhiza)).

f. Nấm sinh sản bằng bào tử vô tính và bào tử hữu tính.

Các bào tử vô tính khác nhau ở hình thái và ở nguồn gốc phát sinh. Căn cứ vào đặc điểm phát sinh người ta phân ra thành bào tử kín và bào tử trần. Một dạng bào tử vô tính không phải là dạng sinh sản được gọi là bào tử màng dày hay bào tử áo. Chúng do một đoạn sợi nấm tích lũy nhiều chất dinh dưỡng và có thành tế bào dày lên mà tạo thành nhằm mục đích thích ứng với các điều kiện bất lợi của môi trường. Một kiểu bào tử vô tính khác đó là các bào tử có roi có khả năng bơi lội trong nước, người ta gọi là các bào tử động. Về bào tử vô tính ở nấm còn phải kể đến bào tử đốt, bào tử phấn, bào tử chồi.

Các bào tử hữu tính ở nấm rất đa dạng. Có thể kể đến bào tử noãn, bào tử tiếp hợp, bào tử túi, bào tử đám.

g. Nấm không có một chu trình phát triển chung. Có thể phân biệt được 5 kiểu chu trình phát triển của nấm :

- *Chu trình lưỡng bội* : Giai đoạn đơn bội tương ứng với thể giao tử giới hạn ở các giao tử hoặc các nang giao tử. Thể bào tử lưỡng bội chiếm ưu thế rõ rệt so với thể giao tử. Nhiều loài nấm thuộc lớp Chytridiomycetes và lớp Oomycetes có kiểu chu trình phát triển này.

- *Chu trình hai thế hệ* : Trong chu trình này thể giao tử đơn bội xen kẽ với thể bào tử lưỡng bội và về nguyên tắc là tương đương nhau. Một số loài nấm thuộc lớp Oomycetes có kiểu chu trình phát triển này.

- *Chu trình đơn bội* : Sự giảm phân nối tiếp ngay với quá trình phối nhân (karyogamy) để tạo thành thể giao tử đơn bội. Thể giao tử đơn bội phát triển bằng các bào tử vô tính đơn bội và sinh ra một thế hệ thể giao tử đơn bội thứ hai. Thế hệ này tiếp tục phát triển bằng các bào tử vô tính đơn bội hoặc tạo thành các giao tử rất ít phân hóa về hình thái. Giai đoạn lưỡng bội tương ứng với thể bào tử chỉ tồn tại trong một thời gian rất ngắn. Nhiều loài nấm thuộc lớp Zygomycetes có kiểu chu trình phát triển này.

- *Chu trình đơn bội - song nhân* : Đây là một biến dạng của chu trình đơn bội. Ở nấm túi (Ascomycotina) giai đoạn đơn bội chiếm ưu thế so với giai đoạn song nhân. Các sợi nấm đơn bội sau một thời gian phát triển sẽ tạo ra các giao tử rất ít phân hóa về hình thái. Sau khi phối sinh chất (plasmogamy) nhân tế bào vẫn tồn tại riêng rẽ thành từng đôi. Giai đoạn này ngắn hơn giai đoạn đơn bội. Vì chưa xảy ra sự phối nhân cho nên ta coi cả hai giai đoạn này đều thuộc thể giao tử. Giai đoạn lưỡng bội ở chu trình này là không đáng kể. Sau khi phối nhân ở tế bào sinh túi (lưỡng bội) sẽ xảy ra ngay sự giảm phân để tạo ra các bào tử đơn bội. Ở Nấm đám (Basidiomycotina) hai đoạn sợi nấm đơn bội kết hợp lại với nhau để tạo thành đoạn sợi nấm song nhân đầu tiên. Giai đoạn song nhân này chiếm phần lớn chu trình của nấm này. Giai đoạn

lượng bội tương ứng với thể bào tử chỉ giới hạn ở tế bào sinh dâm và dâm non. Khi đó nhân lượng bội chưa phân chia giảm nhiễm.

- *Chu trình vô tính* : Đặc trưng cho Nấm bất toàn (Deuteromycotina), hoàn toàn không có giai đoạn hữu tính. Có thể kiểu chu trình này hoàn toàn không có thật trong tự nhiên, chẳng qua chỉ vì cho đến nay người ta chưa tìm thấy giai đoạn hữu tính của các nấm này.

2. NẤM MEN

Nấm men (Yeast, Levure) là tên gọi thông thường của một nhóm nấm có vị trí phân loại không thống nhất nhưng có chung các đặc điểm sau đây :

- Nói chung có tồn tại trạng thái đơn bào.
- Đa số sinh sôi nảy nở theo lối nảy chồi, cũng có khi hình thức phân cắt tế bào.
- Nhiều loại có khả năng lên men đường.
- Thành tế bào có chứa mannan
- Thích nghi với môi trường chứa đường cao, có tính axit cao.

Nấm men phân bố rất rộng rãi trong tự nhiên, nhất là trong các môi trường có chứa đường, có pH thấp, chẳng hạn như trong hoa quả, rau dưa, mật mía, rỉ đường, mật ong, trong đất ruộng mía, đất vườn cây ăn quả, trong các đất có nhiễm dầu mỡ.

2.1. Hình thái và cấu trúc của tế bào nấm men

Nấm men là vi sinh vật điển hình cho nhóm nhân thật. Tế bào nấm men thường lớn gấp 10 lần so với vi khuẩn. Loại nấm men nhà máy rượu, nhà máy bia thường sử dụng là *Saccharomyces cerevisiae*, có kích thước thay đổi trong khoảng $2,5 - 10\mu\text{m} \times 4,5 - 21\mu\text{m}$ do đó đã có thể thấy rõ được dưới kính hiển vi quang học.

Tùy loài nấm men mà tế bào có hình cầu, hình trứng, hình ôvan, hình chanh (chanh châu Âu), hình elip, hình mũ phớt, hình mụn cơm, hình sao thỏ, hình cái liềm, hình thuôn, hình thoi, hình ong, hình cung nhọn, hình tam giác, hình chai, hình kéo dài, hình mũ sắt, hình quả óc chó, hình bán cầu, hình thận, hình lược liềm, hình thấu kính, hình elip dài, hình quả lê, hình kim không có phần phụ, hình con suốt có phần phụ, hình bán cầu có rìa hẹp, hình mũ lược trai...

Có loài nấm men có khuẩn ti hoặc khuẩn ti giả. Khuẩn ti giả chưa thành sợi rõ rệt mà chỉ là nhiều tế bào nối với nhau thành chuỗi dài. Có loài có thể tạo thành váng khi nuôi cấy trên môi trường dịch thể.

Thành tế bào nấm men dày khoảng 25nm. (chiếm 25% khối lượng khô của tế bào). Đa số nấm men có thành tế bào cấu tạo bởi glucan và mannan. Một số nấm men có thành tế bào chứa kitin và mannan. Trong thành tế bào nấm men còn có chứa khoảng 10% protein (tính theo khối lượng khô), trong số protein này có một phần là các enzym. Trên thành tế bào còn thấy có cả một lượng nhỏ lipid.

Sử dụng dịch tiêu hóa của ốc sên *Helix pomatia* có thể làm phá vỡ thành tế bào của nấm men và làm sinh ra những tế bào trần. Chất dịch này có chứa tới trên 30 loại enzym khác nhau. Còn có thể dùng dịch này để phá vỡ thành bào tử túi của nấm men.

Dưới lớp thành tế bào là lớp màng tế bào chất. Lấy tế bào trần của nấm men rồi đưa vào trong một dung dịch có áp suất thẩm thấu thấp, li tâm để lấy ra màng tế bào chất, rửa và li tâm lại để thuần khiết màng, quan sát dưới kính hiển vi điện tử thấy nó có 3 tầng kết cấu khác nhau. Cấu tạo chủ yếu là protein (chiếm 50% khối lượng khô), phần còn lại là lipid (40%) và một ít polisaccarit.

Thành phần của màng tế bào chất nấm men	{	- Protein	{	- Lipit glixero-mono, di, trieste
		- Lipit		- Glixero-phospho lipit
				- Sterol
		- Hidrat cacbon		

Phần sterol trong màng tế bào chất nấm men khi được chiếu tia tử ngoại có thể chuyển hóa thành vitamin D₂. Lượng sterol trong tế bào của loài nấm men *Saccharomyces fermentati* có thể chiếm tới 22% khối lượng khô của tế bào. Nhân của tế bào nấm men được bao bọc bởi một màng nhân như ở các sinh vật có nhân thật khác. Màng nhân của nấm men có cấu trúc 2 lớp và có rất nhiều lỗ thủng.

Nhân của tế bào men rượu *Saccharomyces cerevisiae* có chứa 17 đôi nhiễm sắc thể. ADN trong tế bào nấm men đơn bội có khối lượng phân tử là 1×10^{10} Da (Dalton, 1 Da = $1,67 \times 10^{-24}$ g), so với khối lượng phân tử của ADN vi khuẩn *Escherichia coli* thì lớn hơn 10 lần nhưng so với ADN của người thì lại nhỏ hơn 100 lần.

Ti thể của nấm men cũng giống với các nấm sợi và các sinh vật có nhân khác. ADN của ti thể nấm men là một phân tử dạng vòng có khối lượng phân tử là 50×10^6 Da (gấp 5 lần so với ADN ti thể động vật bậc cao). ADN của ti thể nấm men chiếm 15 - 23% tổng lượng ADN của toàn tế bào nấm men.

Có một loại plasmit được phát hiện năm 1967 ở tế bào nấm men *Saccharomyces cerevisiae* được gọi là "2 μ m plasmit" có vai trò quan trọng trong thao tác chuyển gen của kĩ thuật di truyền. Loại plasmit này là một ADN vòng chứa 6300 đôi bazơ.

Các tế bào nấm men khi già sẽ xuất hiện không bào. Trong không bào có chứa các enzym thủy phân, poliphosphat, lipoit, ion kim loại, các sản phẩm trao đổi chất trung gian. Ngoài tác dụng một kho dự trữ, không bào còn có chức năng điều hòa áp suất thẩm thấu của tế bào.

Trong một số tế bào nấm men (ví dụ ở loài *Candida albicans*) còn thấy các vi thể. Đó là các thể hình cầu hay hình trứng, đường kính 3 μ m, chỉ phủ một lớp màng dày khoảng 7nm. Vi thể có vai trò nhất định trong quá trình oxy hóa metanol.

2.2. Sinh sản và các chu kì sống của nấm men

Nấm men có nhiều phương thức sinh sôi nảy nở khác nhau :

A. Sinh sản vô tính :

(a). Nảy chồi : ở tất cả các chi nấm men

(b). Phân cắt : ở chi *Schizosaccharomyces*

(c). Bằng bào tử :

+ Bào tử đốt : ở chi *Geotrichum*

+ Bào tử bán : ở chi *Sporobolomyces*

+ Bào tử áo : ở nấm *Candida albicans* chẳng hạn.

B. Sinh sản hữu tính : Bào tử túi ở các chi *Saccharomyces*, *Zygosaccharomyces* và nhiều chi nấm men khác thuộc bộ Endomycetales.

Nảy chồi là phương pháp sinh sản phổ biến nhất ở nấm men. Ở điều kiện thuận lợi nấm men sinh sôi nảy nở nhanh, quan sát dưới kính hiển vi thấy hầu như tế bào nấm men nào cũng có chồi. Khi một chồi xuất hiện các enzym thủy phân sẽ làm phân giải phần polisaccarit của thành tế bào làm cho chồi chui ra khỏi tế bào mẹ. Vật chất mới được tổng hợp sẽ được huy động đến chồi và làm chồi phình to dần lên, khi đó sẽ xuất hiện một vách ngăn giữa chồi và tế bào mẹ. Thành phần của vách ngăn cũng tương tự như thành tế bào. Khi tế bào chồi tách khỏi tế bào mẹ ở chỗ tách ra còn giữ lại một vết sẹo của chồi, trên tế bào con cũng mang một vết sẹo. Các vết sẹo này có thể thấy rất rõ khi xử lý bằng các thuốc nhuộm như calcafluor hoặc primulin rồi quan sát dưới kính hiển vi huỳnh quang. Dưới kính hiển vi điện tử càng có thể thấy rất rõ hơn.

Phân cắt là hình thức sinh sản thấy ở chi nấm men *Schizosaccharomyces*. Lối phân cắt này tương tự như ở vi khuẩn. Tế bào dài ra, ở giữa mọc ra vách ngăn chia tế bào ra thành 2 phần tương đương nhau, mỗi tế bào con sẽ có một nhân.

Bào tử bán thường gặp ở chi nấm men *Sporobolomyces*, *Sporidiobolus*, *Bullera* và *Aessosporon*. Loại bào tử này có hình thận sinh ra trên một cuống nhỏ mọc ở các tế bào dinh dưỡng hình trứng. Sau khi bào tử chín, nhờ một cơ chế đặc biệt bào tử sẽ được bắn ra phía đối diện. Khi cấy các nấm men này trên thạch nghiêng theo một đường ziczac, ít hôm sau sẽ thấy trên thành ống nghiệm phía đối diện với bề mặt thạch sẽ có một đường ziczac khác do các bào tử bắn tạo thành.

Bào tử màng dày hay bào tử áo thường mọc ở đỉnh của các khuẩn ti giả (*pseudomycelium*) một số nấm men (như *Candida albicans*)

Bào tử túi được sinh ra trong các túi. Hai tế bào khác giới (mang dấu + và -) đứng gần nhau sẽ mọc ra hai mấu nối. Chúng tiến lại gần nhau và tiếp nối với nhau. Chỗ tiếp nối sẽ tạo một lỗ thông và qua đó chất nguyên sinh có thể đi qua để tiến hành phối chất, nhân cùng đi qua để tiến hành phối nhân. Sau đó nhân phân cắt thành 2, thành 4 thành 8. Mỗi nhân được bao bọc bởi chất nguyên sinh rồi được tạo màng dày chung quanh và hình thành các bào tử túi. Tế bào dinh dưỡng biến thành túi.

Chu kì sống của nấm men có thể phân ra thành 3 loại hình :

- Các tế bào dinh dưỡng đơn bội (n) có thể tiếp hợp với nhau để tạo ra tế bào dinh dưỡng lưỡng bội (2n). Sau quá trình giảm phân sẽ sinh ra các bào tử túi (thường là 4 bào tử túi). Bình thường khi không có sinh sản hữu tính chúng vẫn liên tục nảy chồi để sinh sôi nảy nở. Chu kì sống này thấy ở nấm men rượu *Saccharomyces cerevisiae*.

- Các tế bào dinh dưỡng đơn bội (n) sinh sản theo lối phân cắt. Hai tế bào khác dấu ở gần nhau sẽ tiếp hợp với nhau và sau quá trình phân cắt 3 lần, lần đầu giảm nhiễm sẽ tạo ra 8 bào tử túi. Tế bào mang 8 bào tử này trở thành túi. Khi túi vỡ các bào tử túi sẽ thoát ra ngoài và khi gặp điều kiện thuận lợi sẽ phát triển trở lại thành các tế bào dinh dưỡng. Chu kì sống này thấy ở *Schizosaccharmyces octospora* chẳng hạn.

- Thể dinh dưỡng chỉ có thể tồn tại dưới dạng lưỡng bội (2n), sinh sản theo lối này chỗi khá lâu. Bào tử túi đơn bội tiếp hợp từng đôi với nhau ngay cả từ khi còn nằm trong túi. Giai đoạn đơn bội tồn tại dưới dạng bào tử túi nằm trong túi và không thể sống một cách độc lập. Có thể thấy rõ chu kì sống này ở *Saccharomyces ludwigii*

2.3. Phân loại nấm men

J. Lodder (1970) đã xác định có 349 loài nấm men, thuộc 39 chi khác nhau.

J.A. Barnett, R.W. Payne và D.Yarrow (1983) xác định có 483 loài nấm men, thuộc 66 chi khác nhau :

- *Aciculoconidium* : 1 loài ; *Ambrosiozyma* : 3 loài ; *Arthroascus* : 1 loài ; *Botryosaccharomyces* : 1 loài ; *Brettanomyces* : 7 loài ; *Bullera* : 6 loài ; *Candida* : 155 loài ; *Citeromyces* : 1 loài ; *Clavispora* : 1 loài ; *Cryptococcus* : 24 loài ; *Cyniclomyces* : 1 loài ; *Debaryomyces* : 11 loài ; *Debaryozyma* : 1 loài ; *Dekkera* : 2 loài ; *Eeniella* : 1 loài ; *Endomyces* : 1 loài ; *Endomycopsella* : 2 loài ; *Filobasidiella* : 1 loài ; *Filobasidium* : 3 loài ; *Geotrichum* : 10 loài ; *Guilliermondella* : 1 loài ; *Hanseniaspora* : 7 loài ; *Hansenula* : 27 loài ; *Hormoascus* : 1 loài ; *Hyphopichia* : 1 loài ; *Issatchenkia* : 4 loài ; *Kloeckera* : 1 loài ; *Kluyveromyces* : 11 loài ; *Leucosporidium* : 6 loài ; *Lipomyces* : 5 loài ; *Lodderomyces* : 1 loài ; *Malassezia* : 2 loài ; *Mastigomyces* : 1 loài ; *Metschnikowia* : 6 loài ; *Nadsonia* : 3 loài ; *Nematospora* : 1 loài ; *Oosporidium* : 1 loài ; *Pachsolon* : 1 loài ; *Pachytichospora* : 1 loài ; *Phaffia* : 1 loài ; *Pichia* : 62 loài ; *Rhodospiridium* : 9 loài ; *Rhodotorula* : 18 loài ; *Saccharomyces* : 7 loài ; *Saccharomycodes* : 2 loài ; *Saccharomycopsis* : 2 loài ; *Sarcinosporon* : 1 loài ; *Shizoblastosporion* : 1 loài ; *Shizosaccharomyces* : 4 loài ; *Schwanniomyces* : 1 loài ; *Sporidiobolus* : 5 loài ; *Sporobolomyces* : 6 loài ; *Sporopachydermia* : 3 loài ; *Stephansascus* : 1 loài ; *Sterigmatomyces* : 6 loài ; *Sterigmatosporidium* : 1 loài ; *Sympodiomyces* : 1 loài ; *Torulaspora* : 3 loài ; *Trichosporon* : 8 loài ; *Trigonopsis* : 1 loài ; *Wickerhamia* : 1 loài ; *Wickerhamiella* : 1 loài ; *Williopsis* : 5 loài ; *Wingea* : 1 loài ; *Yarrowia* : 1 loài ; *Zygosaccharomyces* : 8 loài.

Đặc điểm sinh học của từng loài và khóa phân loại đến chi, đến loài có thể tham khảo cuốn Phân loại Nấm men do Bảo tàng giống chuẩn vi sinh vật (Đại học quốc gia Hà Nội) xuất bản năm 1995.

Rất nhiều loài nấm men đã được ứng dụng rộng rãi trong sản xuất : công nghiệp sản xuất bia, rượu, nước giải khát, sinh khối phục vụ chăn nuôi, và cao nấm men, lipid nấm men, các enzym như amilaza, invertaza, lactaza, uricaza, poligalacturonaza, sản xuất ergosterol, axit ribonucleic, riboflavin (vitamin B₂), các axit amin như lizin, xixtein, metionin.

Loài *Saccharomyces cerevisiae* hiện đang được sử dụng như một công cụ đắc lực để mang các ADN tái tổ hợp phục vụ cho việc sản xuất các sản phẩm thế hệ mới của kĩ thuật di truyền.

Tuy nhiên bên cạnh các nấm men có ích cũng có không ít các nấm men có hại, chúng gây ra hiện tượng làm hư hỏng thực phẩm tươi sống hoặc các thực phẩm chế biến. Có khoảng 13 - 15 loài nấm men có khả năng gây bệnh cho người và cho động vật chăn nuôi. Đáng chú ý nhất là các loài *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Trichosporon cutaneum*, *T. capitatum*...

3. NẤM SỢI

Nấm sợi là tất cả các nấm không phải nấm men và cũng không sinh mũ nấm (thể quả có kích thước lớn) như ở các nấm lớn. Tuy nhiên ở tất cả các giai đoạn chưa sinh mũ nấm thì khuẩn ti thể (hệ sợi nấm) của nấm lớn vẫn được coi là nấm sợi và được nghiên cứu về các mặt sinh lí, sinh hóa, di truyền... như các nấm sợi khác.

Nấm sợi còn được gọi là nấm mốc, tức là chỉ tất cả các mốc mọc trên thực phẩm, trên chiếu, trên quần áo, trên giấy dép, trên sách vở... Chúng phát triển rất nhanh trên nhiều nguồn cơ chất hữu cơ khi gặp khí hậu nóng ẩm. Trên nhiều vật liệu vô cơ do dính bụi bặm (như các thấu kính ở ống nhòm, máy ảnh, kính hiển vi...) nấm mốc vẫn có thể phát triển, sinh axit và làm mờ các vật liệu này.

Nhiều nấm sợi kí sinh trên người, trên động vật, thực vật và gây ra các bệnh nấm khá nguy hiểm. Nhiều nấm sợi sinh ra các độc tố nấm có thể gây ra bệnh ung thư và nhiều bệnh tật khác.

Trong tự nhiên nấm sợi phân bố rất rộng rãi và tham gia tích cực vào các vòng tuần hoàn vật chất, nhất là quá trình phân giải chất hữu cơ và hình thành chất mùn.

Rất nhiều loài nấm sợi đã được sử dụng rộng rãi trong công nghiệp chế biến thực phẩm (làm tương, nước chấm, nấu cồn, rượu sake, sản xuất axit xitric, axit gluconic...), trong công nghiệp enzyme (sản xuất amilaza, proteinaza, xenlulaza, pectinaza, ...), công nghiệp dược phẩm (sản xuất penixilin, xephalosporin, ecgoalcaloit, các steroid,...) sản xuất thuốc trừ sâu sinh học, kích thích tố sinh trưởng thực vật (gibberellin...), độ phì nhiêu và định lượng các chất hoạt động sinh học bằng các loài nấm chỉ thị, sản xuất sinh khối nấm sợi phục vụ chăn nuôi và dinh dưỡng cho người (mycoprotein), sử dụng nấm sợi để xử lí ô nhiễm môi trường, sản xuất các bình giống nấm để mở rộng nghề trồng nấm ăn các loại (nấm mỡ, nấm hương, nấm rơm, nấm bào ngư hay nấm sò, nấm linh chi, mộc nhĩ hay nấm mèo, ngân nhĩ...).

3.1. Hình thái và cấu trúc của sợi nấm

Các sợi nấm đều có chiều ngang tương tự như đường kính nấm men. Cấu trúc của sợi nấm cũng tương tự như cấu trúc của tế bào nấm men. Bên ngoài có thành tế bào, rồi đến màng tế bào chất, bên trong là tế bào chất với nhân phân hóa. Màng nhân có cấu tạo 2 lớp và trên màng có nhiều lỗ nhỏ. Trong nhân có hạch nhân. Bên trong tế bào nấm còn có không bào, ti thể, mạng lưới nội chất, bào nang, thể màng biên... Thể màng biên là một kết cấu màng đặc biệt, nằm ở giữa thành tế bào và màng tế bào chất, bao bọc bởi một lớp màng đơn và có hình dạng biến hóa rất nhiều (hình ống, hình túi, hình cầu, hình trứng hoặc hình nhiều lớp...). Công dụng của thể màng biên còn chưa được làm sáng tỏ, có thể là có liên quan đến sự hình thành thành tế bào.

Đỉnh sợi nấm bao gồm một chóp nón, không tăng trưởng và có tác dụng che chở bảo vệ cho phần ngọn của sợi nấm. Đây là phần mà chất nguyên sinh không có nhân và ít chứa các cơ quan tử. Phần này rất dễ tách rời với các phần còn lại của ngọn sợi nấm vì dưới chóp nón là một phần có thành rất mỏng. Dưới nữa là phần tạo ra

thành tế bào. Các sợi nhỏ trên thành tế bào xếp ngang (chéo góc với trục sợi nấm). Dưới nữa là phần tăng trưởng. Thành của phần này có cấu trúc sợi dạng mạng lưới. Ngọn sợi nấm tăng trưởng được là nhờ phần này. Dưới nữa là phần thành cứng hay còn gọi là phần thành thực của sợi nấm. Thành tế bào ở phần này ngoài các sợi ngang còn được tăng cường bởi các sợi dọc. Bắt đầu từ phần này trở xuống là chấm dứt sự tăng trưởng của sợi nấm. Giữa hai phần nói trên là một miền yếu và dễ gãy. Ở phần tăng trưởng sợi nấm chứa đầy chất nguyên sinh với nhiều nhân, nhiều cơ quan tử, nhiều enzim, nhiều axit nucleic. Đây là phần quyết định sự tăng trưởng và sự phân nhánh của sợi nấm.

Chúng ta dễ dàng chứng minh sự tăng trưởng chỉ ở ngọn của sợi nấm bằng cách ngâm một ít sợi nấm đang phát triển vào dung dịch FeCl_3 0,5%, giữ 1 phút rồi lại để cho sợi nấm phát triển tiếp trong những môi trường thích hợp. Sau một thời gian ta lấy sợi nấm ra xử lý tiếp với dung dịch $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$. Soi dưới kính hiển vi ta thấy tất cả sợi nấm bắt màu xanh (xanh Prussian) riêng phần ở sát đỉnh sợi nấm (vì mới tạo thành) nên không bắt màu. Có nghĩa là chỉ có phần này được dài ra kể từ lúc đã ngâm vào dung dịch FeCl_3 . Phần ngọn sợi nấm thường dài khoảng $100\mu\text{m}$ và thường tách các phần bên dưới bằng một không bào khá lớn.

Ở các loài nấm khuẩn ti không có vách ngăn đương nhiên là bên trong khuẩn ti có nhiều nhân. Người ta gọi đó là các tế bào đa nhân. Ở các loài nấm có vách ngăn thì do khả năng di chuyển của nhân mà từng tế bào có thể có chứa 1 nhân, 2 nhân, nhiều nhân hoặc chẳng có nhân nào. Nấm có sợi nấm không ngăn vách gặp ở các lớp Chytridiomycetes, Plasmodiophoromycetes, Oomycetes, Zygomycetes, Trichomycetes. Nấm thuộc tất cả các lớp khác trong ngành Nấm thật (Eumycota) đều có sợi nấm ngăn vách.

3.2. Các dạng biến hóa của hệ sợi nấm

Lúc bào tử nấm rơi vào một điều kiện môi trường thích hợp nó sẽ nảy mầm mọc ra theo cả ba chiều thành một hệ sợi nấm hay gọi là khuẩn ti thể. Trên khuẩn ti thể ta phân biệt được hai loại khuẩn ti. Khuẩn ti cơ chất hay khuẩn ti dinh dưỡng và khuẩn ti khí sinh. Khuẩn ti cơ chất cắm sâu vào môi trường còn khuẩn ti khí sinh phát triển tự do trong không khí.

Hệ sợi nấm có thể biến hóa để thích nghi với các điều kiện sống khác nhau thành các dạng đặc biệt sau đây :

- *Rễ giả (rhizoid)* : Trông gần giống như một chùm rễ phân nhánh, có tác dụng giúp nấm bám chặt vào cơ chất và hấp thụ chất dinh dưỡng từ cơ chất. Có thể thấy rõ rễ giả khi quan sát nấm *Rhizopus*.

- *Sợi hút (haustoria)* : Gặp ở các nấm kí sinh bắt buộc. Chúng được mọc ra từ khuẩn ti và phân nhánh rồi đâm sâu vào tế bào vật chủ, ở đó chúng có thể biến thành hình cầu, hình ngón tay hay hình sợi. Chúng sử dụng các sợi hút này để hút chất dinh dưỡng từ cơ thể của vật chủ.

- *Sợi áp (appressoria)* : Gặp ở các nấm kí sinh ở thực vật. Phần sợi nấm tiếp xúc với vật chủ sẽ phồng to ra, tăng diện tiếp xúc với vật chủ. Phần này thường có hình

đĩa, có nhiều nhân tế bào, áp chặt vào vật chủ. Các mô của vật chủ dưới tác dụng của enzym do nấm sinh ra sẽ bị phá hủy từng phần hay hoàn toàn. Qua mô bị phá hủy này các sợi nấm sẽ lặn sâu vào bên trong vật chủ và tiếp tục sinh enzym để tiêu hóa cơ thể vật chủ. Khác với sợi hút, sợi áp không phát triển thành các nhánh đâm sâu vào tế bào còn sống của vật chủ.

- *Sợi bò hay thân bò (stolon)* : Đó là đoạn sợi nấm khí sinh không phân nhánh, phát sinh từ các sợi nấm cơ chất, có hình thẳng hoặc hình cung. Đầu mút của các sợi bò chạm vào cơ chất phát triển thành các rễ giả để bám chắc vào cơ chất. Sợi bò cứ lan dần ra mọi phía kể cả trên thành thủy tinh của ống nghiệm, của nắp hộp Petri... Sợi bò và rễ giả thường gặp ở bộ *Mucorales*.

- *Vòng nấm hay mạng nấm* : Đó là những biến đổi ở các loài nấm có khả năng bẫy các động vật nhỏ trong đất (như amíp, tuyến trùng...). Vòng nấm có thể có dạng bong dính mọc ra từ những cuống ngắn xếp thẳng góc với sợi nấm chính. Đỉnh của các cuống này phình to ra thành bong hình cầu. Bong này tiết ra một chất dính trên khắp bề mặt. Khi một con mồi chạm vào chất dính này sẽ bị giữ chặt lại và mọc ra một nhánh đâm sâu xuyên qua vỏ ngoài của con vật. Các nhánh này lại phồng lên thành một bong nhỏ bên trong cơ thể con vật và tiếp tục phân nhánh thành các sợi hút.

Vòng nấm có dạng các sợi thông lọng có khuyên tròn dọc sợi nấm. Mỗi khuyên cấu tạo bởi 3 tế bào xếp nối tiếp nhau và nối vào sợi nấm chính bằng một đoạn ngắn. Khi mặt trong của 3 tế bào này tiếp xúc với con mồi (hay bất kì vật gì khác) thì lập tức các không bào sẽ phồng to ra và căng mạnh vào phía trong, thắt chặt con mồi lại. Sau đó lại mọc ra các nhánh xuyên sâu vào cơ thể con mồi và tiếp tục phát sinh ra các sợi hút.

Mạng nấm hay còn gọi là lưới dính là một mạng sợi dính với nhau như tấm lưới nhỏ. Các côn trùng chạm vào sẽ bị giữ chặt lấy. Sau đó một tế bào của mạng nấm sẽ phát triển thành một bong nhỏ và các sợi hút để tiêu hóa dần cả cơ thể con mồi.

Từ khuẩn ti khí sinh có thể mọc ra những sợi sinh sản vô tính hoặc hữu tính sau đây :

- *Đầu bào tử trần (conidial head)* : Các cơ quan sinh sản vô tính có thể có cấu tạo chứa các bào tử vô tính. Ở nấm thuộc các chi *Penicillium* và *Aspergillus* có các đầu bào tử trần với nhiều sợi nấm phân hóa khác nhau. Chẳng hạn ở chi *Penicillium* bắt đầu từ đoạn sợi chưa phân nhánh gọi là cuống nấm rồi đến các sợi phân nhánh bậc một gọi là cành tiếp đó là sợi phân nhánh bậc hai gọi là cành nhánh. Phần sinh ra các bào tử trần gọi là thể bình. Thể bình có thể có một lớp hoặc hai lớp. Ở *Aspergillus* thường chỉ có các cành nhánh mọc ra từ một bong còn gọi là bào nang. Các bào tử trần ở *Aspergillus* có thể tỏa tròn ra thành hình phồng xạ, cũng có thể hướng cả về một phía tạo thành hình trụ.

- *Nang bào tử kín (sporangia)* : là dạng biến đổi ở bộ *Mucorales*, mọc lên từ cuống nang. Mỗi nang bào tử kín có một nang trụ nối tiếp với cuống nang và nằm bên trong của nang bào tử kín. Các bào tử kín được sinh ra bên trong các nang này.

- *Đâm (basidia)* : là cơ quan sinh sản hữu tính do tế bào song nhân ở đỉnh sợi phình to ra mà tạo thành. Trong đâm hai nhân sẽ phối hợp với nhau để hình thành

một nhân lưỡng bội. Sau đó do phân cắt giảm nhiễm mà sinh ra 4 nhân đơn bội. Khi đó trên đám sẽ mọc ra 4 cuống nhỏ đầu phình to ra. Các nhân đơn bội sẽ đi vào 4 cuống nhỏ này và về sau phát triển thành 4 bào tử đám.

- *Túi giả (pseudium)* : là dạng hình thái có hình cầu hay hình chai mà vỏ cấu tạo bởi các lớp sợi nấm quấn chặt lại với nhau. Thành trong của vỏ mang các cuống bào tử trần. Các bào tử trần sinh ra từ đỉnh các cuống này.

- *Cụm giả (sporodochium)* : cấu tạo bởi các cuống bào tử trần ngắn xếp liền với nhau tạo thành một khối khá dày. Bào tử trần sinh ra trên đỉnh cuống, tạo thành một cái đệm gồm nhiều cuống dính với nhau một phần hoặc tất cả.

- *Đĩa giả (acervulus)* : gặp ở các nấm kí sinh trên thực vật, nằm bên dưới biểu bì hoặc tầng cutin. Đĩa giả gồm một đĩa phẳng cấu tạo bởi các sợi nấm quấn chặt lấy nhau trên đó có các cuống bào tử trần mọc thẳng đứng. Khi biểu bì của cây chủ vỡ ra, đĩa giả sẽ lộ ra bên ngoài. Bên cạnh các cuống bào tử trần còn thấy có các lông cứng.

- *Bó giả (coremium ; synnema)* : là nhiều cuống bào tử trần dài, xếp song song với nhau ở phần gốc hoặc suốt dọc cuống, mang các bào tử trần ở phần ngọn hoặc suốt dọc thân.

- *Hạch nấm (sclerotium)* : là một khối sợi nấm rắn chắc thường có tiết diện tròn, không mang các cơ quan sinh sản. Hạch nấm chỉ có ở các nấm có sợi nấm ngắn vách. Đó là một dạng sống nghỉ của nấm để bảo vệ nấm trải qua được các điều kiện bất lợi của môi trường sống. Hạch nấm thường có kích thước từ $100\mu\text{m}$ đến 1mm . Thường có cấu tạo 2 lớp : bên ngoài là lớp vỏ rắn cấu tạo bởi nhu mô giả có thành dày, phủ cutin và có sắc tố hạch nấm có màu vàng, nâu, tím đen..., lớp trong thường mềm hơn, cấu tạo bởi mô các tế bào hình thoi, gồm các sợi nấm bình thường hoặc gelatin hóa, vô màu, chứa nhiều chất dự trữ thuộc loại hidrat cacbon và lipit.

- *Thể đệm (stroma)* : còn gọi là đệm nấm, là một khối sợi nấm có thành tế bào dính liền nhau theo nhiều hướng. Trên hoặc trong thể đệm có mang các cơ quan sinh sản. Thể đệm chỉ gặp ở Nấm túi (*Ascomycotina*) và Nấm đảm (*Basidiomycotina*).

Các tế bào trong đệm nấm chưa tạo thành mô thật như ở động vật, thực vật mà chỉ là các mô giả. Có hai loại mô giả : mô tế bào hình thoi và nhu mô giả. Mô tế bào hình thoi có cấu tạo xếp, các sợi xếp song song với nhau và vẫn có thể phân biệt được từng sợi riêng biệt. Nhu mô giả có các tế bào hình đa giác hay hình tròn dính chặt với nhau, không tách rời được thành từng sợi.

- *Quả túi (fruit - bodies)* : là loại thể đệm gặp ở Nấm túi. Có dạng quả túi hình cầu (cleistothecium) có loại quả túi hình chai (perithecium), có loại quả túi hình đĩa (apothecium), loại quả túi hình cầu gặp ở lớp *Plectomycetes*, loại quả túi hình chai gặp ở lớp *Pyrenomycetes*, loại quả túi hình đĩa gặp ở lớp *Discomycetes*.

3.3. Hệ thống phân loại nấm

Cho đến nay chưa có hệ thống phân loại nấm nào được tất cả các nhà nấm học thống nhất công nhận. Tuy nhiên hệ thống phân loại của G.C. Ainsworth (1973) là được sử dụng rộng rãi hơn cả. Dưới đây là bảng giới thiệu vắn tắt hệ thống phân loại này.

Giới Nấm (Fungi)

a. Tồn tại nguyên chất đoàn (plasmodium) hoặc dạng nguyên chất đoàn giả (pseudo plasmodium)

... Ngành Nấm nhảy (Myxomycota)

aa. Không có dạng nguyên chất đoàn hoặc giả nguyên chất đoàn, giai đoạn dinh dưỡng là hệ sợi nấm (khuẩn ti thể) điển hình

... Ngành Nấm thật (Eumycota)

b. Có bào tử động, bào tử hữu tính là bào tử noãn

... Ngành phụ Mastigomycotina.

bb. Không có bào tử động xem c

c. Có giai đoạn hữu tính xem d

cc. Không có giai đoạn hữu tính ... Ngành phụ *Deuteromycotina*

d. Bào tử hữu tính là bào tử tiếp hợp (zygospores)

... Ngành phụ Zygomycotina

dd. Không có bào tử tiếp hợp xem e

e. Bào tử hữu tính là bào tử túi

... Ngành phụ Ascomycotina

ee. Bào tử hữu tính là bào tử đảm

... Ngành phụ Basidiomycotina

* Ngành phụ MASTIGOMYCOTINA (Sparrow, 1960) (Bào tử hữu tính là bào tử noãn)

+ Lớp Chytridiomycetes

- Bộ Chytridiales

Các họ : Olpidiaceae ; Achlyogenotaceae ; Synchytriaceae ; Phlyctidiaceae ; Rhizidiaceae ; Cladochytriaceae ; Physodermataceae ; Megachytriaceae

- Bộ Harpochytriales

Họ : Harpochytriaceae

- Bộ Blastocladales

Các họ : Coelomomycetaceae ; Catenariaceae ; Blastocladiaceae

- Bộ Monobleparidales

Các họ : Monoblepharidaceae ; Gonapodyaceae

+ Lớp Hyphochytridiomycetes

- Bộ Hyphochytridiales

Các họ : Anisopidiaceae ; Rhizidiomycetaceae ; Hyphochytriaceae

+ Lớp Plasmodiophoromycetes

- Bộ Plasmodiophorales

Họ Plasmodiophoraceae

+ Lớp Oomycetes

- Bộ Lagenidiales

Các họ : Olpidiopsidaceae ; Sirzopidiaceae Lagenidiaceae

- Bộ Saprolegniales

Các họ : Ectrogellaceae ; Haliphthoraceae ; Thraustochytriaceae ; Saprolegniaceae ; Leptolegniellaceae

- Bộ Leptomitales

Các họ : Leptomitaceae ; Rhipidiaceae ; Euglerulaceae ; Pseudosphaeriaceae ; Capnodiaceae ; Dothideaceae ; Dothioraceae

- Bộ Pleosporales

Các họ : Dimeriaceae ; Venturiaceae ; Mesnieraceae ; Botryosphaeriaceae ; Lophiostomataceae ; Sporormiaceae ; Pleosporaceae ; Mycoporaceae

- Bộ Hysteriales

Các họ : Hysteriaceae ; Arthoniaceae ; Opegraphaceae ; Phyllipsiellaceae ; Patellariaceae ; Lecanactidaceae

- Bộ Hemisphaeriales

Các họ : Microthyriaceae ; Trichopeltinaceae ; Munkielaceae ; Asterinaceae ; Aulographaceae ; Brefeldiellaceae ; Parmulariaceae ; Stephanothocaceae ; Schizothyriaceae ; Leptopeltidaceae ; Micropeltidaceae (Hemisphaeriaceae)

+ Lớp Laboulbeniomyces

- Bộ Laboulbeniales

Các họ : Ceratomycetaceae ; Laboulbeniaceae ; Peyritsiellaceae ;

+ Lớp Discomycetes

- Bộ Medeolariales ;

Họ Medeolariaceae ;

- Bộ Cyttariales ;

Họ Cyttariaceae

- Bộ Tuberales

Các họ : Elaphomycetaceae ; Terfeziaceae ; Protomycetaceae ;

- Bộ Taphrinales

Họ Taphrinaceae

+ Lớp Plectomycetes (Fennel, 1973)

- Bộ Eurotiales

Các họ : Amorphanthaceae ; Gymnoascaceae ; Monascaceae ; Onygenaceae ; Pseudeurotiaceae ; Thermoascaceae ; Trichocomaceae ; Eurotiaceae ; Cephalothecaceae ;

+ Lớp Pyrenomycetes (Muller, 1973)

- Bộ Erysiphales

Họ Erysiphaceae

- Bộ Meliolales

Họ Meliolaceae

- Bộ Coronophorales

Họ Coronophoraceae

- Bộ Sphaeriales

Các họ : Ophiostomataceae ; Melanosporaceae ; Sphaeriaceae ; Hypocreaceae ; Polystigmataceae ; Coryneliaceae ; Sordariaceae ; Diaporthaceae ; Halosphaeriaceae ; Diatrypaceae ; Amphisphaeriaceae ; Xylariaceae ; Verrucariaceae ; Clavicipitaceae ; Hypomycetaceae

+ Lớp Loculoascomycetes (Luttrell, 1973)

- Bộ Myriangiales

Các họ : Atichiaceae ; Myriangiaceae ; Saccardiaceae ; Saccardinulaceae

- Bộ Dothideales

Các họ : Trichothyriaceae ; Chaetothyriaceae ; Parodiopsidaceae

- Bộ Peronosporales

Các họ : Pythiaceae ; Albuginaceae ; Peronosporaceae

* Ngành phụ : ZYGOMYCOTINA (Bào tử hữu tính là bào tử tiếp hợp)

+ Lớp Zygomycetes (Hesseltine, 1973)

- Bộ Mucorales

Các họ : Choanephoraceae ; Cunninghamellaceae ; Dimargaritaceae ; Endogonaceae ; Helicocephalidaceae ; Kickxellaceae ; Mortierellaceae ; Mucoraceae ; Pilobolaceae ; Piptocephalidaceae ; Radiomycetaceae ; Saksenaeaceae ; Syncephalastraceae ; Thamnidaceae

- Bộ Entomophthorales

Các họ : Entomophthoraceae ; Zoopagales ; Zoopagaceae ; Cochlonemaceae ;

+ Lớp Trichomycetes (Bichtwardt, 1973)

- Bộ Harpellales

Các họ : Harpellaceae ; Genistellaceae

- Bộ Asellariales ;

Họ Asellariaceae

- Bộ Eccrinales

Các họ : Palavasciaceae ; Parataeniellaceae ; Eccrinaceae

- Bộ Amoebidiales

Họ Amoebidaceae

* Ngành phụ : ASCOMYCOTINA (Bào tử hữu tính là bào tử túi)

+ Lớp Hemiascomycetes

- Bộ Endomycetales

Các họ : Ascoideaceae ; Saccharomycetaceae ; Endomycetaceae ; Spermophthoraceae

- Bộ Protomycetales

Các họ : Geneaceae ; Tuberaceae

- Bộ Pezizales

Các họ : Sarcosomataceae ; Sarcoscyphaceae ; Ascobolaceae ; Pezizaceae ; Morchellaceae ; Helvellaceae ; Pyronemataceae

- Bộ Phacidiales

Các họ : Rhytismataceae ; Cryptomycetaceae ; Phacidiaceae

- Bộ Saprolegniales

Các họ : Ectrogellaceae ; Haliphthoraceae ; Thraustochytriaceae ; Saprolegniaceae ; Leptolegniellaceae

- Bộ Leptomitales

Các họ : Leptomitaceae ; Rhipidiaceae ; Euglerulaceae ; Pseudosphaeriaceae ; Capnodiaceae ; Dothideaceae ; Dothioraceae

- Bộ Pleosporales

Các họ : Dimeriaceae ; Venturiaceae ; Mesnieraceae ; Botryosphaeriaceae ; Lophiostomataceae ; Sporormiaceae ; Pleosporaceae ; Mycoporaceae

- Bộ Hysteriales

Các họ : Hysteriaceae ; Arthoniaceae ; Opegraphaceae ; Phyllipsiellaceae ; Patellariaceae ; Lecanactidaceae

- Bộ Hemisphaeriales

Các họ : Microthyriaceae ; Trichopeltinaceae ; Munkieaceae ; Asterinaceae ; Aulographaceae ; Brefeldiaceae ; Parmulariaceae ; Stephanothocaceae ; Schizothyriaceae ; Leptopeltidaceae ; Micropeltidaceae (Hemisphaeriaceae)

+ Lớp Laboulbeniomyces

- Bộ Laboulbeniales

Các họ : Ceratomycetaceae ; Laboulbeniaceae ; Peyritsiaceae ;

+ Lớp Discomycetes

- Bộ Medeolariales ;

Họ Medeolariaceae ;

- Bộ Cyttariales ;

Họ Cyttariaceae

- Bộ Tuberales

Các họ : Elaphomycetaceae ; Terfeziaceae ; Protomycetaceae ;

- Bộ Taphrinales

Họ Taphrinaceae

+ Lớp Plectomycetes (Fennel, 1973)

- Bộ Eurotiales

Các họ : Amorphanthaceae ; Gymnoascaceae ; Monascaceae ; Onygenaceae ; Pseudeurotiaceae ; Thermoascaceae ; Trichocomaceae ; Eurotiaceae ; Cephalothecaceae ;

+ Lớp Pyrenomycetes (Muller, 1973)

- Bộ Erysiphales

Họ Erysiphaceae

- Bộ Meliolales

Họ Meliolaceae

- Bộ Coronophorales

Họ Coronophoraceae

- Bộ Sphaeriales

- Bộ Ostropales

Ho Stictidaceae

- Bộ Helotiales

Các họ : Ascocorticiaceae ; Hemiphacidiaceae ; Geoglossaceae ; Sclerotiniaceae ;
Orbiliaceae ; Dermateaceae ; Hyaloscyphaceae ; Leotiaceae

* Ngành phụ : BASIDIOMYCOTINA (Ainsworth, 1966) (Bào tử hữu tính là bào tử đảm)

+ Lớp Teliomycetes

- Bô Uredinales

Các họ : Melampsoraceae ; Coleosporaceae ; Pucciniaceae

- Bộ Ustilaginales

Các họ : Ustilaginacea ; Yenciacea ; Tilletiaceae

+ Lớp Hymenomycetes (Talbot, 1968)

- Bộ Tremellales ; Tremellaceae ; Sirobasidiacea ; Hyaloriaceae

Bộ Auriculariales ; Auriculariaceae ; Phleogenaceae

- Bộ Septobasidiales

Họ Septobasidiaceae

- Bô Exobasidiales

Họ Exobasidiaceae

- Bộ Brachybasidiales

Họ Brachybasidiaceae

- Bộ Dacrymycetales

Họ Dacrymycetaceae

- Bộ Tulasnellales

Các họ : Tulasnellaceae ; Ceratobasidiaceae

- Bộ Aphyllophorales (Polyporales)

Các họ : Cantharellaceae ; Coniophoraceae ; Corticiaceae ; Gomphaceae ;
Punctulariaceae ; Stereaceae ; Thelephoraceae ; Schizophyllaceae ; Cyphellaceae ;
Clavariaceae ; Clavulinaceae ; Sparassidaceae ; Auriscalpiaceae ; Bankeraceae ;
Echinodontaceae ; Hericiaceae ; Hydneae ; Bondarzewiaceae ; Fistulinaceae ;
Ganodermataceae ; Hymenochaetaceae ; Polyporaceae ; Podoscyphaceae

- Bộ Agaricales

Các họ : Boletaceae ; Hygrophoraceae ; Tricholomataceae ; Entolomataceae ; Amanitaceae ; Pluteaceae ; Lepiotaceae ; Agaricaceae ; Bolbitiaceae ; Strophariaceae ; Coprinaceae ; Cortinariaceae ; Paxillaceae ; Gomphidiaceae ; Russulaceae

- Bộ Hyphomycetales (Monilliales)

Các họ : Graphiolaceae ; Hyphomycetaceae ; Dematiaceae

- Bộ Stilbellales

Ho Stilbellaceae (Stilbaceae)

- Bộ Tuberculariales

Ho Tuberculariaceae

+ Lớp Coelomycetes (Sutton, 1973)

Bộ Melaconiales

Họ Melaconiaceae

Bộ Sphaeropsidales

Các họ : Sphaeropsidaceae ; Nectrioidaceae (Zythiaceae) ; Leptostromataceae ;
Excipulaceae (Discellaceae)

+ Lớp Gasteromycetes (D. Dring, 1973)

- Bộ Podaxales

Họ Podaxaceae

- Bộ Phallales

Các họ : Clathraceae ; Phallaceae ; Hysterangiaceae ; Protophallaceae ; Gelopellidaceae ;
Claustulaceae

- Bộ Lycoperdales

Các họ : Arachniaceae ; Mesophelliaceae ; Geastraceae ; Lycoperdaceae ; Gautieriaceae

- Bộ Hymenogasterales

Các họ : Gastrsporiaceae ; Protogastraceae ; Hymenogastraceae

- Bộ Nidulariales

Các họ : Sphaerobolaceae ; Nidulariaceae

- Bộ Melanogastrales

Các họ : Melnogastraceae ; Torrendiaceae

- Bộ Sclerodermatales

Các họ : Astraceae ; Glisshrodermataceae ; Broomelaceae ; Sclerodermataceae

- Bộ Tulostomatales

Các họ : Calostomataceae ; Tulostomataceae

* Ngành phụ DEUTEROMYCOTINA

+ Lớp Blastomycetes (Ainsworth, 1971)

- Bộ Cryptococcales

Họ Cryptococcaceae (Pseudosaccharomycetaceae)

- Bộ Sporobolomycetales

Họ Sporobolomycetaceae (Nectaromycetaceae)

+ Lớp Hyphomycetes (Kendrick, 1973)

- Bộ Agonomycetales

Họ Agonomycetaceae

Gần đây (1998) bảo tàng giống chuẩn vi sinh vật CBS (Hà Lan) lại đưa ra một hệ thống phân loại khác đối với giới Nấm. Các nhóm Nấm chính được trình bày trong bảng sau đây :

GIỚI PHỤ	LỚP	CÁC BỘ TIÊU BIỂU
Chytridiomycota	Chytridiomycetes	Chytridiales, Spizellomycetales, Blastocladales, Monoblepharidales, Neocallimastigales
Zygomycota	Zygomycetes	Mucorales, Endogonales, Glomales, Entomophthorales, Kickxellales, Dimargaritales, Zoopagales
	Trichomycetes	Amoebidiales, Asellariales, Harpellales, Eccrinales
Ascomycota	Archiascomycetes	Taphrinales, Neolectales, Schizosaccharomycetales, Pneumocystidales
	Saccharomycetes	Saccharomycetales, Endomycetales, Dipodascales
	Ascomycetes	
	discomycetes	Leotiales, Pezizales, Rhytismatales
	major lichenized orders (các bộ chính thuộc Địa y)	Caliciales, Lecanorales, Ostropales, Peltigerales, Teloschistales
	plectomycetes	Eurotiales, Onygenales
	pyrenomycetes	Diaporthales, Hypocreales, Sordariales, Xylariales
	loculoascomycetes	Dothideales, Melanommatales, Pleosporales
	powdery mildews (nấm sương phấn dạng bột)	Erysiphales

Laboulbeniomycetes

Laboulbeniales

conidial ascomycetes (nấm túi có bào tử trần)
hyphomycetes
coelomycetes

Basidiomycota

Urediniomycetes

Platyglomeomycetidae

Cryptomycocolacales, Atractiellales,
Agaricostilbales, Platygloeales,
Sporidiales, Heterogastridiales,
Cryptobasidiales

Urediniomycetidae

Uredinales, Septobasidiales

Ustilaginomycetes

Ustilaginales, Tilletiales,
Exobasidiales, Graphiolales

Hymenomycetes

Tremellomycetidae

Tremellales, Filobasidiales

Dacrymycetidae

Dacrymycetales

Auriculariomycetidae

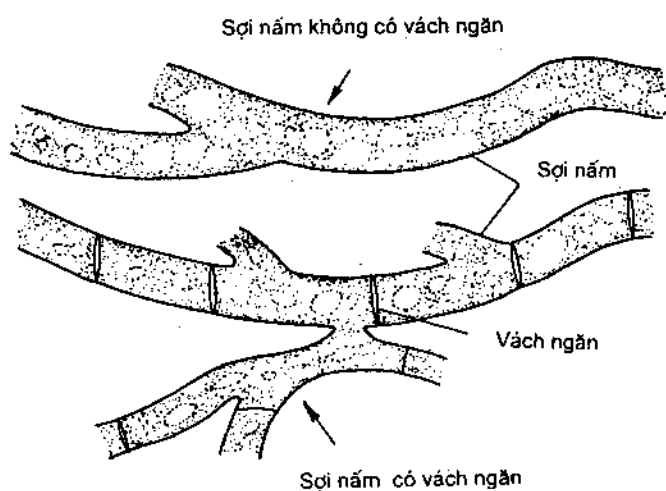
Auriculariales

Hymenomycetidae

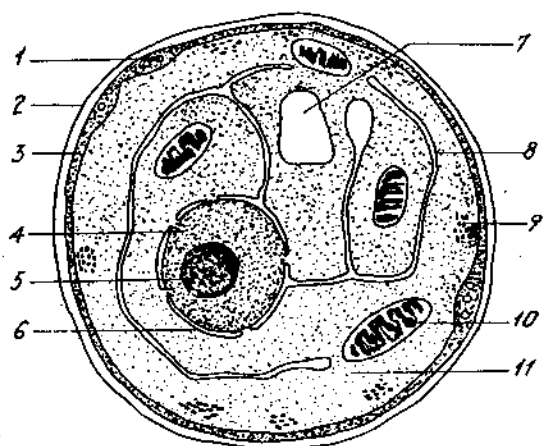
- Tulasnellales, Ceratobasidiales,
Thelephorales, Cantharellales,
Poriales
- Boletales, Agaricales, Russulales
- Hymenogastrales, Lycoperdales,
Melanogastrales, Sclerodermatales,
Tulostomatales, Nidulariales,
Phallales

Conidial basidiomycetes (nấm đảm có bào tử trần)

119.118

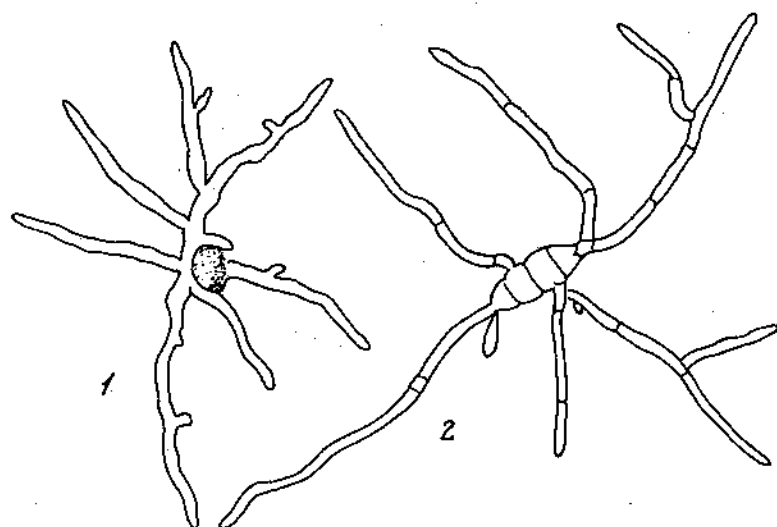


Khuẩn ti của nấm



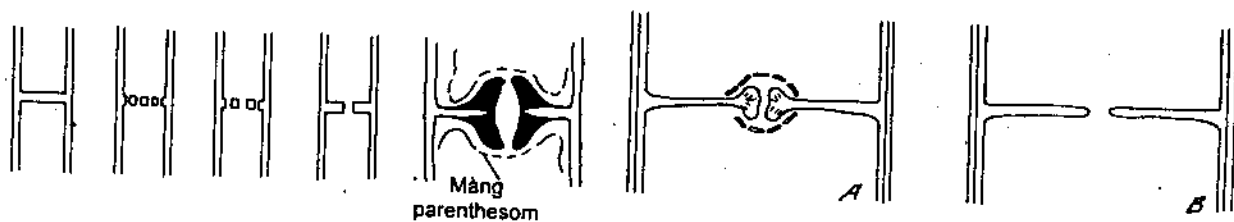
Cấu trúc của tế bào nấm

- 1 - Thê biên
- 2 - Thành tế bào
- 3 - Màng tế bào chất
- 4 - Nhân tế bào
- 5 - Hạt nhân
- 6 - Màng nhân
- 7 - Không bào
- 8 - Mạng lưới nội chất
- 9 - Hạt dự trữ
- 10 - Ti thể
- 11 - Tế bào chất

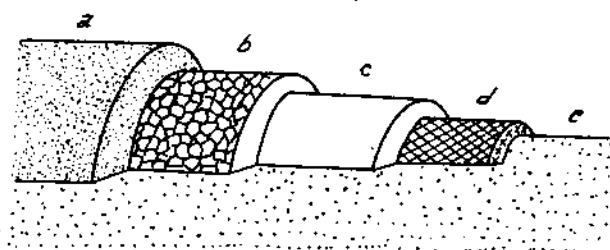


Sự nảy mầm bào tử để tạo ra hệ sợi nấm

- 1 - Ổ nấm *Coprinus sterquilinus*
- 2 - Ổ nấm *Lachnellula willkommii*

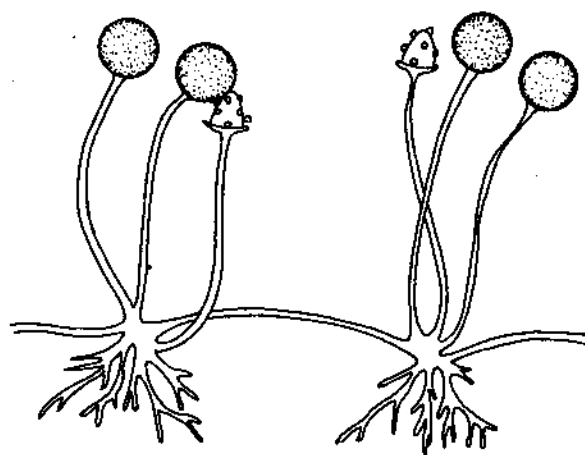


Các dạng vách ngăn ở vi nấm

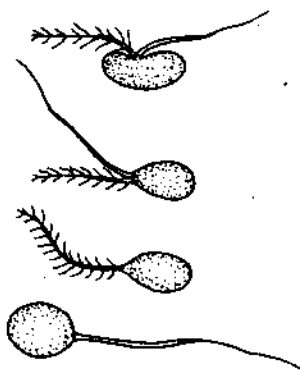
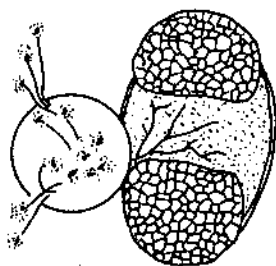


Cấu trúc của thành tế bào ở vi nấm

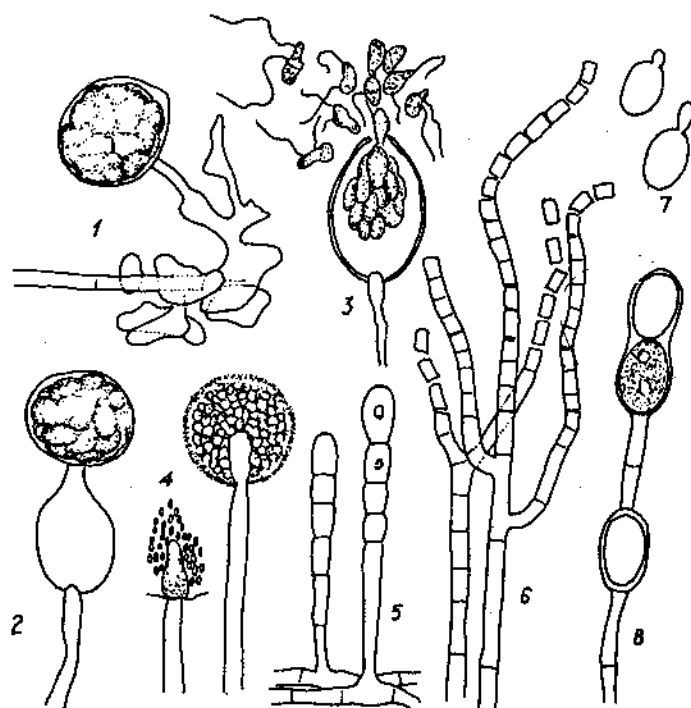
- a - Tầng glucan vô định hình
- b - Mạng gluco-protein
- c - Tầng protein
- d - Sợi nhỏ kitin
- e - Màng tế bào chất



Màng bào tử túi và bào tử túi ở nấm *Rhizopus*

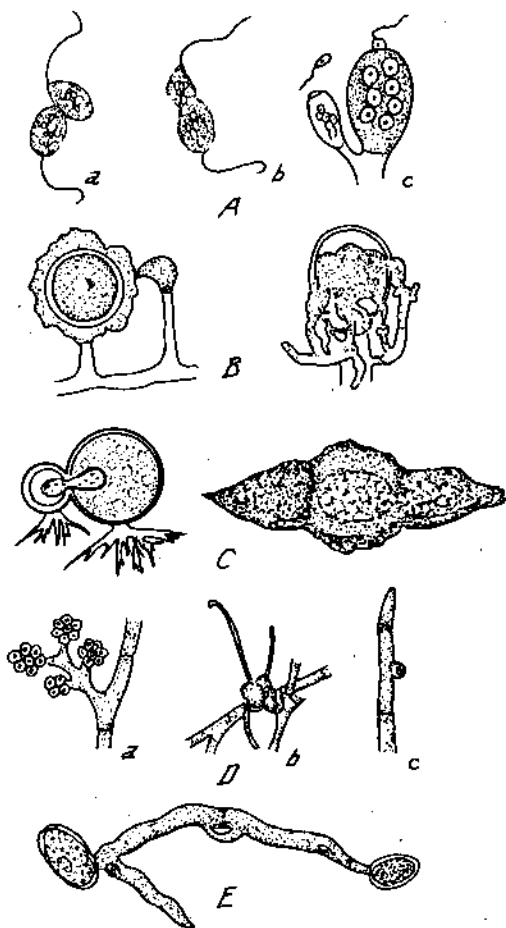


Sự hình thành động bào tử và các kiểu động bào tử

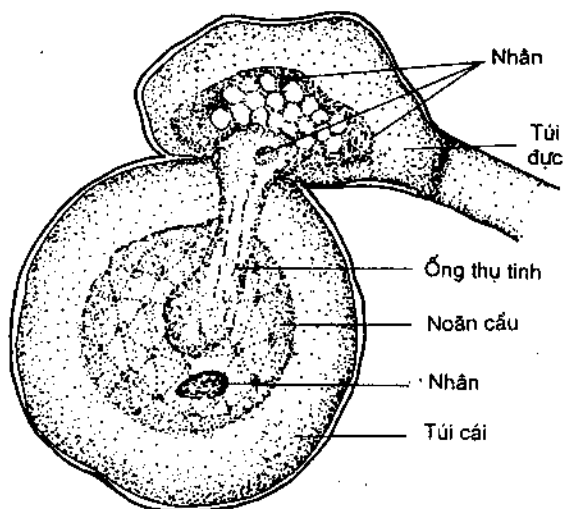


Các kiểu bào tử vô tính ở nấm

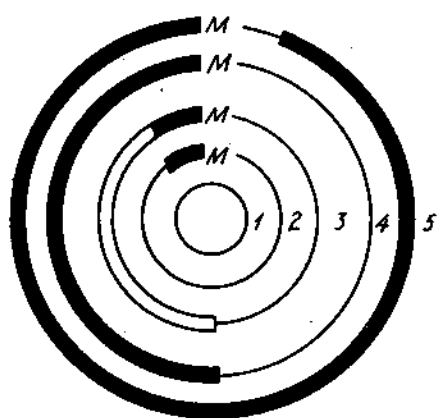
- 1 - Bào nang ở nấm *Pythium aphanidermatum*
- 2 - Bào nang ở nấm *Pythium nagaii*
- 3 - Nang động bào tử và các động bào tử ở nấm *Phytophthora citrophthora*
- 4 - Bào nang (nang bào tử kín) và bào tử kín ở *Mucor*
- 5, 6 - Bào tử phần (oidium) ở *Oidium sp.* (5) và ở *Candida albicans* (6)
- 7 - Bào tử chồi ở nấm men
- 8 - Bào tử áo (bào tử màng dầy)



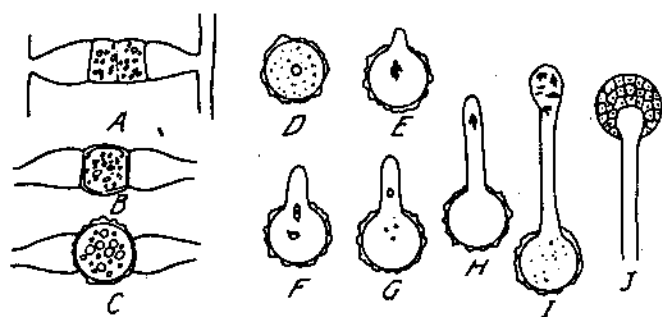
- Các kiểu tiếp hợp hữu tính ở nấm
- A - Tiếp hợp bởi các giao tử động
 a - Đồng hình
 b - Dị hình
 c - Giao tử đực xâm nhập túi cái để thụ tinh
- B - Tiếp hợp ở Nấm noãn
- C - Tiếp hợp ở túi giao tử (giao tử nang)
- D - Tiếp hợp của tinh tử
 a - Tinh tử
 b - Thể sinh nang và sợi thụ tinh
 c - Tinh tử bám vào sợi thụ tinh
- E - Tiếp hợp của 2 bào tử nảy mầm.



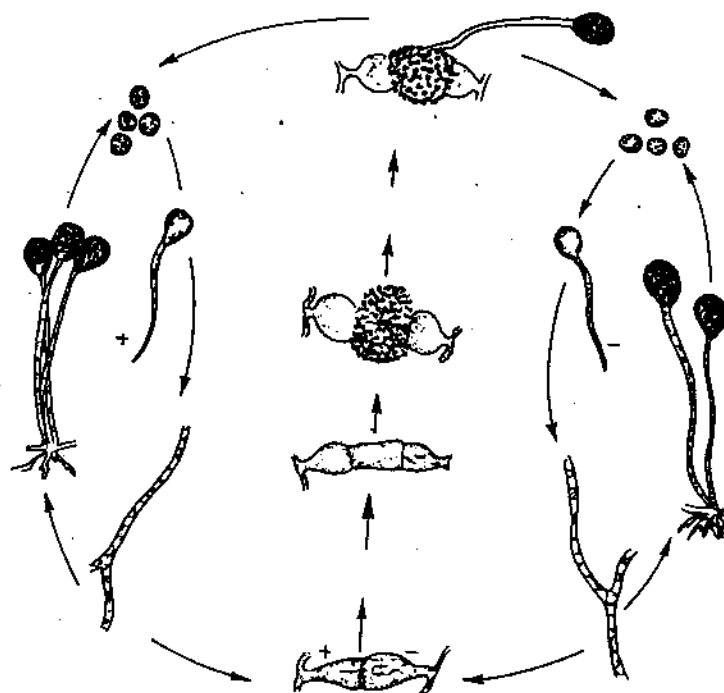
Sự hình thành bào tử noãn ở nấm noãn



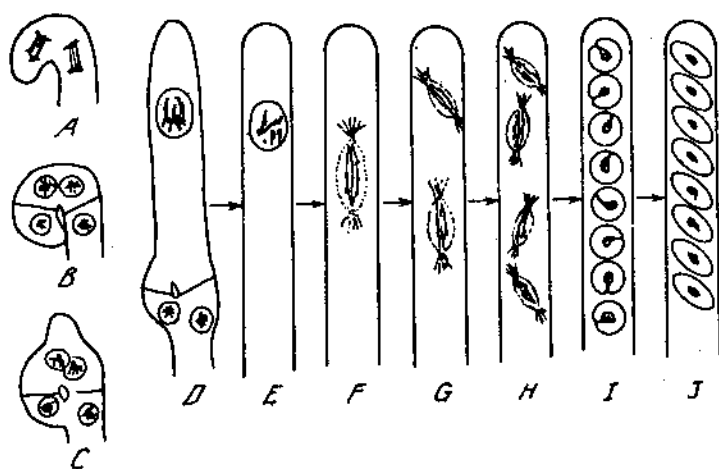
- 5 loại chu kì sống của nấm
- 5 - Chu trình lưỡng bội
 - 4 - Chu trình hai thể hệ
 - 3 - Chu trình đơn bội
 - 2 - Chu trình đơn bội - song nhân
 - 1 - Chu trình vô tính



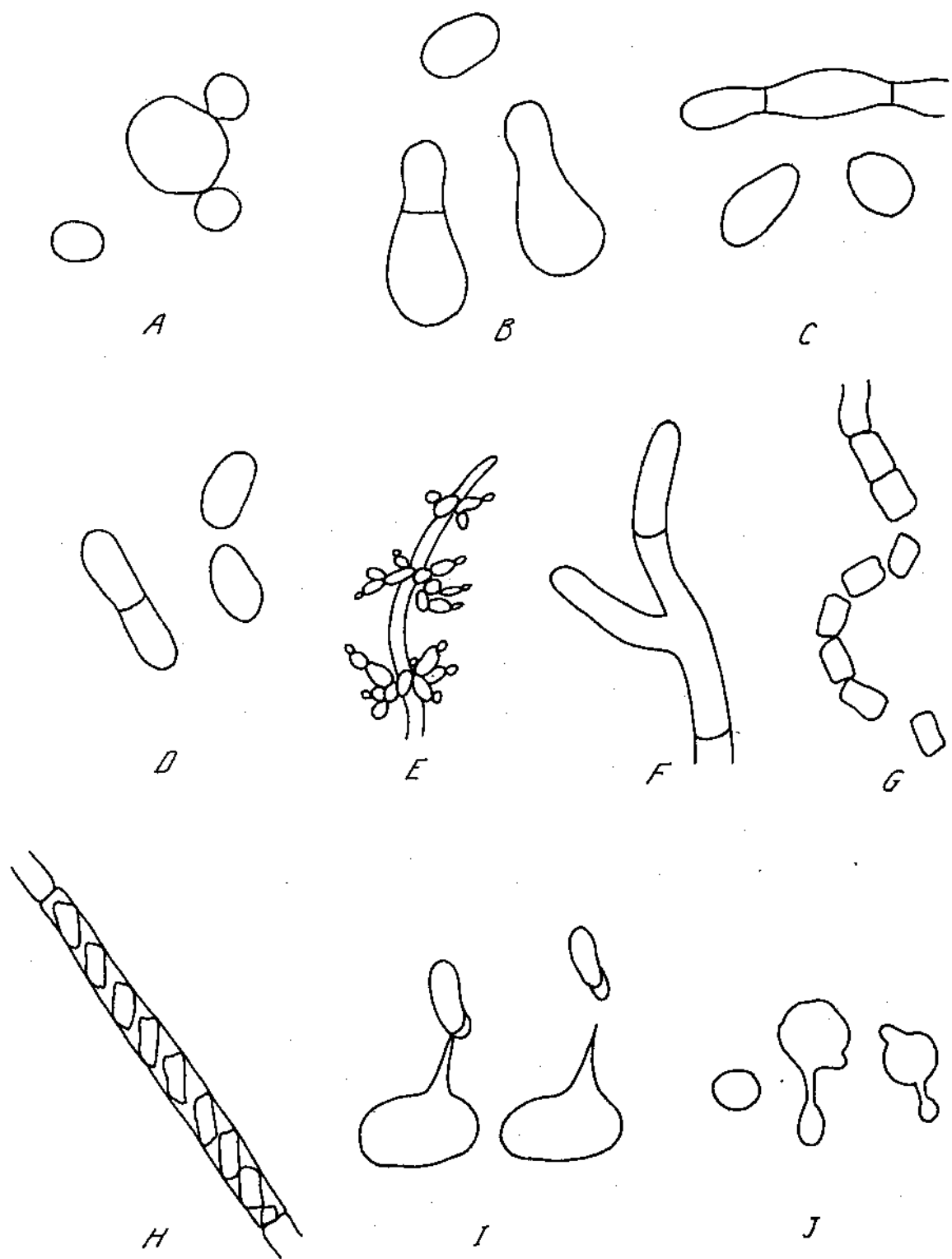
Sự tạo thành bào tử tiếp hợp và bào tử kín ở nấm *Rhizopus* (từ A đến J)



Sự hình thành bào tử tiếp hợp vào bào tử kín

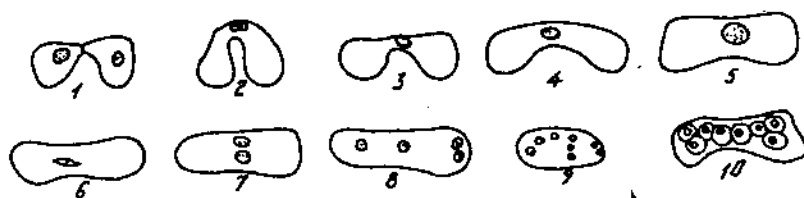


Quá trình hình thành bào tử túi (từ A đến J)

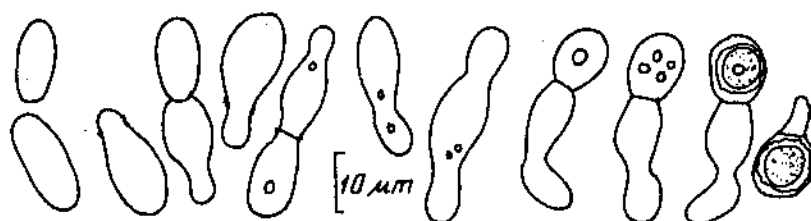


Các kiểu nảy chồi và các hình dạng của tế bào, bào tử ở nấm men
 A. Nảy chồi nhiều cực ; B. Nảy chồi đơn cực ; C. Nảy chồi lưỡng cực ; D. Phân cắt ;
 E. Khuẩn tì già ; F. Khuẩn tì ; G. Bào tử đốt ; H. Nội bào tử ; I. Bào tử bắn ; J. Bào tử trần

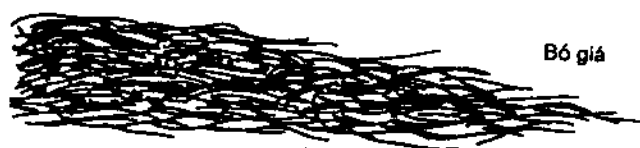
190.190



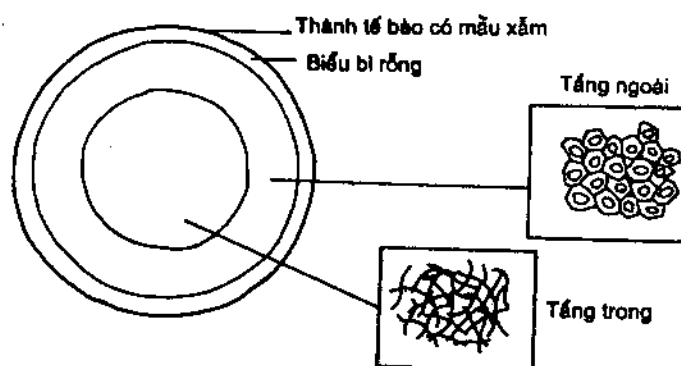
Sự hình thành bào tử túi ở *Saccharomyces octosporus*



Sự nảy chồi và hình thành bào tử túi ở *Nadsonia elongata*

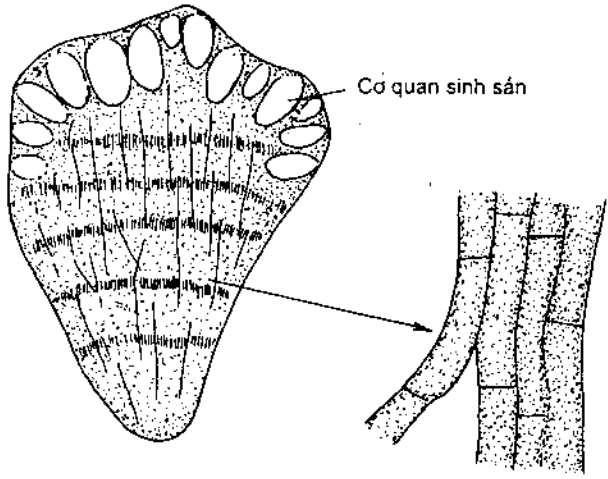


Các dạng biến đổi của hệ sợi nấm

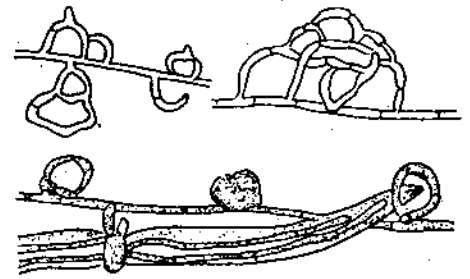
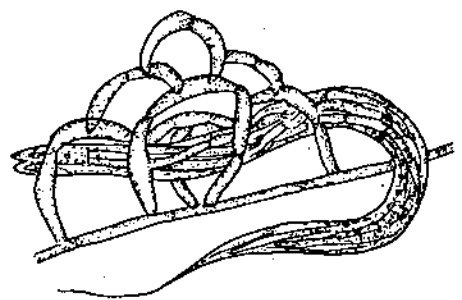
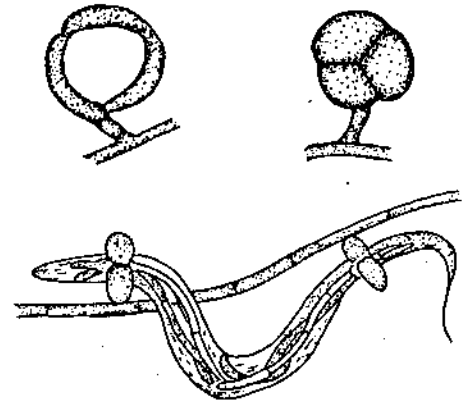


Hạch nấm

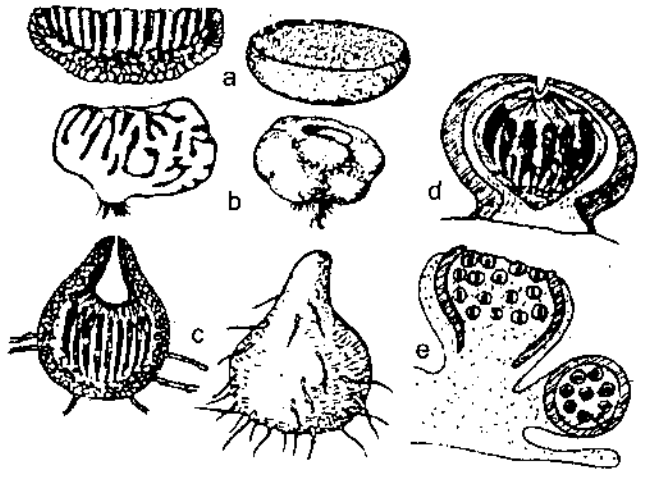
11.0
198.14



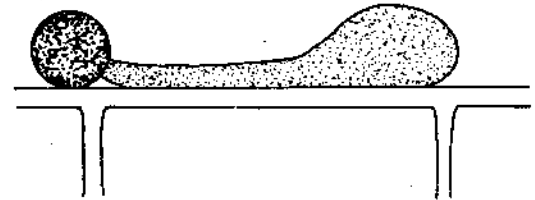
Thẻ dẹt



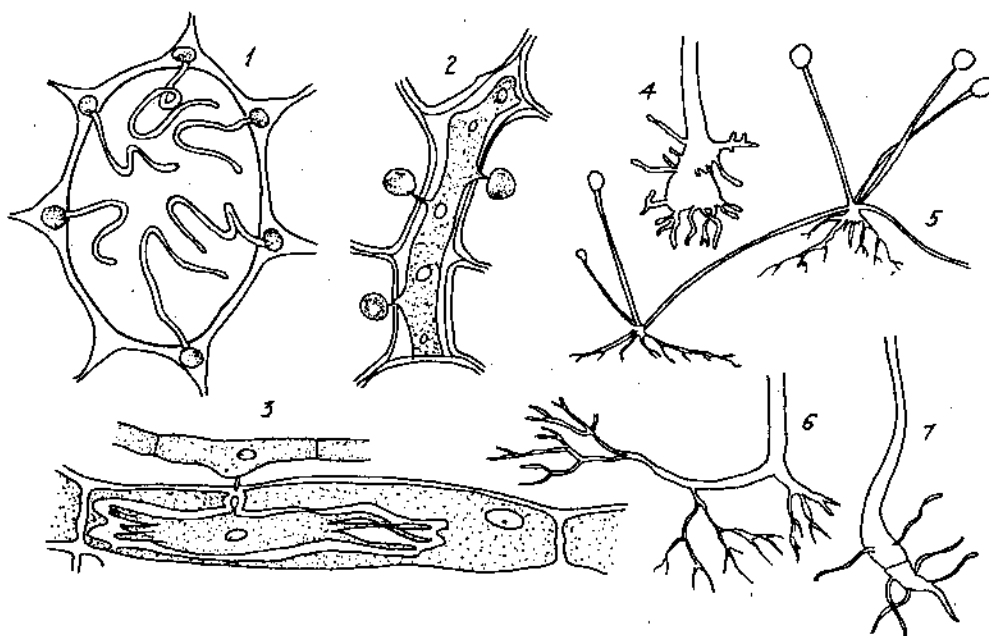
Các dạng sợi nấm bấy mới



- Các loại thể quả ở nấm rúi
- a : quả thể hình đĩa ở nấm Pezizales, Helotiales
 - b : quả thể ở nấm thuộc họ Tuberaceae
 - c : quả thể hình chai.
 - d và e : quả thể ở nấm Dothideales



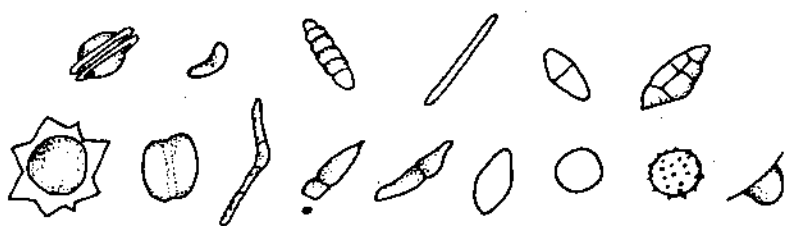
Sợi áp



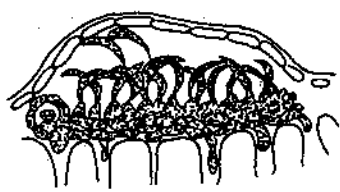
Các dạng sợi hút và rễ già

1 - 3 : Sợi hút

4 - 7 : Rễ già



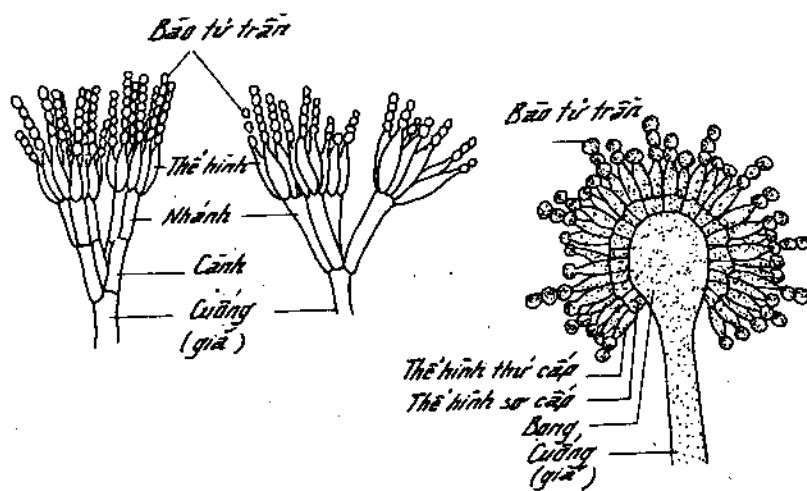
Các loại bào tử túi



Dĩa giá



Cụm giá



Các loại bào tử trần

CHƯƠNG IV

VIRUT

1. LỊCH SỬ PHÁT HIỆN VÀ ĐỊNH NGHĨA VIRUT

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

Năm 1886 một người Đức là A.Mayer lần đầu tiên phát hiện thấy bệnh khảm ở lá cây thuốc lá và chứng minh đó là một bệnh truyền nhiễm. Năm 1892 nhà sinh lí học thực vật trẻ tuổi D.I. Ivanovskii, người Nga, bắt tay vào việc nghiên cứu mầm bệnh khảm ở thuốc lá. Ông chứng minh được rằng mầm bệnh này nhỏ hơn vi khuẩn vì có thể chui qua các nén lọc vi khuẩn bằng sứ. Ông cho rằng đó là "độc tố vi khuẩn" hoặc "vi khuẩn cực tiểu". Năm 1898 nhà vi sinh vật học Hà Lan M.W Beijerinck (1851 - 1931) cũng nghiên cứu một cách độc lập mầm bệnh của bệnh khảm thuốc lá và ông cho rằng đó là một "chất dịch có hoạt tính truyền nhiễm", ông dùng tiếng La Tinh là Virus (mầm độc) để gọi mầm bệnh này. Thuật ngữ Virus có từ bấy giờ. Năm 1898 F.Loeffler và P.Frosch phát hiện ra virus gây bệnh lở mồm long móng ở bò. Nhiều nhà khoa học khác tiếp tục phát hiện ra các virus qua lọc (filtrable virus) khác gây ra bệnh sốt vàng (1902), bệnh dại, bệnh u Rous ở gà (1908), bệnh u ở niêm dịch thỏ, bệnh X ở khoai tây... Cũng cần nhắc lại ngay từ năm 1884 Louis Pasteur đã chứng minh mầm gây bệnh dại có thể lây truyền và có thể nuôi cấy bằng cách tiêm truyền qua động vật thực nghiệm.

Năm 1915 nhà khoa học Anh F.W.Twort (1877 - 1950) và năm 1917 nhà khoa học Pháp F.H.d'Herelle (1873 - 1949) phát hiện ra virus của vi khuẩn lỵ. F.H.d' Herelle đã đặt tên cho loại virus này là Bacteriophage (từ gốc La Tinh Bacteria là vi khuẩn còn phagein là ăn). Ta dịch là thể thực khuẩn. Sau này người ta thường gọi tắt là phago (phage).

Năm 1935 nhà hóa học Mĩ W.M Stanley lần đầu tiên tách biệt và kết tinh được virus khảm thuốc lá (TMV = tobacco mosaic virus). Đây là một bước đột phá quan trọng trên bước đường nghiên cứu virus. Tiếp đó Bawden và cộng sự chứng minh bản chất hóa học của TMV không phải là protein mà là nucleoprotein. Năm 1940 lần đầu tiên nhà khoa học Đức Kausche và cộng sự chụp được hình dạng TMV dưới kính hiển vi điện tử. Nhờ có kính hiển vi điện tử mà virus học bắt đầu có bước phát triển nhanh chóng.

Năm 1952 A.D. Hershey (người Mĩ, giải Nobel 1969) và M Chase dùng chất đồng vị phóng xạ để chứng minh vật chất di truyền ở thể thực khuẩn là ADN, mở đầu cho giai đoạn nghiên cứu sinh học phân tử ở virus. Năm 1955 H.L. Fraenkel-Conrat

- Virut có kết cấu đại phân tử vô bào, không có hệ thống sinh năng lượng, không có riboxom, không có hiện tượng sinh trưởng cá thể, không phân cắt thành hai phần đều nhau, không mẫn cảm với các chất kháng sinh nói chung.

- Có sự giao thế tương hỗ giữa trạng thái sinh vật kí sinh trong tế bào sống chuyên biệt và trạng thái không phải sinh vật sống ở bên ngoài tế bào.

- Mỗi loại virut chỉ chứa một loại axit nucleic, hoặc là ADN hoặc là ARN.

Các sinh vật vô bào ngoài virut còn có 3 loại khác bao gồm :

- Viroit : chỉ chứa thành phần ARN có tính truyền nhiễm đơn độc.

- Virusoit : chỉ chứa thành phần ARN không có tính truyền nhiễm đơn độc.

- Virino : chỉ chứa thành phần protein (vấn đề còn đang được thảo luận).

Giáo sư Chu Đức Khánh (Đại học Phúc Đán, Trung Quốc) định nghĩa virut như sau :

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

Người ta đã phát hiện được 1671 loài virut côn trùng (1990), 931 loài virut động vật có xương sống (1981), 300 loài virut người (1984), 600 loài virut thực vật (1983), 100 loài virut nấm, trên 2850 loài và chủng thể thực khuẩn (1987).

Các virut kí sinh trên người hoặc trên các loài động vật, thực vật, vi sinh vật có ích đối với người là các virut có hại. Ngược lại cũng có một số virut có ích, đó là các virut kí sinh trên các côn trùng và các động vật khác có hại, cỏ dại và các thực vật khác có hại, các vi sinh vật gây bệnh cho người và các động vật chăn nuôi.

2. HÌNH THÁI VÀ CẤU TRÚC CỦA VIRUT

2.1. Kích thước của virut

Tuyệt đại đa số vi rút có kích thước rất nhỏ, có thể lọt qua các nển lọc vi khuẩn. Chính vì thế mà không thể quan sát thấy virut qua kính hiển vi quang học. Người ta thường đo kích thước virut bằng đơn vị nanômet (nm, $1\text{nm} = 10^{-9}\text{m}$). Với kính hiển vi điện tử và các kĩ thuật phụ trợ, ngày nay ta có thể đo đạc, quan sát tỉ mỉ hình thái từng loại vi rút.

Dưới đây là kích thước của một số loại virut tiêu biểu :

	Tên khoa học họ virut	Kích thước (nm)
* Virut ARN :	- Piconaviridae	20 - 30
	- Caliciviridae	35 - 40
	- Togaviridae	40 - 90
	- Coronaviridae	80 - 100
	- Retroviridae	100 - 120
	- Reoviridae	60 - 80

- Bunyaviridae	80 - 120
- Orthomyxoviridae	80 - 120
- Arenaviridae	110 - 130
- Rhabdoviridae	60 - 180
- Paramyxoviridae	150 - 300

* Virut ADN :

- Parvoviridae	18 - 26
- Hepadnaviridae	42
- Papovaviridae	45 - 55
- Aenoviridae	70 - 90
- Herpesviridae	150 - 200
- Iridoviridae	130
- Poxviridae	130 - 300

Virut của vi khuẩn hay thể thực khuẩn có cấu trúc hình nòng nọc hay hình tinh trùng gồm 2 phần : phần đầu và phần đuôi. Dưới đây là kích thước của một số thể thực khuẩn của vi khuẩn *E. coli* :

Kí hiệu thể thực khuẩn	Kích thước (nm)	
	Đầu	Đuôi
T_1	50	10 × 150
T_2, T_4, T_6	65 × 95	25 × 110
T_3, T_7	47	10 × 15
X, $\phi 80$	65	10 × 170
P_1	54	10 × 140
P_2	65	12 × 150
$\phi X174, S13$	50	10 × 150
$f_2, MS2$	30	không có
f_1, fd	24	không có
χ (thể thực khuẩn của Salmonella)	không có	6 × 800
	67,5	12,5 × 230

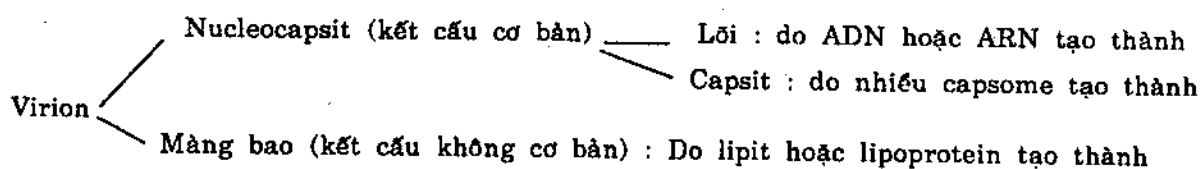
2.2. Hình thái của virut

Virut chưa có cấu tạo tế bào, mỗi virut không thể gọi là một tế bào mà được gọi là một hạt virut hay virion (virion, virus particle). Đó là một virut thành thực, có kết cấu hoàn chỉnh. Thành phần chủ yếu của hạt virut là axit nucleic (ADN hay ARN) được bao quanh bởi một vỏ protein.

Axit nucleic nằm ở giữa hạt virut tạo thành lõi hay hệ gen của virut. Protein bọc bên ngoài lõi tạo thành một vỏ gọi là capsit. Capsit mang các thành phần kháng nguyên và có tác dụng bảo vệ lõi axit nucleic. Capsit cấu tạo bởi các đơn vị phụ gọi là hạt capsit hay capsome. Lõi và vỏ hợp lại tạo thành một nucleocapsit, đó là kết cấu cơ bản của mọi virut.

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

Tóm lại mỗi hạt virus có thể có cấu trúc như sau



Căn cứ vào các nghiên cứu dùng kĩ thuật nhiễu xạ tia X, dùng kính hiển vi điện tử ta thấy virion thường có cấu trúc đối xứng xoắn hoặc đối xứng 20 mặt hoặc đối xứng đẳng trục. Loại thứ ba là đối xứng phức hợp không giống hai loại đối xứng trên. Mỗi loại đối xứng lại phân thành loại có màng bao và loại không có màng bao.

Dưới đây là một số ví dụ :

A. Đối xứng xoắn

(a). Không có màng bao

1. Hình que : ví dụ virus khảm thuốc lá (TMV)
2. Hình sợi : ví dụ thể thực khuẩn f1, fd, M13 của vi khuẩn *E.coli*

(b). Có màng bao :

3. Dạng uốn khúc : ví dụ virus cúm (họ Orthomyxoviridae)
4. Dạng dẹt : ví dụ virus dại (họ Rhabdoviridae)

B. Đối xứng 20 mặt (đẳng trục)

(a). Không có màng bao

5. Dạng nhỏ : ví dụ virus viêm tủy xám (họ Picornaviridae)
6. Dạng lớn : ví dụ virus mụn cơm (họ Papovaviridae)

(b). Có màng bao :

7. Ví dụ virus sởi (họ Togaviridae)

C. Đối xứng phức hợp

(a). Không có màng bao :

8. Ví dụ thể thực khuẩn T của vi khuẩn *E.coli*

(b). Có màng bao :

9. Ví dụ virus đậu mùa (họ Poxviridae)

2.3. Hình thái quần thể của virus

Lúc tế bào nhiễm virus dưới kính hiển vi quang học vẫn có thể thấy một đám lớn các hạt virus tập hợp lại với nhau tạo ra các thể bao hàm có thể thấy thể bao hàm ở các tế bào thực vật lẫn tế bào động vật. Các vết làm tan vi khuẩn trên bản thạch đĩa gọi là vết thực khuẩn mắt thường cũng thấy được. Đó cũng là một tập hợp rất lớn các virus.

Thế bao hàm có hình thái và kích thước không giống nhau. Đa số nằm trong tế bào chất của vật chủ nhưng cũng có một số ít nằm trong nhân tế bào. Loại trên có tính ưa axit, loại dưới có tính ưa kiềm. Có lúc thế bao hàm vừa tồn tại trong tế bào chất vừa tồn tại trong nhân.

Căn cứ vào đặc điểm của các thế bao hàm người ta chia chúng ra thành 4 loại sau đây :

- Thế tụ tập virus : ví dụ thế bao hàm protein sinh ra trong tế bào côn trùng của virus NPV (nuclea polyhedrosis virus) hay của virus CPV (cytoplasmic polyhedrosis virus). Loại thế bao hàm này còn gọi là thể đa giác (polyhedron), bên trong có chứa một lượng lớn virion. Loại thế tụ tập virus này còn gặp ở một số cơ thể động vật nhiễm virus adeno (Adenoviridae), virus đường hô hấp - tiêu hóa (Reovirus) cũng gặp ở cả các cây nhiễm virus TMV.

- Thế bao hàm ở phần lớn virus động vật là bộ phận do virus tổng hợp nên.

- Thế bao hàm do nhiều virus thực vật tạo ra là protein của virus và các protein có liên quan đến sự cảm nhiễm virus.

- Thế bao hàm không phải là quần thể virus mà là do một số nhân tố hóa học sinh ra khi có sự cảm nhiễm virus.

Căn cứ vào hình thái, cấu tạo đặc tính của virus người ta có thể có thêm căn cứ để xác định, chẩn đoán virus. Ví dụ virus đậu mùa tạo ra thể bao hàm Guarnieri trong tế bào chất, virus đại tạo ra thể bao hàm Negri trong tế bào chất, virus Herpes tạo ra thể bao hàm Cowdry A trong nhân...

Không phải mọi virus đều sinh ra thể bao hàm, có nhân tố không phải virus cũng sinh ra được thể bao hàm, vì vậy đặc điểm về thể bao hàm chỉ là chỉ tiêu bổ trợ khi xác định virus.

Vì virus NPV và CPV có thể tạo ra những thể bao hàm chứa một lượng lớn virus có hoạt tính trong cơ thể côn trùng kí chủ cho nên có thể dùng các thể bao hàm này để sản xuất thuốc trừ sâu sinh học.

Khi đưa một ít thể thực khuẩn trộn với một số lượng lớn vi khuẩn (hoặc xạ khuẩn) tương ứng rồi hỗn dịch này cho vào môi trường thạch đã đun chảy và giữ ở 45°C, sau đó đổ vào đĩa Petri. Sau từ vài giờ đến 10 giờ trên mặt thạch sẽ thấy vết mọc của vi khuẩn nhưng cũng có những vết tròn trong suốt không có vi khuẩn mọc. Đó là các vết thực khuẩn (plaque). Lúc 1 thể thực khuẩn xâm nhiễm vào 1 tế bào vật chủ mất cảm, chẳng bao lâu chúng sẽ làm giải phóng ra một đám thể thực khuẩn mới, chúng lại xâm nhập tiếp vào các tế bào vật chủ và lại làm phá vỡ các tế bào này. Cứ lặp lại như vậy mà từ một thể thực khuẩn ban đầu đã tạo ra một vết thực khuẩn chứa rất nhiều thể thực khuẩn. Có thể coi đây là dạng "khuẩn lạc âm" của thể thực khuẩn và có thể dùng để đếm số lượng, để phân lập, thuần hóa...

Với các virus động vật và virus người, Dulbecco và Vogt (1943) đã tìm ra phương pháp phủ 1 tầng thạch mỏng lên trên 1 phiến tế bào đơn tầng. Do virus nếu cảm nhiễm vào 1 tế bào sẽ phát triển và khuếch tán ra các tế bào xung quanh, kết quả là sẽ tạo ra những vết trống. Nếu nhuộm bằng đỏ trung tính (Neutral Red) sẽ không những phân biệt được tế bào sống, tế bào chết mà còn làm rõ được các vết trống. Nếu tế bào đơn tầng cảm nhiễm virus ung thư sẽ thấy rõ các vết nổi lên như khuẩn lạc (do sự tăng trưởng nhanh của tế bào). Với các virus thực vật người ta còn có thể kiểm tra và phân lập virus dựa vào các vết khô trên lá cây nhiễm virus.

2.4. Cấu trúc của 3 dạng hình thái virus điển hình

2.4.1. Cấu trúc đối xứng xoắn

Lấy virus khảm thuốc lá (TMV) làm ví dụ. Loại virus này được phát hiện sớm và nghiên cứu sâu hơn cả.

TMV có hình que thẳng, dài 300nm, rộng 15nm, lõi rộng 4nm. TMV chứa 95% protein và 5% chuỗi ARN đơn (ss RNA). Capsit chứa 2130 capsome hình chiếc giấy. Mỗi capsome cấu tạo bởi 158 gốc axit amin, khối lượng phân tử là 17500. Các capsome bám vào sợi ARN xoắn tròn ốc. Có cả thảy 130 vòng xoắn. Mỗi vòng xoắn dài 2,3nm, trên đó có trung bình 16,33 capsome. Sợi ss ARN có chứa 6390 đơn vị nucleotit, khối lượng phân tử là 2×10^6 . Cứ 3 nucleotit thì kết hợp với 1 protein, mỗi vòng có 49 nucleotit.

Vì TMV có vỏ protein bao quanh sợi ARN xoắn ốc cho nên có kết cấu hết sức ổn định. Có tác giả cho biết, bảo quản ở nhiệt độ thường trong 50 năm TMV vẫn có thể giữ được năng lực cảm nhiễm.

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

2.4.2. Đối xứng 20 mặt

Lấy Adenovirus làm ví dụ. Đó là loại virus gây bệnh cho người và động vật được phân lập từ năm 1953. Chúng xâm nhiễm vào đường hô hấp, kết mạc của mắt, các tổ chức limphô. Chúng gây nên nhiều bệnh ở người như viêm họng cấp, viêm kết mạc mắt, viêm kết-giác mạc dịch, viêm khí - phế quản có sốt, bệnh phế quản - phổi, viêm hạch mạc treo... Từ thập kỉ 80 người ta đã biết tới 80 loài adenovirus. Vật chủ tự nhiên có thể là người, khỉ, trâu, bò, chó, chuột, chim và cả ếch nhái nữa.

Adenovirus có cấu trúc 20 mặt, thoáng trông gần giống hình cầu, không có màng bao, đường kính khoảng 70 - 80nm. Chúng có tất cả 12 góc, 20 mặt, 30 cạnh. Capsit cấu tạo bởi 252 capsome, trong đó có 12 thể ngũ lân có khối lượng phân tử 70.000, phân bố ở 12 góc và 240 thể lục lân có khối lượng phân tử 120.000, phân bố đều ở trên 20 mặt. Thể ngũ lân cấu tạo bởi 5 monomer protein, còn có thể lục lân cấu tạo bởi 6 protomer. Ở mỗi thể ngũ lân có một sợi protein mọc thẳng ra đầu có hình dạng như hình đinh ghim, những sợi này được gọi là sợi ADN xoắn kép (ds ADN). Tất cả mọi adenovirus bất kể thuộc kí chủ nào hoặc có tip huyết thanh ra sao đều có 36.500 đôi nucleotit.

Chỉ nuôi cấy được adenovirus trên các tổ chức tế bào người (dương mạc, tế bào Hela, tế bào HEp...), thích hợp nhất là nuôi cấy trên tế bào tổ chức thận, không phát triển được trên phôi gà. Vì adenovirus phát triển và lắp bên trong nhân tế bào vật chủ cho nên có thể làm cho tế bào vật chủ tạo ra các thể bao hàm.

2.4.3. Cấu trúc đối xứng phức hợp

Lấy thể thực khuẩn T số chẵn của vi khuẩn *E.coli* để làm ví dụ. Loại này gồm có T_2 , T_4 và T_6 , phân bố rất rộng rãi trong tự nhiên. Đây là mô hình rất tốt để nghiên cứu về virus học và về sinh học phân tử và vì vậy đã được nghiên cứu rất sâu sắc, nhất là đối với thể thực khuẩn T_4 .

Thể thực khuẩn T_4 cấu tạo bởi 3 bộ phận: đầu, cổ và đuôi. Đầu có cấu trúc đối xứng 20 mặt còn đuôi lại có đối xứng xoắn. Chính vì vậy mà người ta gọi là đối xứng phức hợp. Đầu dài 95nm, rộng 65nm, dưới kính hiển vi điện tử có thể thấy rõ

20 mặt. Capsit cấu tạo bởi 8 loại protein, lượng chứa protein chiếm tới 76 - 81% trong thể thực khuẩn. Mỗi capsome có đường kính là 8nm. Có cả thấy 212 capsome. Bên trong đầu có sợi ds ADN. Đầu nối với đuôi qua cổ. Đó là một đĩa hình lục giác tạo thành, đường kính 37,5nm, có 6 tua cổ (cánh tu) mọc ra từ cổ. Đuôi gồm có bao đuôi, ống đuôi, đĩa gốc, 6 mẫu ghim và 6 sợi đuôi. Bao đuôi dài 95nm, có 24 vòng xoắn cấu tạo bởi 144 capsome (mỗi capsome có khối lượng phân tử là 55.000) cấu tạo nên. Ống đuôi dài 95nm, đường kính 8nm, ở giữa có lỗ thùng đường kính 2,5 - 3,5nm. Đây là con đường để dẫn ADN trong đầu của thể thực khuẩn xâm nhiễm vào tế bào vật chủ. Ống đuôi cũng cấu tạo bởi 24 vòng xoắn, tương ứng với 24 vòng xoắn trên bao đuôi. Đĩa gốc cũng tương tự như đĩa cổ, đó là một đĩa hình lục giác, rỗng ở giữa. Đường kính đĩa gốc là 30,5nm, trên đó mọc ra 6 sợi đuôi và 6 mẫu ghim. Mẫu ghim dài 20nm có chức năng hấp phụ. Sợi đuôi dài 140nm có thể gấp lại ở chính giữa, đường kính 2nm. Sợi đuôi cấu tạo bởi 2 loại phân tử protein khá lớn và 4 loại phân tử protein khá nhỏ. Nó có tác dụng hấp phụ chuyên hóa và vùng miễn dịch của bề mặt tế bào vật chủ.

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

2.5. Axit nucleic của virut

Axit nucleic là cơ sở lưu giữ, tái tạo mọi thông tin di truyền, vì vậy là thành phần quan trọng của mọi virut. Virut có nhiều loại hình axit nucleic và là cơ sở phân tử đáng tin cậy để phân loại virut. Các loại hình axit nucleic của virut được phân biệt dựa trên mấy điểm chủ yếu sau đây :

- Là ADN hay ARN ?
- Là chuỗi đơn (ss, single strand) hay chuỗi kép (ds, double strand) ?
- Là dạng sợi hay dạng vòng ?
- Là dạng vòng kín hay vòng hở ?
- Hệ gen là một thành phần, hai thành phần, ba thành phần hay nhiều thành phần ?

Dưới đây là một số ví dụ :

A. ADN

(a). Chuỗi đơn : (ss ADN)

+ Dạng sợi : họ Parvoviridae (gây bệnh ban đào ở trẻ em...), các virut song sinh gây bệnh ở ngô, sắn...

+ Dạng vòng : Thể thực khuẩn ϕ X 174, M13, fd, f1 của *E.coli*

(b). Chuỗi kép (ds ADN) :

+ Dạng sợi : - Họ Adenoviridae (gây bệnh đường hô hấp)

- Họ Herpesviridae (gây bệnh mụn rộp hecpet ở người, gây bệnh đậu gà...)

- Họ Poxviridae (gây bệnh đậu mùa, bệnh đậu bò...).

- Thể thực khuẩn T, P₁, P₂, Mu của *E.coli*, thể thực khuẩn PBSX, SPO1 của *Bacillus subtilis*, thể thực khuẩn P22 của *Salmonella*...

8.178.115
+ Dạng vòng : Họ Papovaviridae (gây mụn cơm), virus SV40. Nhóm virus gây bệnh khảm ở lá cây hoa cúc, lá cải. Thể thực khuẩn λ của *E.coli*, thể thực khuẩn PM2 ở *Pseudomonas aeruginosa*...

B. ARN

(a). Chuỗi đơn (ss ARN), dạng sợi :

- Họ Picornaviridae (gây bệnh viêm tủy xám, viêm gan A do virus, bệnh do virus Cocksackie, bệnh đường hô hấp do Rhinovirus, bệnh lở mồm long móng ở trâu bò...).

- Họ Calciviridae

- Họ Togaviridae (gây bệnh sốt vàng, bệnh Dengue xuất huyết, bệnh rubcon...).

- Họ Bunyaviridae (gây bệnh sốt thung lũng Rift...).

- Họ Orthomyxoviridae (gây bệnh cúm).

- Họ Paramyxoviridae (gây bệnh sởi, quai bị, bệnh Newcastle - gà toi...).

- Họ Rhabdoviridae (gây bệnh dại).

- Họ Retroviridae (gây bệnh ung thư, bệnh AIDS, bệnh bạch cầu...).

- Họ Arenaviridae (gây bệnh sốt Lassa, bệnh viêm màng mạch - màng não limphô bào...).

- Họ Coronaviridae (gây bệnh viêm phế quản truyền nhiễm, gây viêm mũi do Coronavirus...).

- Virus TMV (gây bệnh khảm thuốc lá) virus Y, S (gây bệnh X ở khoai tây) virus gây bệnh khảm ở dưa chuột, virus gây bệnh lùn ở cà chua, virus gây bệnh vàng lụi khoai tây, virus khảm lá mướp tức...

- Các loại thể thực khuẩn chứa ARN như thể thực khuẩn MS2, A ϕ , f2, R17 của vi khuẩn *E.coli*...

(b). Chuỗi kép (ds ARN), dạng sợi :

- Họ Reoviridae : gây bệnh lã chảy ở trẻ em bú mẹ và nhiễm khuẩn hô hấp do Rotavirus, sốt do virus truyền qua ve Colorado, virus CPV gây bệnh cho côn trùng...

- Virus gây bệnh vàng lụi ở ngô, ở lúa...

- Các loại virus của nấm. Thể thực khuẩn ϕ 6 của *Pseudomonas*...

Nhìn chung ta thấy rằng các virus của người và động vật có dạng ADN kép dạng sợi và ARN đơn dạng sợi là chính, các virus thực vật có dạng ARN đơn là chính còn thể thực khuẩn có dạng ADN kép là chính.

3. CÁC PHƯƠNG THỨC SINH SẢN Ở VIRUT

Chúng ta lấy thể thực khuẩn để làm ví dụ chính khi xem xét các phương thức sinh sản của virus.

Thể thực khuẩn phân bố rất rộng rãi trong tự nhiên. Cho đến nay hầu như phần lớn các nhóm sinh vật nhân nguyên thủy đều có các thể thực khuẩn tương ứng. Theo Ackerman (1987) hiện nay đã có ít ra là 2850 loài hoặc chủng thể thực khuẩn đã được nghiên cứu bằng kính hiển vi điện tử, trong số này có tới 2700 loài hoặc chủng (94,74% là có đuôi). Bradley (1967) chia thể thực khuẩn ra thành 6 loại hình thái.

A. Hình nòng nọc :

- | | | |
|---------------------------------|---|---------------|
| (a). Đuôi co rút... Nhóm A | } | ADN chuỗi kép |
| (b). Đuôi không co rút | | |
| + Đuôi dài ... Nhóm B | | |
| + Đuôi ngắn ... Nhóm C | | |

B. Hình cầu (không đuôi) :

(a). Capsome đỉnh lớn ... Nhóm D → ADN chuỗi đơn

(b). Capsome đỉnh nhỏ ... Nhóm E → ARN chuỗi đơn

C. Hình sợi (không đầu) ... Nhóm F → ADN chuỗi đơn

Thuộc nhóm A có thể thực khuẩn T2, T4, T6 của *E.coli* ; 12S, PB - 1 của *Pseudomonas* ; SP - 50 của *Bacillus*, MX - 1 của *Myxococcus* 66t của *Salmonella*.

Thuộc nhóm B có thể thực khuẩn T1, χ của *E.coli*, PB - 2 của *Pseudomonas* ; B của *Corynebacterium* ; K1 của *Streptomyces*.

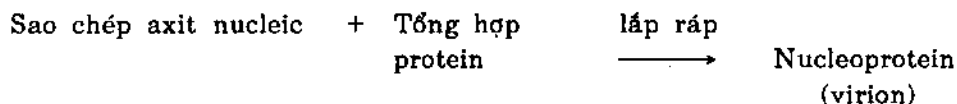
Thuộc nhóm C có thể thực khuẩn T3, T7 của *E.coli* ; 12B của *Pseudomonas* ; PR - 1001 của *Agrobacterium* ; GA/1 của *Bacillus* ; P22 của *Salmonella*.

Thuộc nhóm D có thể thực khuẩn ϕ X 174 của *E.coli* ; ϕ R của *Salmonella*.

Thuộc nhóm E có thể thực khuẩn f2, MS2, Q β của *E.coli* ; 7S, PP7 của *Pseudomonas* ; một số thể thực khuẩn của *Caulobacter*.

Thuộc nhóm F có thể thực khuẩn fd, f1, M13 của một số thể thực khuẩn của *Pseudomonas*.

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



Nói chung sự sinh sản của virút được chia thành 5 giai đoạn :

Hấp phụ → Xâm nhập → Sao chép → Thành thực → Phóng thích.

Có tác giả lại chia thành 6 giai đoạn : Hấp phụ → Xâm nhập → Cởi áo → Tổng hợp protein và axit nucleic → Lắp ráp → Phóng thích.

Lấy sự sinh sản của thực khuẩn thể T ở *E.coli* để làm ví dụ :

3.1. Sự hấp phụ

Trong dung dịch khi thể thực khuẩn ngẫu nhiên gặp tế bào vật chủ tương ứng có thể có sự tiếp xúc giữa mút của sợi đuôi với thụ thể đặc dị trên bề mặt tế bào. Có tác giả cho rằng đó là một quá trình hóa học hình thành giữa gốc - NH₂ trên sợi đuôi và gốc - COOH trên thụ thể. Có thể do chạm vào các tua cổ mà búi sợi đuôi được gỡ tung ra. Sau khi các sợi đuôi đã bám trên thụ thể, các mấu ghim và đĩa gốc sẽ áp sát bề mặt tế bào. Người ta nhận thấy trên bề mặt mỗi vi khuẩn có khoảng 300 điểm hấp phụ. Các thể thực khuẩn khác nhau có các vị trí khác nhau về điểm hấp phụ. Ví dụ thể thực khuẩn T3, T4, T7 của *E.coli* có điểm hấp phụ là lipopolisaccarit. Thể thực khuẩn T2 và T6 lại có điểm hấp phụ là lipoprotein, thể thực khuẩn SP-50 của *B.subtilis*, có điểm hấp phụ là axit teichoic, còn thể thực khuẩn X của *Salmonella* có điểm hấp phụ là tiên mao, thể thực khuẩn f2, MS2 có điểm hấp phụ trên pili F...

Việc hấp phụ chịu ảnh hưởng của nhiều nhân tố nội ngoại cảnh. Ví dụ :

- Số lượng thể thực khuẩn : Vì số điểm hấp phụ trên bề mặt tế bào vật chủ có hạn do đó số thể thực khuẩn có thể hấp phụ cũng chỉ có hạn. Số lượng thể thực khuẩn tương ứng có thể hấp phụ trên mỗi tế bào miễn cảm được gọi là phức số cảm nhiễm M.O.I. Phức số cảm nhiễm thường rất lớn, tới 250 - 360. Nếu một lượng lớn thể thực khuẩn đồng thời hấp phụ 1 tế bào miễn cảm, vì đầu ống đuôi của từng thể thực khuẩn đều có một ít lizozim làm cho bề mặt tế bào vật chủ như có nghìn nhọt trăm lỗ và khiến tế bào bị phá vỡ. Đó là do M.O.I quá cao gây nên. Trường hợp này sự phá vỡ tế bào không làm sản sinh ra các thể hệ thực khuẩn mới, người ta gọi là sự phá vỡ tự ngoại.

- Các ion dương : Các cation Ca^{2+} , Mg^{2+} và Ba^{2+} ... đều có tác dụng xúc tiến sự hấp phụ, ngược lại, cation Al^{3+} , Fe^{3+} , Cr^{3+} ... lại có tác dụng làm bất hoạt.

- Các nhân tố bổ trợ : Triptophan có thể xúc tiến sự hấp phụ của thể thực khuẩn T₄, biotin có thể xúc tiến sự hấp phụ của thể thực khuẩn ở vi khuẩn sinh axit glutamic (sản xuất bột ngọt, mì chính).

- pH : môi trường trung tính có lợi cho sự hấp phụ. Khi pH < 5, hoặc > 10 thể thực khuẩn rất khó hấp phụ.

- Nhiệt độ : Nhiệt độ thích hợp cho sự phát triển cũng là thích hợp cho sự hấp phụ.

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

3.2. Sự xâm nhập

Sau khi hấp phụ, đầu gốc và sợi đuôi sẽ nhận được một sự kích thích, làm cho 144 capsome của bao đuôi sẽ có những vận động phức tạp. Chúng co lại chỉ còn một nửa chiều dài và đâm ống đuôi vào qua thành tế bào và màng tế bào chất. Trong quá trình này các men lizozim ở đầu ống đuôi có tác dụng làm hòa tan peptidoglican ở một bộ phận của thành tế bào. Thời gian hấp phụ đến xâm nhập là rất ngắn, ở nhiệt độ thích hợp với thể thực khuẩn T₄ chỉ cần có 15 giây. Nếu có từ 2 thể thực khuẩn khác nhau trở lên xâm nhập vào cùng một tế bào vật chủ thì cuối cùng cũng chỉ có một thể thực khuẩn sinh sản mà thôi.

3.3. Sự sao chép

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

Trong tế bào vật chủ ADN chuỗi thẳng của thể thực khuẩn được khép vòng nhờ một trong hai cơ chế tùy thuộc phân tử chuỗi thẳng có các đầu dính hay có đầu dư thừa.

Đầu dính là các vùng ngắn, có sợi đơn, bổ sung cho nhau. Bên trong tế bào vật chủ chúng khép lại tạo thành một phân tử vòng, để lại một chỗ hở trên mỗi sợi. Những chỗ hở ấy sẽ được hàn gắn lại nhờ tác dụng của ligaza.

Các phân tử ADN chuỗi thẳng có đầu dư thừa được khép vòng nhờ có sự tái tổ hợp bên trong các vùng tận cùng đồng dạng.

Nhiễm sắc thể vòng của virus mở đầu sao chép ở một vị trí đặc biệt và diễn ra theo hai hướng quanh phân tử theo một quá trình tương tự như ở nhiễm sắc thể của vi khuẩn. Những lần sao chép tiếp theo trong nhiều trường hợp diễn ra theo một quá trình gọi là vòng xoáy. Một endonucleaza đặc biệt cắt một trong hai sợi và đầu 3'-OH của sợi bị cắt sẽ được dùng làm ngòi để gắn thêm các nucleotit khác. Sợi nguyên vẹn bổ sung được dùng làm khuôn. Như vậy đầu 5' bị thay thế và sau đó được sao chép. Theo cách này phân tử sợi kép được tổng hợp có thể dài gấp nhiều lần nhiễm sắc thể của virus. Các phân tử như vậy được gọi là thể đa liên, sau đó sẽ bị cắt thành các nhiễm sắc thể của virion thường.

Trong một số trường hợp sự khép vòng không diễn ra trước sao chép. Phân tử dạng chuỗi thẳng được sao chép nhiều lần thành một số phân tử giống nhau, sau đó tái tổ hợp để tạo ra các thể đa liên. Cuối cùng các thể đa liên sẽ được một endonucleaza cắt thành các nhiễm sắc thể có đầu dư thừa.

Bây giờ chúng ta xem xét đến sự sao chép ở các virus chứa ARN.

Trừ Retrovirus có nhiễm sắc thể sao chép qua chất trung gian ADN, các nhiễm sắc thể là ARN được sao chép qua chất trung gian ARN sợi đôi. Khi ARN của virion là sợi dương (+) nhiễm sắc thể được dịch mã ngay sau khi xâm nhập vào tế bào vật chủ. Do đó một protein mà virus phải tổng hợp là replicaza (ARN - dependent ARN polymease) ARN - polimeraza phụ thuộc ARN không gặp ở tế bào vật chủ chưa bị virus xâm nhiễm. Replicaza xúc tác tổng hợp một phân tử ARN gọi là sợi đơn bổ sung cho nhiễm sắc thể. Như vậy nhiễm sắc thể được sao chép qua hai chặng. Trước hết sợi âm được tổng hợp ra để tạo thành phân tử sợi đôi dạng sao chép. Sau đó replicaza sẽ dùng sợi âm làm khuôn để tổng hợp ra một bản sao mới của sợi dương.

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

Về mặt di truyền các thể thực khuẩn ARN (R17, NS2, f2, Q β) thuộc loại virus đơn giản nhất. Nhiễm sắc thể của chúng chỉ đọc mã cho 4 protein: protein capsit chủ yếu - protein vỏ, protein capsit thứ yếu - protein thành thực, protein dung giải và ARN replicaza.

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

Các đơn vị kiến trúc và bộ máy sinh tổng hợp bao gồm các axit amin, ribosom, các nucleozit triphosphat cần cho sự sao chép của virus đều do tế bào vật chủ tổng hợp nên. Tuy nhiên, một số nhiễm sắc thể virus có chứa các nucleotit cải biến không thấy có trong tế bào vật chủ. Trong trường hợp này ADN của virus đọc mã cho các enzym xúc tác một số bước trong quá trình tổng hợp của các nucleotit không bình thường này.

Trong đa số trường hợp việc tổng hợp các bazơ không bình thường bắt đầu bằng một nucleotit monophosphat bình thường. Một enzym do virus đọc mã cải biến nucleotit

này, các enzym khác của virus chuyển nucleotit trên thành NTP không bình thường. Cuối cùng một polymeraza do virus đọc mã lắp nucleozit này vào nhiễm sắc thể của virus. Để ngăn cản việc lắp của bazơ bình thường vào nhiễm sắc thể virus, một số virus tổng hợp các enzym có chức năng phân hủy NTP bình thường bằng cách chuyển nó thành NMP tương ứng, do đó đã cung cấp nhiều cơ chất hơn cho việc tổng hợp các triphosphat không bình thường. Axit nucleic chứa các bazơ không bình thường có ưu điểm chọn lọc là kháng lại tác dụng phân giải của các nucleaza trong tế bào chủ. Ví dụ các thể thực khuẩn T chặn bình thường của *E.coli* chứa 5 - hidroximetilxitozin được glucosyl hóa ở vị trí 5'-OH; các thể thực khuẩn đột biến mất khả năng glucosyl hóa, ADN sẽ bị bất hoạt bởi một nucleaza gặp trong *E.coli*.

Dưới đây là các bazơ cải biến gặp trong ADN của một số thể thực khuẩn :

Bazơ cải biến	Bazơ bị thay thế	Mức độ cải biến (%)	Thể thực khuẩn	Vi khuẩn chủ
5 - Hidroximetilxitozin	Xitozin	100	T ₂ , T ₄ , T ₆ XP12	<i>E.coli</i>
5 - Metylxitozin	Xitozin	100		<i>Xanthomanos ozyzae</i>
5 - Hidroximetyluraxin	Timin	100	φe	<i>B.subtilis</i>
Uraxin	Timin	100	PBS2	<i>B.subtilis</i>
α - Putresxenylytimin	Timin	50	φW14	<i>P.acidovorans</i>
5 - Dihidroxipentyluraxin	Timin	41	SP15	<i>B.subtilis</i>
α - Glutamiladenin	Adenin	20	SP10	<i>B.subtilis</i>
2 - Aminoadenin	Adenin	100	S2L	<i>Synechococcus elongus</i>

Việc tổng hợp các protein của virus trong chu trình sao chép được điều chỉnh chặt chẽ bảo đảm sao cho ở một thời điểm xác định chỉ có một số lượng nhất định các protein được tổng hợp. Việc điều chỉnh tổng hợp được thực hiện nhờ một số cơ chế tùy theo nhóm virus.

Trong sự sao chép của các thể thực khuẩn chứa ARN việc điều chỉnh chỉ có thể diễn ra qua sự biến điệu (hay điều biến, chuyển điệu - modulation) của quá trình dịch mã. Có 2 loại cơ chế như sau :

- Tạo thành cấu trúc bậc hai trong ARN của virus
- Sự liên kết các protein đặc biệt vào ARN

Ở cơ chế điều chỉnh thứ nhất có thể lấy làm ví dụ sự bất hoạt vị trí gắn riboxom gắn gen đọc mã cho protein capsit thứ yếu của thể thực khuẩn MS2. Sở dĩ như vậy vì vị trí này được gấp khúc thành một cấu trúc bậc hai dạng cặp tốc do hậu quả của sự cặp đôi bazơ.

Tuy nhiên, riboxom có thể dịch mã gen trong một thời gian ngắn tiếp theo việc tổng hợp một sợi dương mới của vị trí gắn này (trước khi cấu trúc bậc hai hình thành).

Ví dụ của kiểu điều chỉnh thứ hai là sự kìm hãm tổng hợp replicaza virus trong giai đoạn sau của việc nhiễm thể thực khuẩn MS2. Nguyên nhân của sự kìm hãm này là việc tích lũy protein capsit, một số phân tử của protein này gắn với chỗ gắn gen mã hóa replicaza, do đó ngăn cản riboxom liên kết và ngăn cản sự dịch mã tiếp theo của gen.

Trong trường hợp các virus chứa ADN, sự biểu hiện gen được điều chỉnh bởi một số cơ chế, phổ biến là cơ chế do các protein kháng gen kết thúc, kìm hãm sự kết thúc phiên mã phụ thuộc vào yếu tố *rho*. Chẳng hạn điều chỉnh sự biểu hiện gen ở thể thực khuẩn λ . Một số gen được biểu hiện ngay sau khi nhiễm (pha rất sớm, immediate early stage), một số khác được biểu hiện muộn hơn một chút (pha sớm, delayed early stage), số khác nữa chỉ được biểu hiện trong các chặng cuối của quá trình xâm nhiễm (pha muộn, late stage). Một gen của thể thực khuẩn được biểu hiện ngay sau khi nhiễm là gen N đọc mã cho protein N - protein kháng gen kết thúc. Nhóm gen khác đọc mã cho các protein được biểu hiện trong pha sớm thì không được biểu hiện ngay vì trước chúng là các vị trí kết thúc phụ thuộc yếu tố *rho*. Chỉ sau khi protein N đã được tổng hợp với số lượng đầy đủ, sự kết thúc ở những vị trí này mới bị kìm hãm. Sau đó các gen sớm được biểu hiện.

Sự biểu hiện của các gen trong pha muộn được điều chỉnh theo một cách tương tự. Một protein thứ hai kháng gen kết thúc - protein Q (sản phẩm của gen Q) được tổng hợp trong pha sớm do kết quả điều chỉnh của protein N. Khi nồng độ nội bào của protein Q đạt tới mức độ nhất định nó sẽ kìm hãm sự kết thúc ở một vị trí đứng trước nhóm thứ ba cho phép các gen này được biểu hiện trong pha muộn. Nhờ những cơ chế này mà các protein được tổng hợp đúng vào thời gian mà virus cần. Chẳng hạn các thành phần protein của đầu và đuôi của thể thực khuẩn cũng như các yếu tố dung giải chỉ cần trong chặng cuối của quá trình tập hợp virion và trong việc giải phóng khỏi tế bào. Các gen đọc mã cho các protein này chỉ được biểu hiện trong pha sau.

Nhiều cơ chế khác điều chỉnh sự biểu hiện gen theo thời gian hoạt động trong quá trình sao chép nội bào của các thể thực khuẩn khác. Trong đa số trường hợp việc điều khiển sự biểu hiện của gen theo thời gian diễn ra theo cùng một nguyên tắc : sự biểu hiện gen trong các pha sau phụ thuộc vào sự biểu hiện trước đó của một gen khác. Chẳng hạn trong trường hợp thể thực khuẩn λ , sự biểu hiện của các gen muộn phụ thuộc vào sự biểu hiện trước đó của một protein kháng gen kết thúc. Trong trường hợp của thể thực khuẩn T7 và PBS2 sự biểu hiện trước của gen đọc mã cho một ARN - polimeraza đặc biệt (transcriptaza) quyết định sự biểu hiện của các gen muộn. Còn trong trường hợp các thể thực khuẩn T chặn gen đọc mã cho enzym cái biến ARN - polimeraza trong tế bào chủ sẽ xác định sự biểu hiện của các gen muộn.

Sự sinh trưởng nội bào của virus gây nên nhiều hậu quả có hại cho tế bào vật chủ. Sự sao chép của một số thể thực khuẩn dạng sợi chứa ADN chỉ kìm hãm nhẹ tốc độ sinh trưởng của vật chủ. Trong khi đó sự sao chép của các thể thực khuẩn T chặn kìm hãm sự biểu hiện của tất cả các gen chủ do tổng hợp một số nucleaza phân hủy ADN của tế bào vật chủ. Thậm chí các gen thoát được tác dụng của những nucleaza này cũng không thể phiên mã vì các enzym do virus độc mã đã adenyl hóa và vì vậy bất hoạt hóa ARN - polimeraza của tế bào vật chủ khiến enzym này mất khả năng nhận ra các đầu (promotor) trong hệ gen của tế bào vật chủ.

Sau đây là một số sản phẩm gen của thể thực khuẩn điều chỉnh sự phát triển.

Protein	Thể thực khuẩn	Chức năng điều chỉnh
Protein N	λ	Kháng gen kết thúc
Protein Q	λ	Kháng gen kết thúc
Protein của gen I	PSO1	Kháng gen kết thúc
Transcriptaza	T ₇ , PBS2	Phiên mã các gen muộn
Sản phẩm của các gen 33, 45 và 55	T ₄	Yếu tố tương tự sigma

3.4. Sự thành thực

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

Sau khi các protein capsit và axit nucleic của virut đã được tích lũy phong phú trong tế bào vật chủ thì sẽ bắt đầu quá trình lắp ráp (hay tập hợp - assembly). Ở virut thực vật TMV và ở các virut có cấu trúc đối xứng xoắn ốc sự lắp ráp tương đối đơn giản. Các protein capsit sẽ liên kết với nhiễm sắc thể của virut và cuộn lại thành dạng xoắn ốc. Sự lắp ráp của các thể thực khuẩn có đối xứng phức tạp hơn. Khi đó quá trình lắp ráp và giải phóng các virion thành thực liên quan với nhau. Việc tập hợp diễn ra ở mặt trong của màng tế bào chất và khi các protein capsit gắn vào ADN thì sợi virion đang sinh trưởng bị đẩy qua thành tế bào.

Việc lắp ráp của các virut có đối xứng 20 mặt và các thể thực khuẩn hoặc virut có đối xứng phức hợp (ví dụ có đầu và đuôi) sẽ khác một chút. Trong đa số trường hợp các protein capsit tập hợp tạo thành một cấu trúc rỗng gọi là procapsit hay tiền capsit có hình dạng và kích thước của capsit (hoặc của đầu trong trường hợp các thể thực khuẩn không có đuôi). Sau đó axit nucleic của virut đi vào cấu trúc này và kết hợp thành một trạng thái chặt chẽ.

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

Trong hầu hết trường hợp bước cuối cùng trong giai đoạn lắp ráp của một virut có vỏ là việc tiếp nhận một phần màng của tế bào vật chủ bao bọc lấy lõi nucleocapsit khi virut đi qua màng tế bào chất của vật chủ. Trước khi diễn ra bước này các protein do virut đọc mã sẽ tích tụ ở màng tế bào chất hoặc ở màng trong của nhân. Ở các virut động vật có vỏ các protein của virut được tổng hợp trên riboxom gắn vào mạng lưới nội chất thô và được màng bên cạnh bao lấy khi chúng được tổng hợp. Thường các protein này được glicozyl hóa bởi các enzym có mặt trong mạng lưới nội chất. Các virut có vỏ chứa ARN thì protein vỏ của virut di chuyển đến màng tế bào chất nhờ bộ máy Golgi. Sau đó lõi nucleoprotein của virion di chuyển đến mặt trong của màng và được bao bọc bởi màng chứa các protein virut khi lõi rời tế bào nhờ một quá trình tương tự như quá trình này chối. Ở các virut có vỏ chứa ADN thì protein màng di chuyển đến màng trong của nhân. Ở đây nucleocapsit tập hợp trong nhân sẽ liên kết với các vùng của màng trong nhân đã gắn với các protein màng của virut. Màng này bao quanh lõi nucleoprotein và virion tách khỏi nhân. Virion thành thực sẽ chuyển tới mạng lưới nội chất.

3.5. Sự phóng thích

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

3.6. Phân loại virus

Năm 1987 Ủy ban quốc tế về phân loại virus (KTV) đã đưa ra 2 hệ thống phân loại virus động vật và virus thực vật như sau :

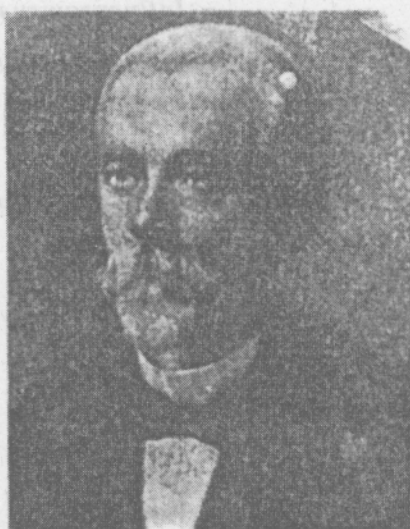
PHÂN LOẠI VIRUS ĐỘNG VẬT

Họ	Họ phụ	Các chi
+ Poxviridae	- Chordopoxvirinae	- <i>Orthopoxvirus</i> , <i>Parapoxvirus</i> , <i>Avipoxvirus</i> , <i>Capripoxvirus</i> , <i>Leporipoxvirus</i> , <i>Suipoxvirus</i> .
	- Entomopoxvirinae	
+ Baculoviridae		
+ Polydnaviridae		- <i>Polydnavirus</i> .
+ Iridoviridae		- <i>Iridovirus</i> , <i>Chloriridovirus</i> , <i>Ranavirus</i> , <i>Lymphocystivirus</i> .
+ Herpesviridae		
	- Alphaherpesvirinae	- <i>Symplexvirus</i> , <i>Poikilivirus</i> .
	- Betaherpesvirinae	
	- Gammaherpesvirinae	- <i>Lymphocryptovirus</i> , <i>Thetalymplocryptovirus</i> , <i>Rhadinovirus</i> .
+ Adenoviridae		- <i>Mastadenovirus</i> , <i>Aviadenovirus</i> .
+ Papovaviridae		- <i>Papillomavirus</i> , <i>Polyomavirus</i> .
+ Hepadnaviridae		
+ Parvoviridae		- <i>Parvovirus</i> , <i>Dependovirus</i> , <i>Densovirus</i> .
+ Reoviridae		- <i>Reovirus</i> , <i>Orbivirus</i> , <i>Rotavirus</i> , <i>Phytoreovirus</i> , <i>Fijivirus</i> , <i>Cypovirus</i> .
+ Birnaviridae		- <i>Birnavirus</i> .
+ Togaviridae		- <i>Togavirus</i> , <i>Rubivirus</i> , <i>Pestivirus</i> , <i>Arterivirus</i> .

+ Flaviviridae	- <i>Flavivirus</i> .
+ Orthomyxoviridae	- <i>Influenzavirus</i> .
+ Paramyxoviridae	- <i>Paramyxovirus</i> , <i>Mobillivirus</i> , <i>Pneumovirus</i> .
+ Rhabdoviridae	- <i>Vesiculovirus</i> , <i>Lyssavirus</i> .
+ Bunyaviridae	- <i>Bunyavirus</i> , <i>Phlebovirus</i> , <i>Nairovirus</i> , <i>Hantavirus</i> .
+ Arenaviridae	- <i>Arenavirus</i> .
+ Retroviridae	
- Oncovirinae	
- Spumavirinae	- <i>Spumavirus</i>
- Lentivirinae	- <i>Lentivirus</i>
+ Picornaviridae	- <i>Enterovirus</i> , <i>Cardiovirus</i> , <i>Rhinovirus</i> , <i>Aphthovirus</i>
+ Caliciviridae	- <i>Calicivirus</i>
+ Coronaviridae	- <i>Coronavirus</i>
+ Toroviridae	- <i>Torovirus</i>

PHÂN LOẠI VIRUT THỰC VẬT

Cấu trúc	Nhóm
+ ARN 1 sợi :	<i>Capillovirus</i> , <i>Carlavirus</i> , <i>Closterovirus</i> , <i>Potexvirus</i> , <i>Potyvirus</i> , <i>Tobamovirus</i> , <i>Carmovirus</i> , <i>Luteovirus</i> , Virut xanh lụi ngô (MCDV), <i>Marafivirus</i> , <i>Necrovirus</i> . Virus đốm vàng cây củ cần (parsnip), <i>Sobemovirus</i> , <i>Tombusvirus</i> , <i>Tymovirus</i> , <i>Rhabdovirus</i> thực vật, <i>Furovirus</i> , <i>Tobravirus</i> , <i>Comovirus</i> , <i>Dianthovirus</i> , <i>Nepovirus</i> , Virut khảm gân lá đậu Hà Lan, <i>Hordeivirus</i> , <i>Bromovirus</i> , <i>Cucumovirus</i> , <i>Fabavirus</i> , <i>Ilarvirus</i> , Virut khảm Alfalfa, <i>Tenuivirus</i> , Virut héo đốm cà chua.
+ ARN 2 sợi :	<i>Cryptovirus</i> , <i>Reovirus</i> thực vật.
+ ADN 1 sợi :	<i>Geminivirus</i>
+ ADN 2 sợi :	<i>Caulimovirus</i>



D.I. Ivanovski (1864 - 1920)

Virut ADN	<div data-bbox="232 1123 433 1282"></div> <div data-bbox="448 1133 604 1288"></div> <div data-bbox="647 1162 735 1292"></div> <div data-bbox="851 1168 939 1262"></div> <div data-bbox="1041 1202 1084 1242"></div> <div data-bbox="1186 1202 1215 1232"></div> <div data-bbox="203 1322 356 1351">Vi rut đậu mùa</div> <div data-bbox="414 1327 546 1357">Vi rut Hecpet</div> <div data-bbox="582 1327 764 1357">Thể thực khuẩn T₂</div> <div data-bbox="800 1331 931 1361">Vi rut Adeno</div> <div data-bbox="975 1335 1113 1365">Vi rut Papora</div> <div data-bbox="1157 1335 1288 1365">Vi rut Pacvo</div>
Virut ARN	<div data-bbox="203 1411 436 1650"></div> <div data-bbox="458 1451 546 1650"></div> <div data-bbox="604 1441 633 1650"></div> <div data-bbox="706 1481 837 1600"></div> <div data-bbox="880 1500 968 1580"></div> <div data-bbox="1011 1510 1092 1590"></div> <div data-bbox="1128 1520 1179 1580"></div> <div data-bbox="1223 1530 1252 1560"></div> <div data-bbox="203 1669 371 1699">Vi rut Paramyxo</div> <div data-bbox="414 1673 516 1703">Vi rut đại</div> <div data-bbox="553 1659 677 1709">Vi rut khảm thuốc lá</div> <div data-bbox="706 1679 822 1709">Vi rut Myxo</div> <div data-bbox="837 1640 982 1669">Vi ru? Coronu</div> <div data-bbox="990 1679 1113 1709">Vi rut Toga</div> <div data-bbox="1099 1640 1215 1669">Vi rut Reo</div> <div data-bbox="1223 1669 1310 1719">Vi rut Picocna</div>

Tế bào hồng cầu

7.500

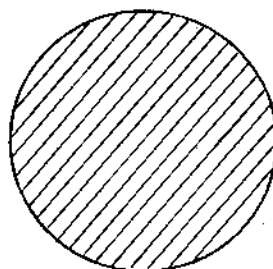


Vi khuẩn:

Ricketxi

750

250



Virut:

Virut đậu mùa

210



Virut hecpet

130



Virut dại

125



Virut cúm

85



Adeno virut

75



Thế thực khuẩn T2

65



Virut viêm tủy xám

27



Virut sốt vàng

22



Virut lở mồm long móng

21



Virut khảm thuốc lá

15 (chiều dài 250)



Phân tử:

Phân tử hemoglobin

15











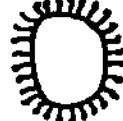

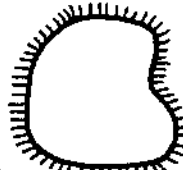
Phân tử albumin

10





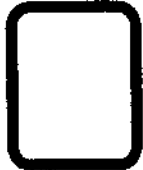


So sánh kích thước của virut với phân tử sống và vi khuẩn hồng cầu

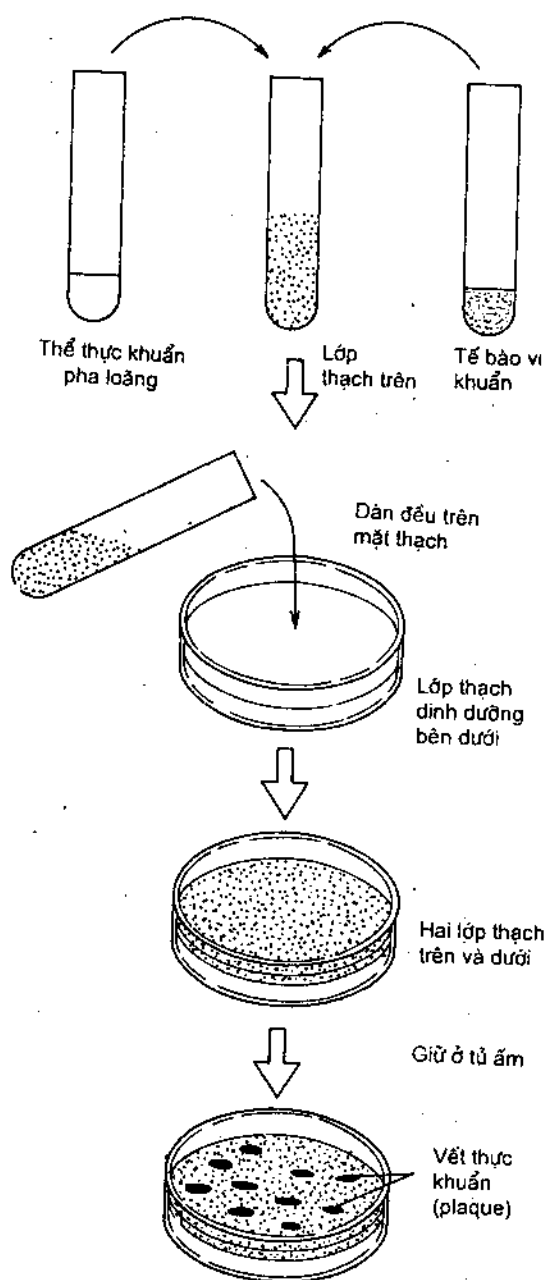
(VI RUT ARN)

PICORNA-  $C = 32^c$ 20 - 30nm	CALICI-  $C = 32(\text{holes})$ 35 - 40nm	TOGA-  Thể 20 mặt 40 - 90nm	CORONA-  Đa hình 80 - 100nm	RETRO-  Thể 20 mặt 100 - 120nm	RRO-  $C = 132$ 60 - 80nm
BUNYA-  $C = 122$ 80 - 120nm	ORTHOMYXO-  Xoắn đa hình 80 - 120nm	ARENA-  Đa hình 110 - 130nm	RHABDO  Xoắn 60 x 180nm	PARAMYXO-  Xoắn đa hình 150 - 300nm	

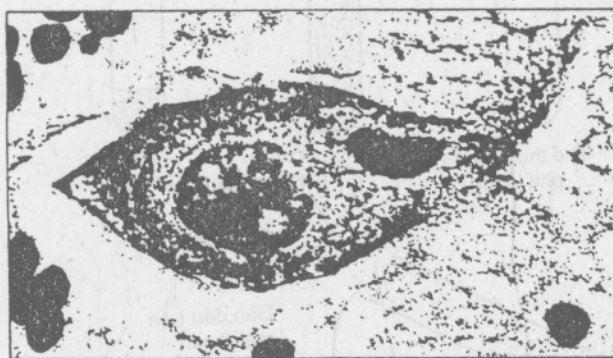
(VI RUT ADN)

PARVO-  $C = 12^c$ 18 - 26nm	PAPOVA-  $C = 72$ 45 - 55nm	ADENO-  $C = 252$ 70 - 90nm	HERFES-  $C = 162$ 150 - 200nm	POX-  Thể phức hợp 240 x 300nm
---	--	--	--	---

Chú thích : C : số capsome, c : đối xứng 20 mặt

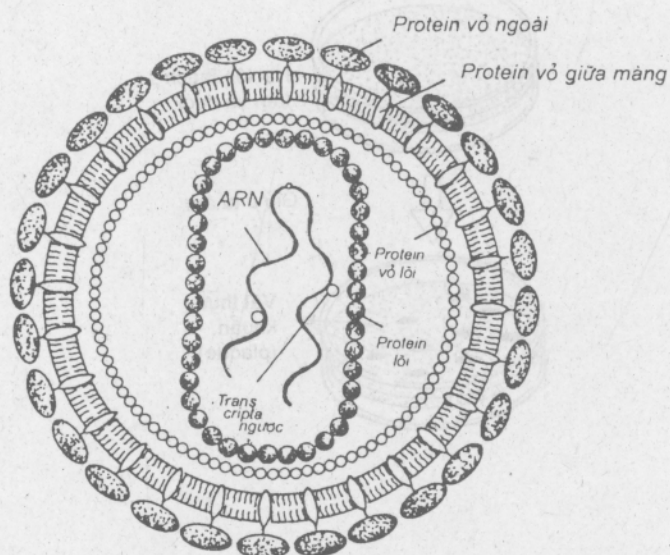


Thí nghiệm để quan sát vết thực khuẩn

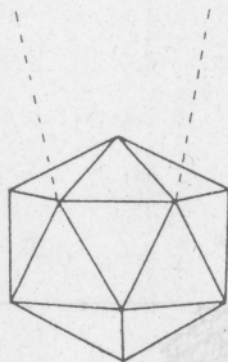


1 μm

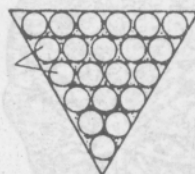
Thể bao hàm của virut



Virut Retro

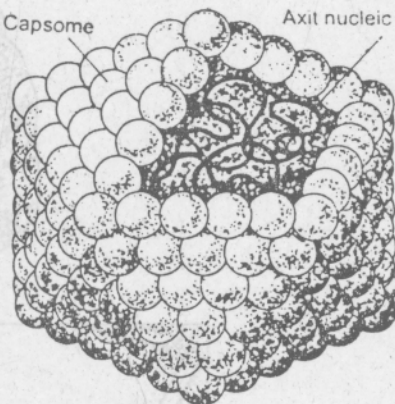


Capsome



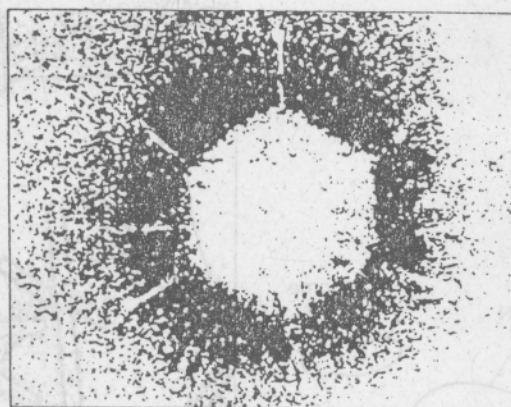
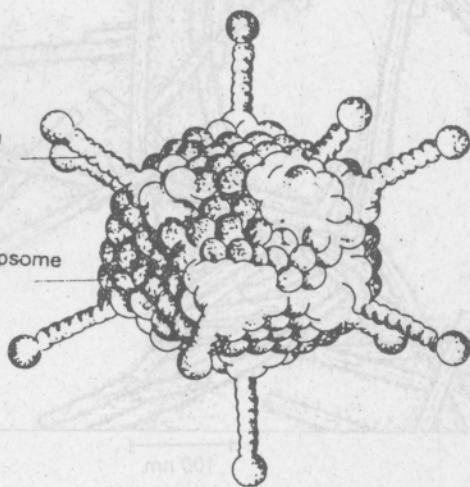
Capsome

Axit nucleic

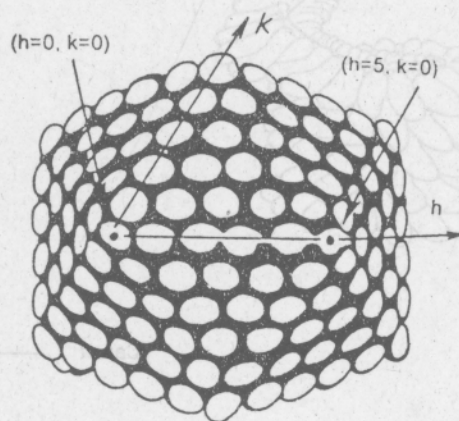
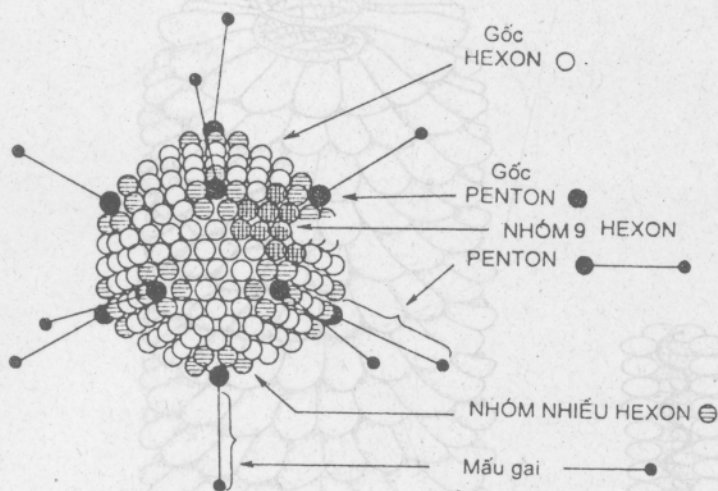


Mẫu gai

Capsome

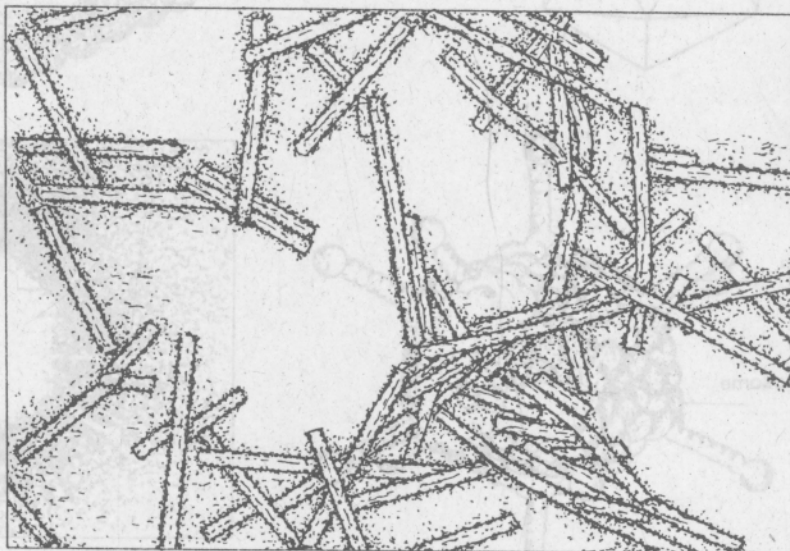
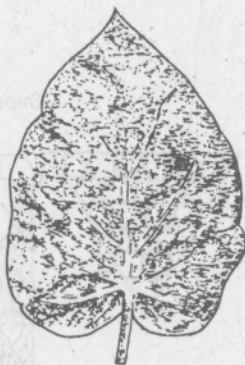


0,1 μm

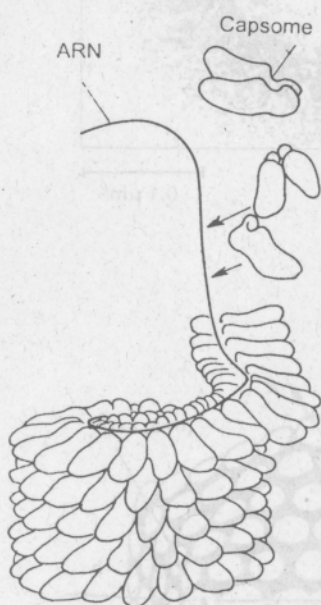


Mô hình virut Adeno

Virut đối xứng 20 mặt



100 nm

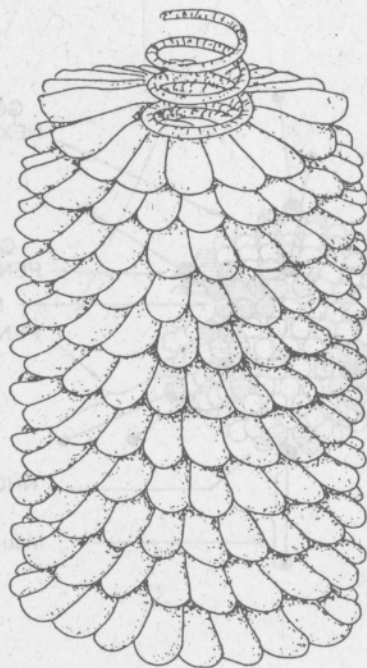
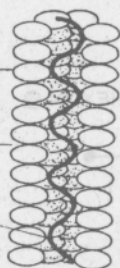


ARN

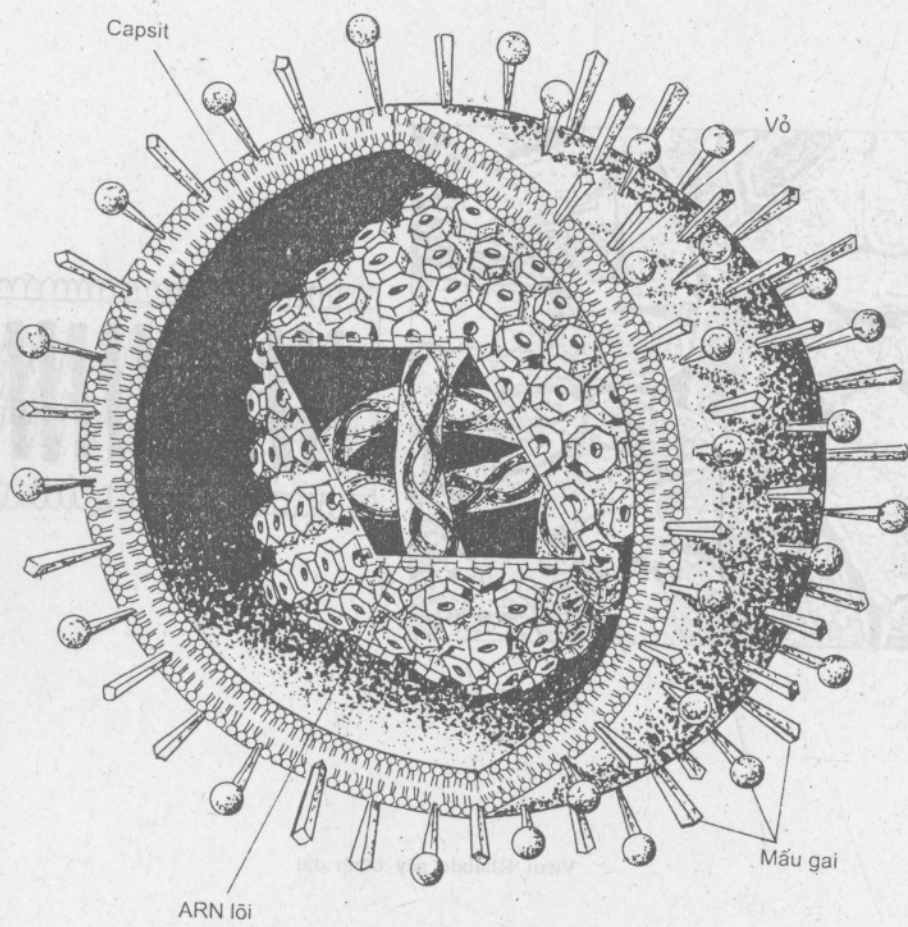
Capsome

Capsit

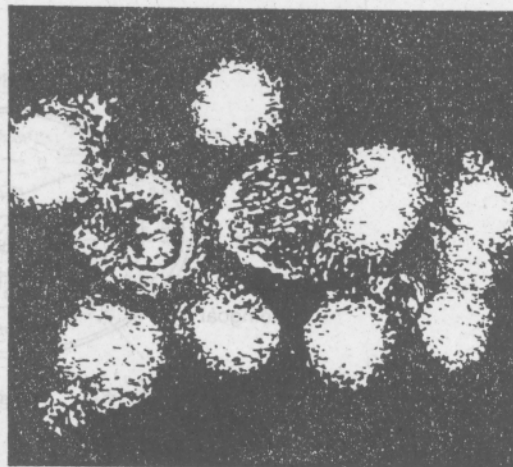
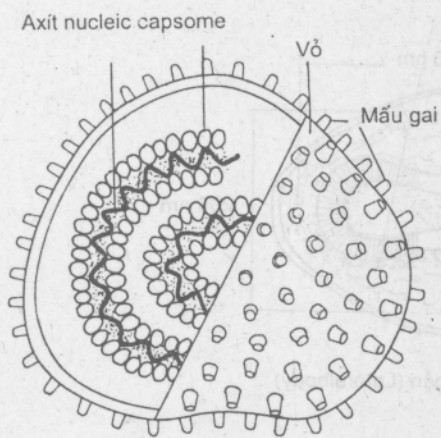
Axitnucleic



Virut khảm thuốc lá (TMV)

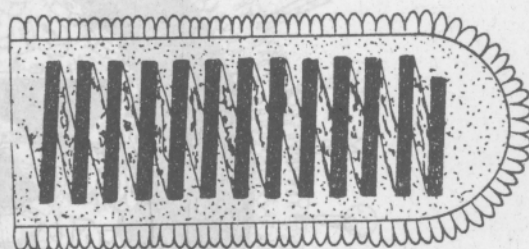
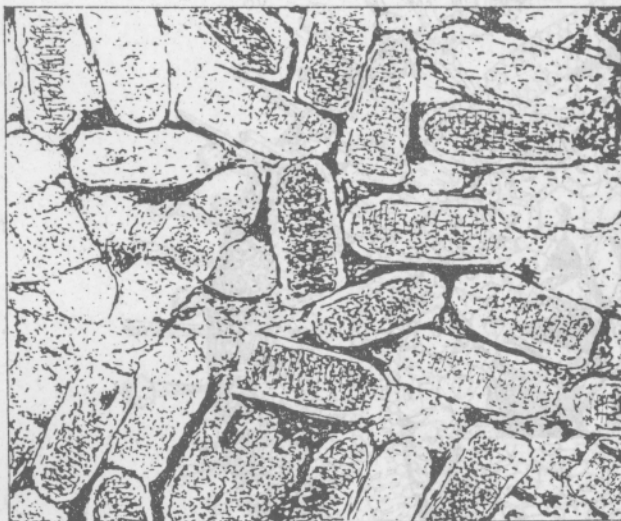


Virut Hecpet (Herpesvirus)

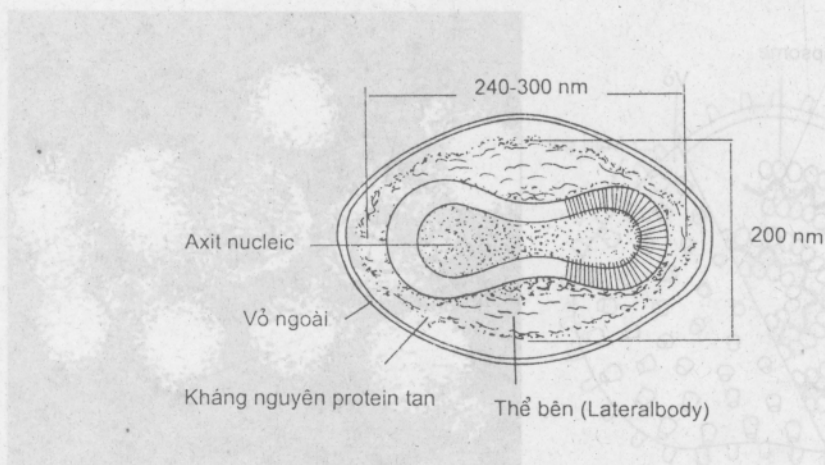


0,1 μm

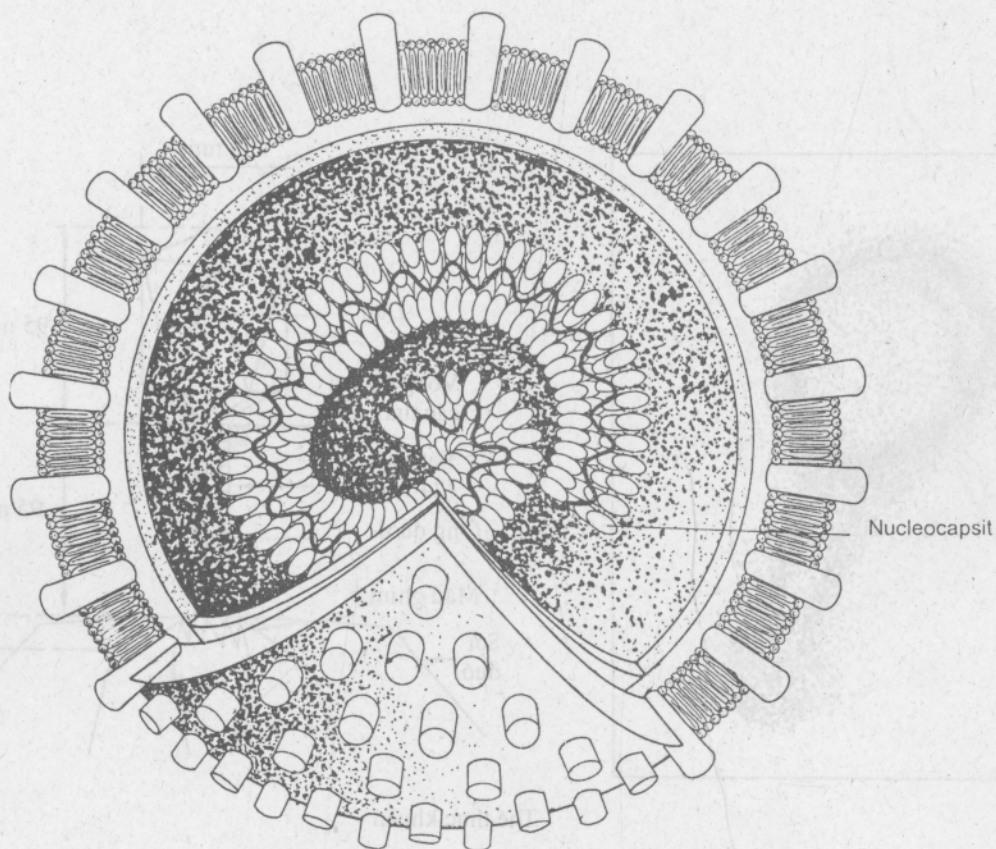
Virut đa dạng có vỏ



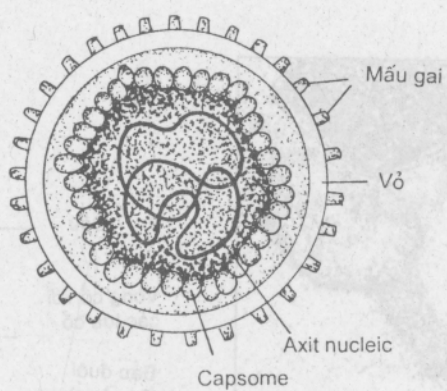
Virut Rhabdo gây bệnh dại



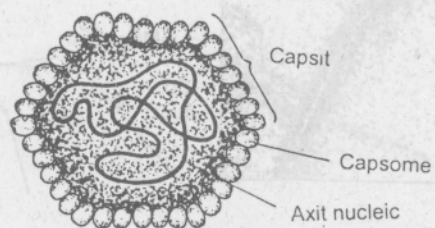
Cấu trúc của virut đậu mùa



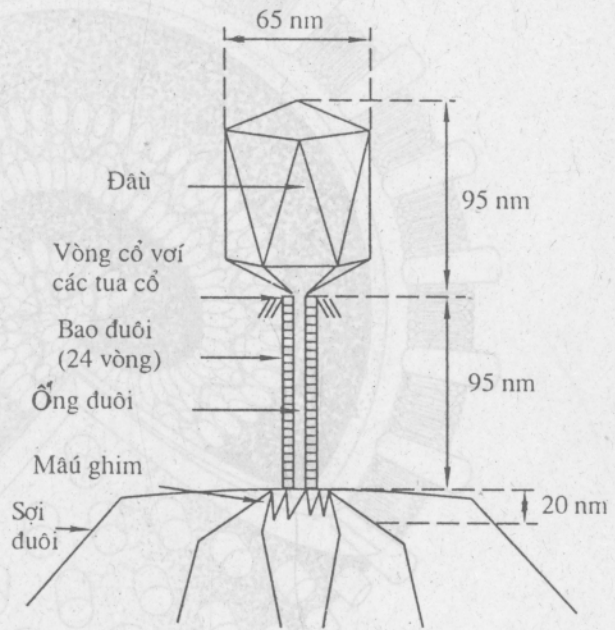
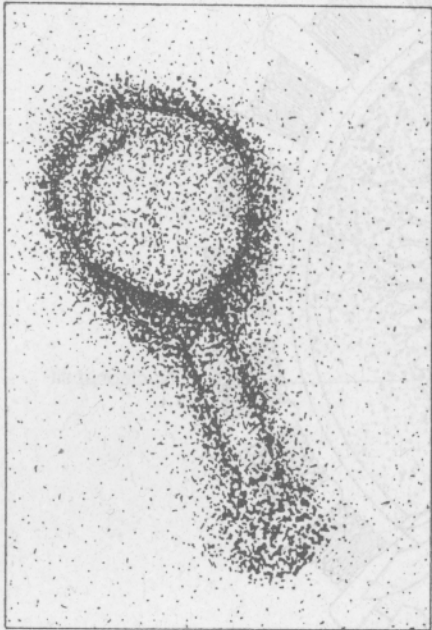
Virut đối xứng xoắn có vỏ



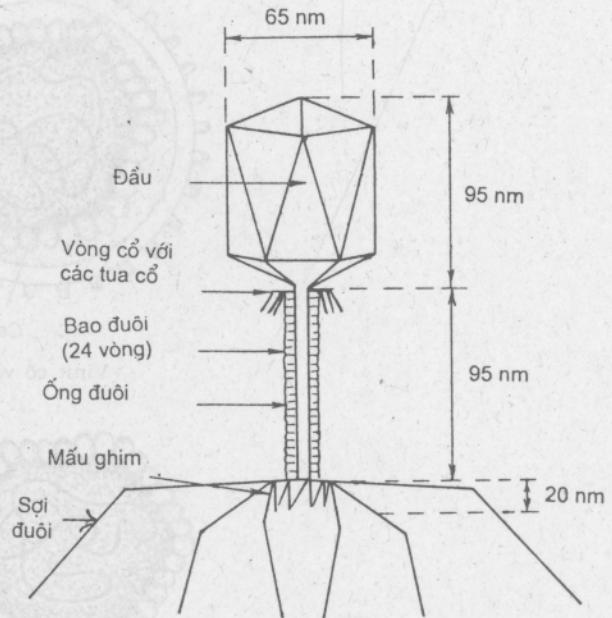
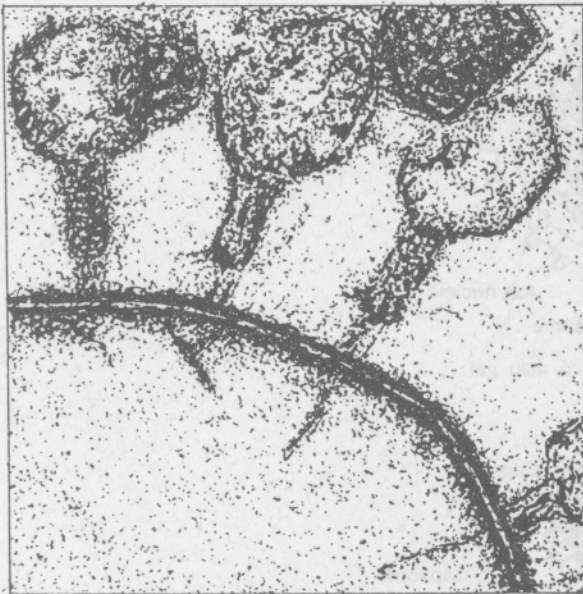
Virut có vỏ có mấu gai



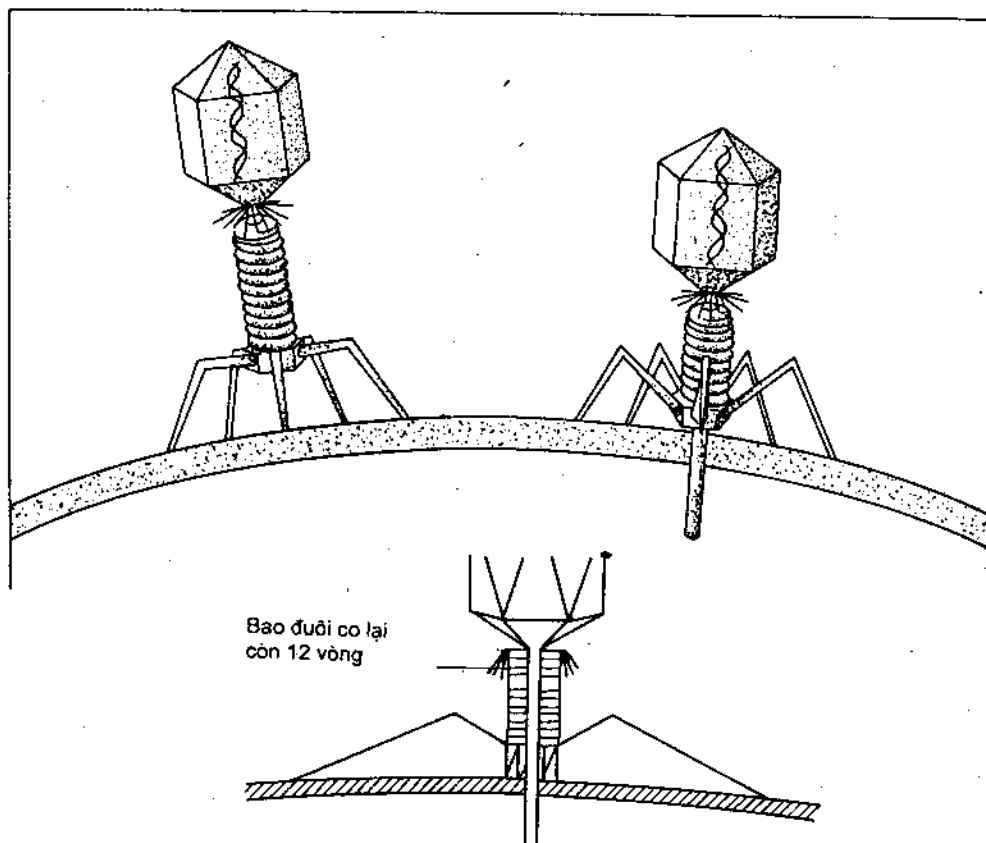
Virut không có vỏ



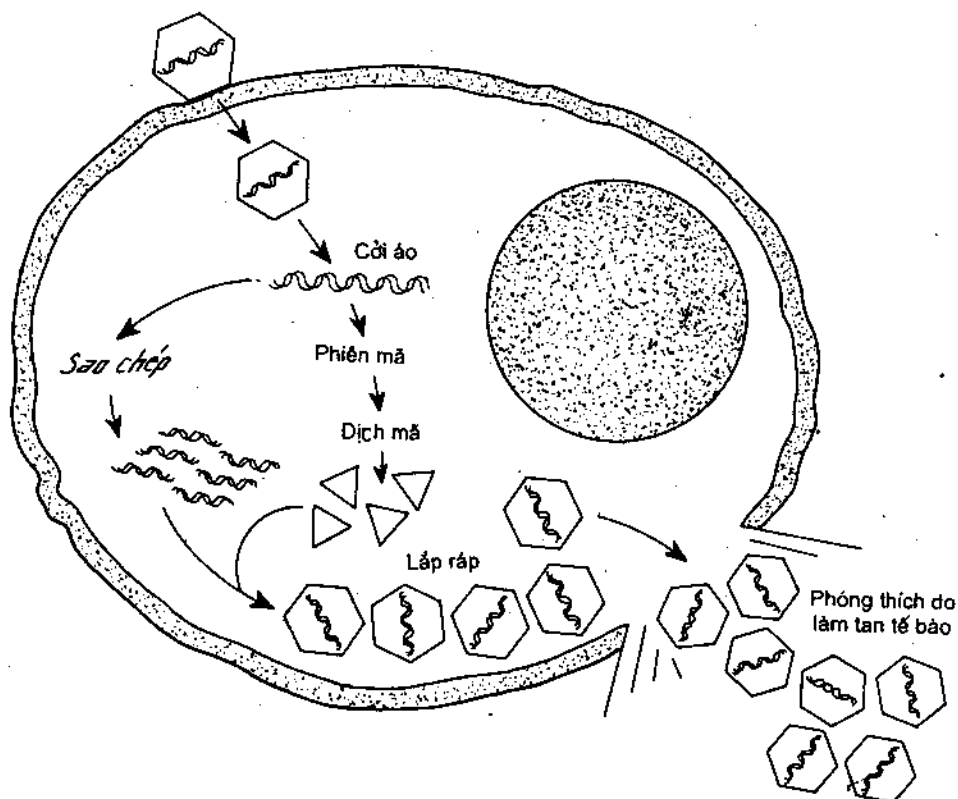
Thể thực khuẩn



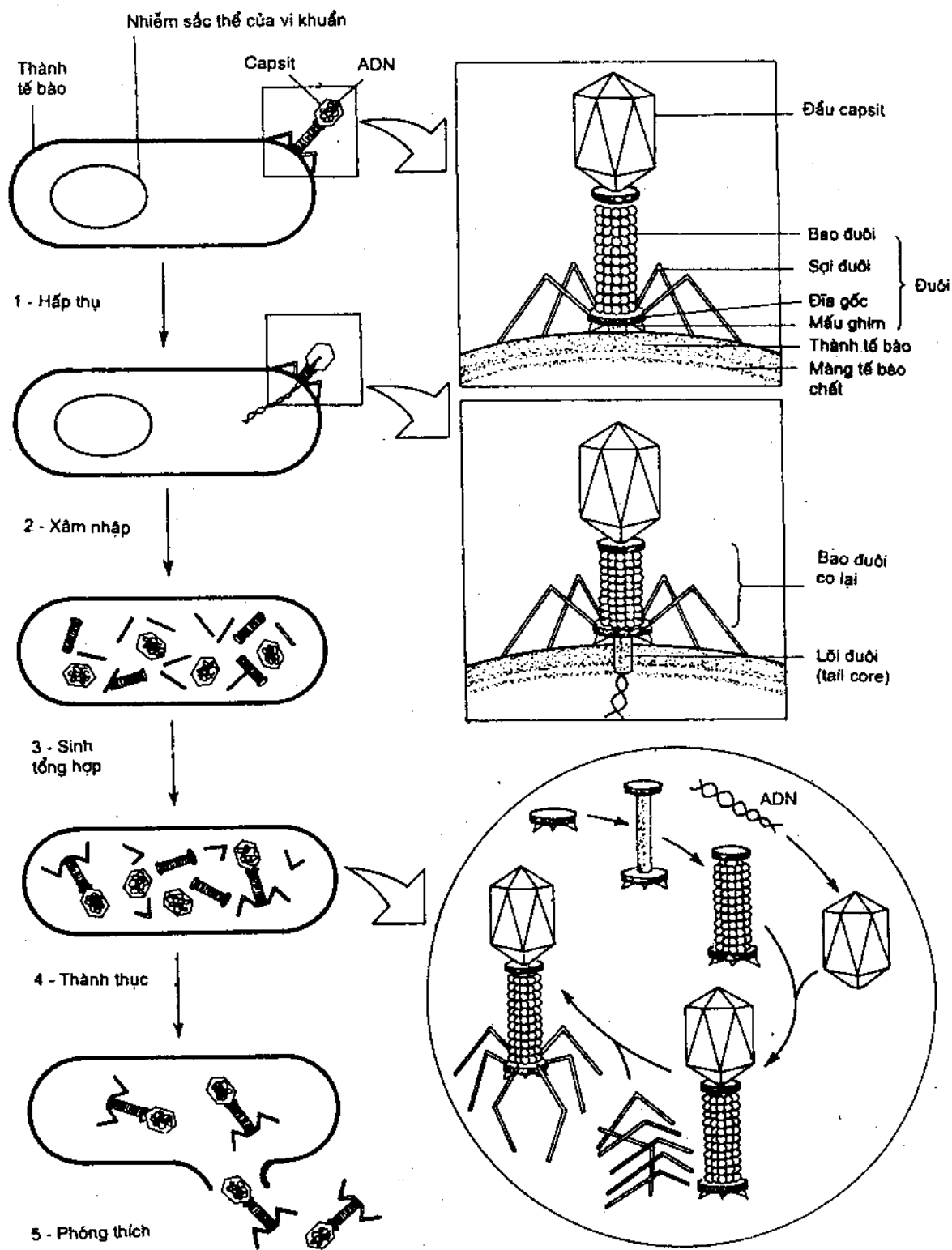
Thể thực khuẩn



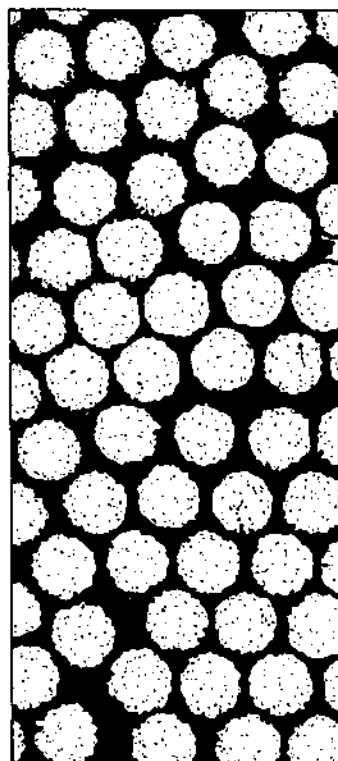
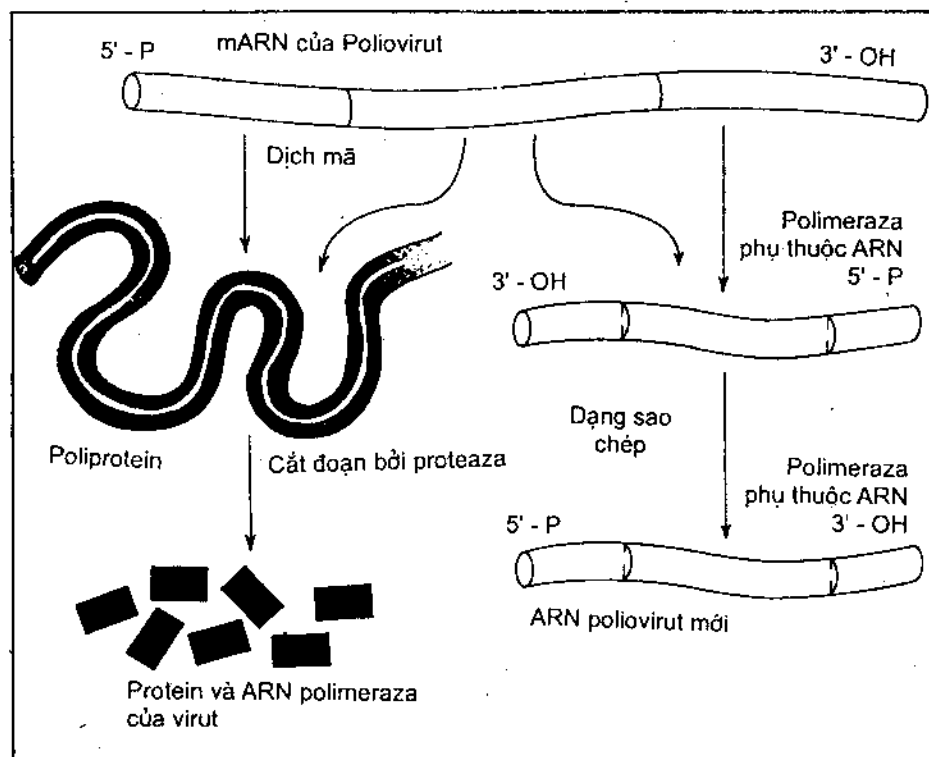
Quá trình hấp phụ và xâm nhập của thể thực khuẩn



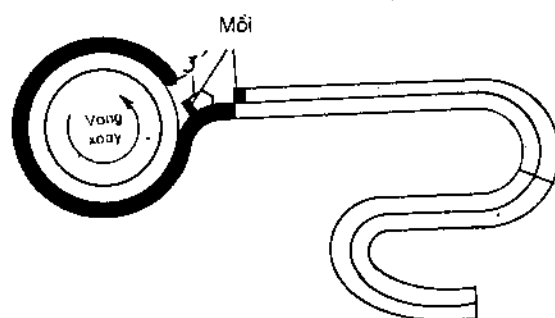
Quá trình sinh sản của virus đậu mùa (Poxviruses) trong tế bào vật chủ



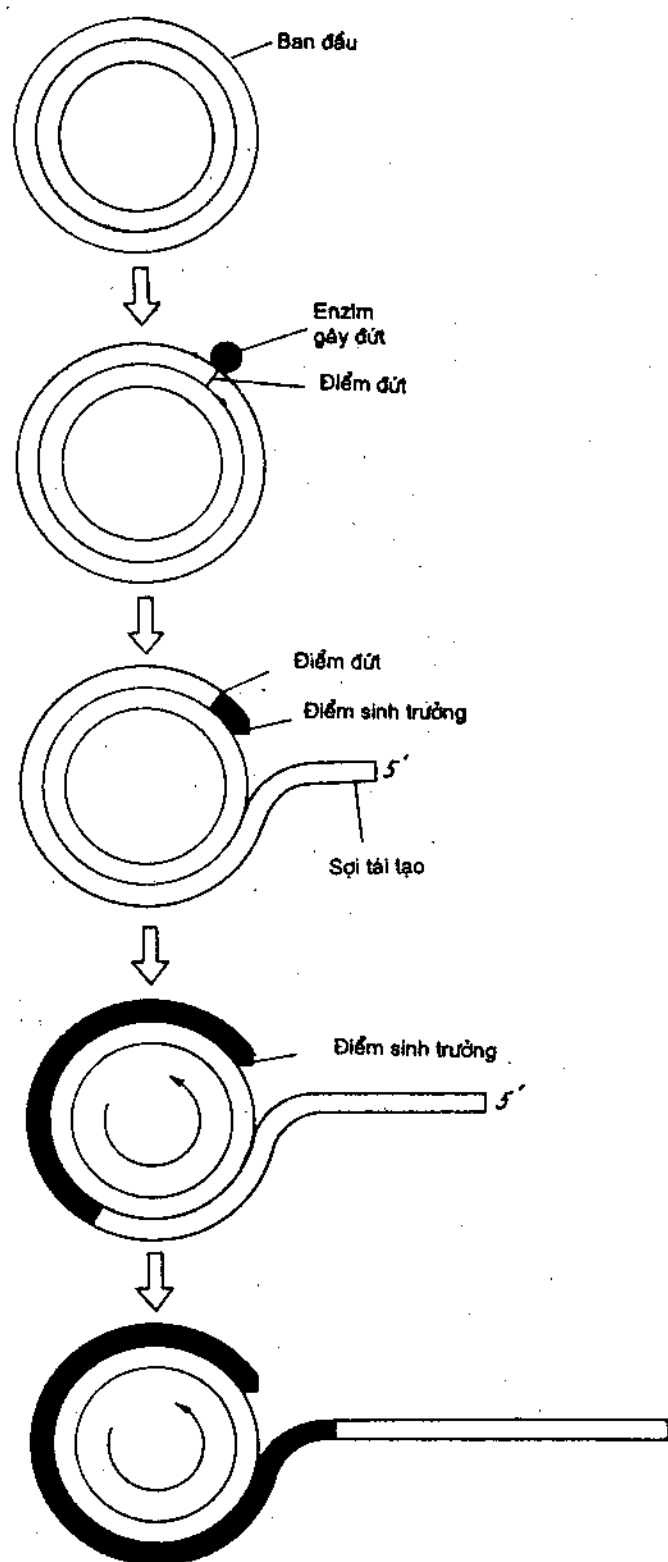
Các quá trình sinh sản của thể thực khuẩn trong tế bào vi khuẩn



Quá trình sinh sản trong tế bào vật chủ của các virut Polio



Giải đoạn muộn (pha muộn) của sự sao chép theo vòng xoắn ở thể thực khuẩn



Sự sao chép theo vòng xoay ở virus

CHƯƠNG V

DINH DƯỠNG CỦA VI SINH VẬT

1. THÀNH PHẦN TẾ BÀO VÀ DINH DƯỠNG CỦA VI SINH VẬT

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

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

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

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

Thành phần hóa học của tế bào vi sinh vật quyết định nhu cầu dinh dưỡng của chúng. Thành phần hóa học cấu tạo bởi các nguyên tố C, H, O, N, các nguyên tố khoáng đa lượng và các nguyên tố khoáng vi lượng. Chỉ riêng các nguyên tố C, H, O, N, P, S, K, Na đã chiếm đến 98% khối lượng khô của tế bào vi khuẩn *E.coli* :

**THÀNH PHẦN CÁC NGUYÊN TỐ CHỦ YẾU
CỦA TẾ BÀO VI KHUẨN *E. COLI* (S.E. Luria)**

Nguyên tố	% chất khô	Nguyên tố	% chất khô
C	50	Na	1,0
O	20	Ca	0,5
N	14	Mg	0,5
H	8	Cl	0,2
P	3	Fe	
S	1	Các nguyên tố khác	0,3
K	1		

Lượng chứa các nguyên tố ở các vi sinh vật khác nhau là không giống nhau. Ở các điều kiện nuôi cấy khác nhau, các giai đoạn khác nhau lượng chứa các nguyên tố trong cùng một loài vi sinh vật cũng không giống nhau. Trong tế bào vi sinh vật các hợp chất được phân thành 2 nhóm lớn : (1). Nước và các muối khoáng ; (2). Các chất hữu cơ.

CÁC NHÓM HỢP CHẤT CHỦ YẾU CỦA TẾ BÀO VI KHUẨN *E. COLI*

Loại hợp chất	Nước	Protein	ADN	ARN	Hidrat C	Lipit	Chất hữu cơ phân tử nhỏ	Các phân tử vô cơ
Lượng chứa (%)	70	15	1	6	3	2	2	1

1.1. Nước và muối khoáng

Nước chiếm đến 70-90% khối lượng cơ thể vi sinh vật. Tất cả các phản ứng xảy ra trong tế bào vi sinh vật đều đòi hỏi có sự tồn tại của nước. Ở vi khuẩn lượng chứa nước thường là 70-85%, ở nấm sợi thường là 85-90%.

Từ cổ xưa người ta đã biết sử dụng phương pháp sấy khô thực phẩm để đình chỉ sự phát triển của vi sinh vật. Việc sử dụng muối hoặc đường để bảo quản thực phẩm chẳng qua cũng chỉ nhằm tạo ra một sự khô cạn sinh lí không thích hợp cho sự phát triển của vi sinh vật.

Yêu cầu của vi sinh vật đối với nước được biểu thị một cách định lượng bằng độ hoạt động của nước (water activity, a_w) trong môi trường. Độ hoạt động của nước còn được gọi là thế năng của nước (water potential, p_w) :

$$a_w = \frac{p}{p_o}$$

Ở đây p là áp lực hơi của dung dịch còn p_o là áp lực hơi nước. Nước nguyên chất có $a_w = 1$, nước biển có $a_w = 0,980$, máu người có $a_w = 0,995$, cá muối có $a_w = 0,750$; kẹo, mứt có $a_w = 0,700$.

Mỗi vi sinh vật thường có một trị số a_w tối thích và một trị số a_w tối thiểu. Một số vi sinh vật có thể phát triển được trong môi trường có trị số a_w rất thấp, người ta gọi chúng là các vi sinh vật chịu áp (osmophyl). Chẳng hạn a_w có thể chấp nhận được của *Saccharomyces rouxii* là 0,850, của *Saccharomyces bailii*, của *Pennicillium* là 0,800, của *Halobacterium*, *Halococcus* là 0,750, của *Xeromyces bisporus* là 0,700...

Phần nước có thể tham gia vào các quá trình trao đổi chất của vi sinh vật được gọi là nước tự do. Đa phần nước trong tế bào vi sinh vật tồn tại ở dạng nước tự do. Nước kết hợp là phần nước liên kết với các hợp chất hữu cơ cao phân tử trong tế bào (protein, lipit, hidrat cacbon...). Nước liên kết mất khả năng hòa tan và lưu động.

Muối khoáng chiếm khoảng 2-5% khối lượng khô của tế bào. Chúng thường tồn tại dưới dạng các muối sunphat, photphat, cacbonat, clorua... Trong tế bào chúng thường ở dạng các ion. Dạng cation chẳng hạn như Mg^{2+} , Ca^{2+} , K^+ , Na^+ ... Dạng anion chẳng

hạn như HPO_4^{2-} , SO_4^{2-} , HCO_3^- , Cl^- ... Các ion trong tế bào vi sinh vật luôn tồn tại ở những tỉ lệ nhất định nhằm duy trì độ pH và lực thẩm thấu thích hợp cho từng loại vi sinh vật.

1.2. Chất hữu cơ

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

THÀNH PHẦN HÓA HỌC CỦA MỘT TẾ BÀO VI KHUẨN (F.C.Neidhardt, 1987)

Phân tử	% khối lượng khô (1)	Số phân tử/tế bào	Số loại phân tử
Nước	–		1
Tổng số các đại phân tử	96	24.609.802	khoảng 2500
Protein	55	2.350.000	khoảng 1850
Polisaccarit	5	4.300	2(2)
Lipit	9,1	22.000.000	4(3)
ADN	3,1	2,1	1
ARN	20,5	255.500	khoảng 660
Tổng số các đơn phân tử	3,5		khoảng 350
Axit amin và tiền thể	0,5		khoảng 100
Đường và tiền thể	2		khoảng 50
Nucleotit và tiền thể	0,5		khoảng 200
Các ion vô cơ	1		18
Tổng cộng :	100		

Chú thích : (1) Khối lượng khô của 1 tế bào vi khuẩn *E.coli* đang sinh trưởng mạnh là $2,8 \times 10^{-13}$ g

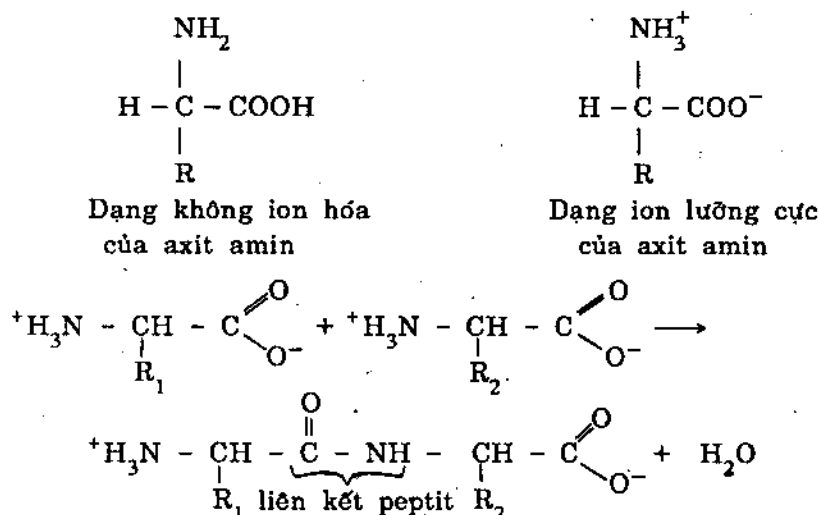
(2) : Peptidoglican và glicogen

(3) : Đó là 4 loại photpholipit, mỗi loại có nhiều nhóm khác nhau phụ thuộc vào thành phần axit béo.

Protein cấu tạo chủ yếu bởi các nguyên tố : C (50-55%), O (21-24%), N (15-18%), H (6,5-7,3%), S (0-0,24%), ngoài ra còn có thể có một lượng rất nhỏ các nguyên tố khác nhau P, Fe, Zn, Cu, Mn, Ca...

Protein được tạo thành từ các axit amin.

Khi hình thành protein các axit amin nối liền với nhau qua liên kết peptit (liên kết cộng hóa trị). Liên kết này (-CO-NH-) được tạo thành do phản ứng kết hợp giữa nhóm α -cacboxyl $\left(\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ -\text{C} \\ \diagup \text{O}^- \end{array} \right)$ của một axit amin này với nhóm α -amin ($^+\text{H}_3\text{N}-$) của một axit amin khác và loại đi một phân tử nước :



Tùy số lượng axit amin liên kết với nhau mà ta có các dipeptit, tripeptit, tetrapeptit, pentapeptit... Từ phân tử có 15 liên kết peptit trở lên ta gọi là polipeptit. Polipeptit này còn được gọi là protein. Có lúc 1 protein được tạo thành do vài polipeptit liên kết lại với nhau.

Có 20 loại axit amin tham gia vào cấu trúc của protein, số gốc axit amin là rất lớn vì vậy có thể tạo ra được tới 20^{18} loại protein khác nhau (hiện đã biết rõ cấu trúc 3 chiều của khoảng trên 100 loại protein). Các protein này có thể được xếp loại theo hình dạng, theo cấu trúc hoặc theo chức năng :

Axit amin \longrightarrow oligopeptit (dipeptit, tripeptit...)

↓

└──────────┘ polipeptit

Protein :

- Xếp loại theo hình dạng :
 - Protein hình sợi
 - Protein hình cầu
- Xếp loại theo cấu trúc :
 - Protein đơn giản
 - Protein phức tạp (protein kết hợp)
 - Nucleoprotein
(Protein + axit nucleic)
 - Glicoprotein
(Protein + hidrat cacbon)
 - Lipoprotein
(Protein + lipit)
 - Mucoprotein
(Protein + mucopolisaccarit)

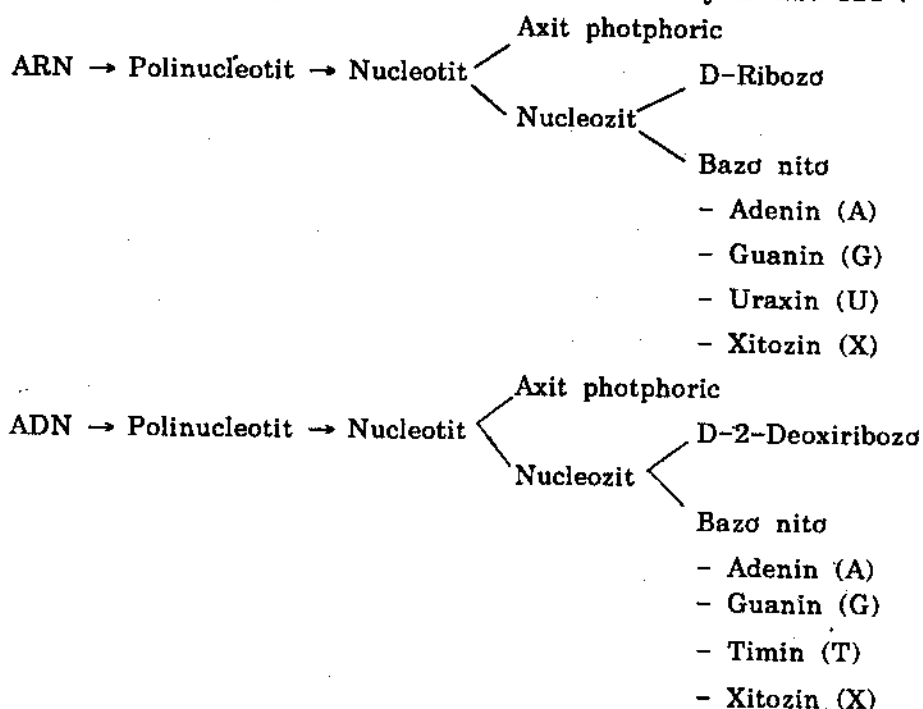
- Photphoprotein
(Protein + axit photphoric)
- Cromoprotein
(Protein + hợp chất có màu)
- Metaloprotein
(Protein + kim loại)

- ...
- Xếp loại theo chức năng :
 - Protein phi hoạt tính (kiến tạo, dự trữ...)
 - Protein hoạt tính (xúc tác, vận tải, chuyển động, truyền xung thần kinh, điều hòa, bảo vệ...).

Trong tế bào vi sinh vật ngoài protein, peptit còn có cả những axit amin ở trạng thái tự do.

Axit nucleic cấu tạo chủ yếu bởi N (1-16%), P (9-10%), phần còn lại là C, H, O. Căn cứ vào đường pentozơ trong phân tử mà axit nucleic được chia thành 2 loại : ADN (axit deoxiribonucleic, chứa deoxiribozơ) và ARN (axit ribonucleic, chứa ribozơ).

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



Tỉ lệ G + X ở các chi vi sinh vật khác nhau là có thể không giống nhau. Đây là một chỉ tiêu quan trọng được sử dụng trong phân loại vi sinh vật trong giai đoạn hiện nay. Sau đây là một số ví dụ :

- Vi khuẩn Gram (-) :

Chi	G + X mol %
<i>Proteus</i>	38-42
<i>Vibrio</i>	40-50

<i>Acinetobacter</i>	40-47
<i>Zymomonas</i>	47-48
<i>Nitrosomonas</i>	47-51
<i>Escherichia</i>	50-51
<i>Nitrosococcus</i>	50-51
<i>Salmonella</i>	50-53
<i>Enterobacter</i>	52-59
<i>Acetobacter</i>	55-64
<i>Alcaligenes</i>	57-70
<i>Aeromonas</i>	57-63
<i>Pseudomonas</i>	58-70
<i>Rhizobium</i>	59-66
<i>Agrobacterium</i>	59-63
<i>Nitrobacter</i>	60-62
<i>Azotobacter</i>	63-66
<i>Chromobacterium</i>	63-72

- Vi khuẩn Gram (+)

Chi	G + X mol%
<i>Clostridium</i>	23-43
<i>Sarcina</i>	28-31
<i>Corynebacterium</i>	52-68
<i>Propionibacterium</i>	59-66
<i>Staphylococcus</i>	30-40
<i>Planococcus</i>	48-52
<i>Bacillus</i>	33-62
<i>Streptococcus</i>	33-42
<i>Arthrobacter</i>	60-72
<i>Micrococcus</i>	66-75

Hidrat cacbon (cấu tạo bởi C, H, O) ở vi sinh vật có thể chia thành 3 nhóm :

- Monosaccarit :

+ Pentozơ : ribozơ, deoxiribozơ...

+ Hexozơ : glucozơ, fructozơ, galactozơ

- Oligosaccarit :

+ Disaccarit : saccarozơ, lactozơ, maltozơ...

+ Trisaccarit : rafinozơ...

- Poligosaccarit : tinh bột, glixerin, dextrin, xenlulozơ, axit hialuronic...

Lipit trong tế bào vi sinh vật thường có 2 nhóm : lipit đơn giản và lipit phức tạp (lipoit).

- Lipit đơn giản (este của glixerin và axit béo) : chủ yếu là triaxinglixerol

- Lipit phức tạp :

+ Photpholipit : chủ yếu là photphoglixerit...

+ Glicolipit : galactozylglixerit, sulfoglucozylglixerit...

Có những loại nấm men lượng lipit chứa tới 50-60% lipit. Photpholipit kết hợp với protein tạo thành lipoprotein. Chúng tham gia vào cấu trúc của màng tế bào chất, màng ti thể...

Về vitamin thì có sự khác nhau rất lớn trong nhu cầu của vi sinh vật. Có những vi sinh vật tự dưỡng chất sinh trưởng (auxoautotroph) chúng có thể tự tổng hợp ra các vitamin cần thiết. Nhưng cũng có nhiều loại vi sinh vật dị dưỡng chất sinh trưởng (auxoheterotroph), chúng đòi hỏi phải cung cấp ít hoặc nhiều loại vitamin khác nhau. Vai trò của một số vitamin trong hoạt động sống của vi sinh vật được hiểu tóm tắt như sau :

Vitamin	Dạng coenzim	Chức năng
Tiamin(anevrin, B ₁)	Tiamin pirophotphat (TPP)	Oxi hóa và khử cacboxyl các ketoaxit, chuyển nhóm aldehyt.
Riboflavin (lactoflavin, B ₂)	Flavinmononucleotit (FMN), flavin adenin dinucleotit (FAD)	Chuyển hidro
Axit pantotenic (B ₃)	CoenzimA	Oxi hóa ketoaxit và tham gia vào trao đổi chất của axit béo.
Niaxin (a.nicotinic, nicotinamít, B ₅)	Nicotin adenin dinucleotit(NAD) và NADP	Khử hidro và chuyển hidro
Piridoxin (pirdoxal, piridoxamin, B ₆)	Piridoxal photphat	Chuyển amin, khử amin, khử cacboxyl raxemin hóa axit amin
Biotin (B ₇ , H) Axit folic (folaxin, B ₉ , M, Bc...)	Biotin Axit tetrahydrofolic	Chuyển CO ₂ và nhóm cacboxilic Chuyển đơn vị 1 cacbon
(Axit APAB paraaminobenzoic, B ₁₀)	Axit tetrahydrofolic	Chuyển CO ₂ các nhóm cacboxilic Chuyển đơn vị 1 cacbon
Xianocobalamin (cobalamin, B ₁₂) Axit lipoic	Metilxianocobalamit Lipoamit	Chuyển nhóm metyl Chuyển nhóm axyl và nguyên tử hidro
Axit ascohic (vitamin C)		Là cofacto trong hidroxy hóa
Ecgocanxiferol (vitamin D ₂)	1,25-dihydroxicole-canxiferol	Trao đổi canxi và photpho

2. NGUỒN THỨC ĂN CACBON CỦA VI SINH VẬT

Căn cứ vào nguồn thức ăn cacbon mà người ta chia vi sinh vật thành các nhóm sinh lí sau đây :

a. Tự dưỡng

- Tự dưỡng quang năng. Nguồn C là CO_2 , nguồn năng lượng là ánh sáng.
- Tự dưỡng hóa năng. Nguồn C là CO_2 , nguồn năng lượng là một số hợp chất vô cơ đơn giản.

b. Dị dưỡng

- Dị dưỡng quang năng :

Nguồn C là chất hữu cơ..., nguồn năng lượng là ánh sáng, ví dụ ở vi khuẩn không lưu huỳnh màu tía.

- Dị dưỡng hóa năng :

Nguồn C là chất hữu cơ, nguồn năng lượng là từ sự chuyển hóa trao đổi chất của chất nguyên sinh của một cơ thể khác. Ví dụ ở động vật nguyên sinh, nấm, một số vi khuẩn.

- Hoại sinh :

Nguồn C là chất hữu cơ. Nguồn năng lượng là từ sự trao đổi chất của chất nguyên sinh các xác hữu cơ. Ví dụ ở nhiều nấm, vi khuẩn.

- Kí sinh :

Nguồn C là chất hữu cơ. Nguồn năng lượng là lấy từ các tổ chức hoặc dịch thể của một cơ thể sống. Ví dụ các vi sinh vật gây bệnh cho người, động vật, thực vật.

Như vậy là tùy nhóm vi sinh vật mà nguồn cacbon được cung cấp có thể là chất vô cơ (CO_2 , NaHCO_3 , CaCO_3 ...) hoặc chất hữu cơ. Giá trị dinh dưỡng và khả năng hấp thụ các nguồn thức ăn cacbon khác nhau phụ thuộc vào 2 yếu tố : một là thành phần hóa học và tính chất sinh lí của nguồn thức ăn này, hai là đặc điểm sinh lí của từng loại vi sinh vật. Trên thế giới hầu như không có hợp chất cacbon hữu cơ nào mà không bị hoặc nhóm vi sinh vật này hoặc nhóm vi sinh vật khác phân giải. Không ít vi sinh vật có thể đồng hóa được cả các hợp chất cacbon rất bền vững như cao su, chất dẻo, dầu mỏ, parafin, khí thiên nhiên. Ngay fomcon là một hóa chất diệt khuẩn rất mạnh nhưng cũng có nhóm nấm sợi sử dụng làm thức ăn.

Nhiều chất hữu cơ vì không tan được trong nước hoặc vì có khối lượng phân tử quá lớn cho nên trước khi được hấp thụ, vi sinh vật phải tiết ra các enzym thủy phân (amilaza, xenulaza, pectinaza, proteinaza, lipaza...) để chuyển hóa chúng thành các hợp chất dễ hấp thụ (đường, axit amin, axit béo...).

Người ta thường sử dụng đường để làm thức ăn cacbon khi nuôi cấy phần lớn các vi sinh vật dị dưỡng. Cần chú ý rằng đường đơn ở nhiệt độ cao có thể bị chuyển hóa thành loại hợp chất có màu tối gọi là đường cháy rất khó hấp thụ. Trong môi trường kiểm sau khi khử trùng đường còn dễ bị axit hóa và làm biến đổi pH môi trường. Để tránh các hiện tượng này khi khử trùng môi trường chứa đường người ta thường chỉ hấp ở áp lực 0,5atm (112,5°C) và duy trì trong 30 phút. Với các loại đường đơn tốt nhất là nên sử dụng phương pháp hấp gián đoạn (phương pháp Tyndal) hoặc lọc riêng

dung dịch đường (thường dùng nồng độ 20%) bằng nén lọc hoặc màng lọc vi khuẩn sau đó mới dùng thao tác vô trùng để bổ sung vào các môi trường đã khử trùng.

Khi chế tạo các môi trường chứa tinh bột trước hết phải hồ hóa tinh bột ở nhiệt độ 60-70°C sau đó đun sôi rồi mới đưa đi khử trùng ở nổi hấp áp lực.

Xenlulozo được đưa vào các môi trường nuôi cấy vi sinh vật phân giải xenlulozo dưới dạng giấy lọc, bông hoặc các loại bột xenlulozo (cellulose powder, avicel...).

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

Để nuôi cấy các loại vi sinh vật khác nhau người ta dùng các nồng độ đường không giống nhau. Với vi khuẩn, xạ khuẩn người ta thường dùng 0,5-0,2% đường còn đối với nấm men, nấm sợi lại thường dùng 3-10% đường.

Hầu hết vi sinh vật chỉ đồng hóa được các loại đường ở dạng đồng phân D. Cũng may là phần lớn các đồng phân của đường đơn trong tự nhiên đều là thuộc loại D chứ không phải loại L.

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

Phạm vi đồng hóa các nguồn thức ăn cacbon của từng loài vi sinh vật cụ thể rất khác nhau. Có thực nghiệm cho thấy loài vi khuẩn *Pseudomonas cepacia* có thể đồng hóa trên 90 loại nguồn thức ăn cacbon khác nhau, trong khi đó các vi khuẩn sinh metan chỉ có thể đồng hóa được CO₂ và vài loại hợp chất chứa 1C hoặc 2C mà thôi.

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

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

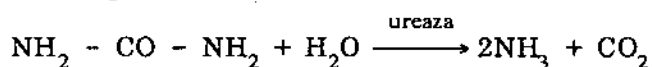
Trong công nghiệp lên men nguồn ri đường là nguồn cacbon rẻ tiền và rất thích hợp sử dụng đối với nhiều loại vi sinh vật khác nhau.

Dưới đây là thành phần hóa học của ri đường mía và ri đường củ cải :

Thành phần	Tỉ lệ	Ri đường củ cải	Ri đường mía
Đường tổng số	%	48-52	48-56
Chất hữu cơ khác đường	%	12-17	9-12
Protein (N x 6,25)	%	6 - 10	2-4
Kali	%	2,0-7,0	1,5-5,0
Canxi	%	0,1-0,5	0,4-0,8
Magie	%	khoảng 0,09	khoảng 0,06
Photpho	%	0,02-0,07	0,6-2,0
Biotin	mg/kg	0,02-0,15	1,0-3,0
Axit pantotenic	mg/kg	50-110	15-55
Inozitol	mg/kg	5000-8000	2500-6000
Tiamin	mg/kg	khoảng 1,3	khoảng 1,8

3. NGUỒN THỨC ĂN NITƠ CỦA VI SINH VẬT

Nguồn nitơ dễ hấp thụ nhất đối với vi sinh vật là NH_3 và NH_4^+ . Trước đây có quan điểm cho rằng một số vi khuẩn không có khả năng đồng hóa muối amon. Quan điểm này không đúng. Ngày nay người ta cho rằng tất cả các loại vi sinh vật đều có khả năng sử dụng muối amon. Đôi khi có những loại vi sinh vật không phát triển được trên các môi trường chứa muối amon thì nguyên nhân không phải ở bản thân gốc NH_4^+ mà là ở độ chua sinh lý do các muối này tạo ra. Sau khi đồng hóa gốc NH_4^+ trong môi trường sẽ tích lũy các anion vô cơ (SO_4^{2-} , HPO_4^{2-} , Cl^- ...) và vì thế mà làm hạ thấp rất nhiều trị số pH của môi trường. Muối amon của các axit hữu cơ ít làm chua môi trường hơn do đó có lúc được sử dụng nhiều hơn (mặc dầu đắt hơn). Ure là nguồn thức ăn nitơ trung tính về mặt sinh lý. Khi bị phân giải bởi enzym ureaza, ure sẽ giải phóng thành NH_3 và CO_2 . Phần NH_3 được vi sinh vật sử dụng mà không làm chua môi trường như đối với các muối amon :



Nhiều khi để nuôi cấy vi sinh vật bằng nguồn nitơ là ure người ta phải bổ sung thêm muối amon (như amon sunphat chẳng hạn). Sở dĩ như vậy là bởi vì phải có thức ăn nitơ dễ hấp thụ cho vi sinh vật phát triển đã thì mới có thể sản sinh ra được ureaza để thủy phân ure.

Cũng có loại vi sinh vật sở dĩ không phát triển được trên môi trường chỉ có nguồn thức ăn nitơ là muối amon không phải vì không đồng hóa được muối này mà là do chúng đòi hỏi phải được cung cấp thêm một vài loại axit amin không thay thế nào đó.

Muối nitrat là nguồn thức ăn nitơ thích hợp đối với nhiều loại tảo, nấm sợi và xạ khuẩn nhưng ít thích hợp đối với nhiều loại nấm men và vi khuẩn. Sau khi vi sinh vật sử dụng hết gốc NO_3^- các ion kim loại còn lại (K^+ , Na^+ , Mg^{2+} ...) sẽ làm kiềm hóa môi trường. Để tránh hiện tượng này người ta thường sử dụng muối NH_4NO_3 để làm nguồn nitơ cho nhiều loại vi sinh vật. Tuy nhiên gốc NH_4^+ thường bị hấp thụ nhanh hơn, rồi mới hấp thụ đến gốc NO_3^- .

Nguồn nitơ có dự trữ nhiều nhất trong tự nhiên là nguồn khí nitơ tự do (N_2) trong khí quyển. Chúng chiếm tỉ lệ rất cao trong không khí (75,5% theo khối lượng hoặc 78,16% theo thể tích). Số lượng nitơ trong lớp khí quyển bên trên mỗi ha đất đai nhiều tới 85000 tấn, còn tổng số nitơ trong cả khí quyển là khoảng 4.000.000.000.000.000 tấn. Trong khí nitơ (N_2) hai nguyên tử N liên kết với nhau bằng 3 dây nối rất bền vững ($\text{N} \equiv \text{N}$). Năng lượng của 3 dây nối này cao tới 225kcal/M. Chính vì vậy mà N_2 rất khó kết hợp với các nguyên tố khác và nitơ có rất nhiều chung quanh ta mà cả người, cả động vật lẫn cây trồng đều luôn luôn thiếu thốn thức ăn nitơ. Muốn phá vỡ 3 liên kết này người ta phải sử dụng tới những năng lượng rất lớn. Chẳng hạn ở nhà máy phân đạm hóa học, muốn làm cho N_2 liên kết được với H_2 để tạo thành NH_3 người ta đã phải dùng một nhiệt độ là 500°C và một áp suất cao tới 350 atm.

Đa số vi sinh vật không có khả năng đồng hóa N_2 trong không khí. Tuy nhiên có những vi sinh vật có thể chuyển hóa N_2 thành NH_3 nhờ hoạt động xúc tác của một hệ thống enzym có tên gọi là nitrogenaza. Người ta gọi các vi sinh vật này là vi sinh vật cố định nitơ (nitrogen - fixing microorganisms) còn quá trình này được gọi là quá

trình cố định nitơ (nitrogen fixation). Chúng ta sẽ xem xét quá trình này ở một chương khác.

Vi sinh vật còn có khả năng đồng hóa rất tốt nitơ chứa trong các thức ăn hữu cơ. Các thức ăn này sẽ vừa là nguồn cacbon vừa là nguồn nitơ cung cấp cho vi sinh vật. Vi sinh vật không có khả năng hấp thụ trực tiếp các protein cao phân tử. Chỉ có các polipeptit chứa không quá 5 gốc axit amin mới có thể di chuyển trực tiếp qua màng tế bào chất của vi sinh vật. Rất nhiều vi sinh vật có khả năng sản sinh proteaza xúc tác việc thủy phân protein thành các hợp chất phân tử thấp có khả năng xâm nhập vào tế bào vi sinh vật.

Nguồn nitơ hữu cơ thường được sử dụng để nuôi cấy vi sinh vật là pepton loại chế phẩm thủy phân không triệt để của một nguồn protein nào đấy. Chúng khác nhau về lượng chứa các loại polipeptit và lượng chứa axit amin tự do.

Chế phẩm	Phản ứng Biure	Các thành phần (tỉ lệ % so với N tổng số)		
		1	2	3
Pepton Pharmakon	+	63,5	9,7	27,8
Pepton Vitte	+	44,1	26,7	29,2
Pepton Canbaum	+	40,2	27,4	32,4
Pepton Gee	+	44,5	23,2	32,3
Sản phẩm thủy phân nhờ pepxin	+	42,1	25,2	32,7
Pepton Roche	+	25,3	11,7	63,0
Sản phẩm thủy phân nhờ tripxin	+	2,0	14,9	83,1
Dịch thủy phân gluten	-	0	0	100
Dịch thủy phân gelatin	-	0	0	100

Ghi chú : 1. Các polipeptit cao phân tử được kết tủa bằng tannin khi có mặt 2% H_2SO_4 .

2. Các polipeptit được kết tủa bằng tannin khi môi trường có phản ứng trung tính.

3. Những axit amin tự do và các peptit không bị tannin làm kết tủa.

Về axit amin người ta nhận thấy có thể có ba quan hệ khác nhau đối với từng loại vi sinh vật. Có những loại vi sinh vật không cần đòi hỏi phải được cung cấp bất kì loại axit amin nào. Chúng có khả năng tổng hợp ra toàn bộ các axit amin mà chúng cần thiết từ NH_4^+ và các chất hữu cơ không chứa nitơ. Người ta gọi nhóm vi sinh vật này là nhóm tự dưỡng amin. Có những loại vi sinh vật ngược lại bắt buộc phải được cung cấp một hoặc nhiều axit amin mà chúng cần thiết. Chúng không có khả năng tự tổng hợp ra được các axit amin này. Người ta gọi chúng là nhóm dị dưỡng amin. Loại thứ ba là loại các vi sinh vật không có các axit amin trong môi trường vẫn phát triển được, nhưng nếu có mặt một số axit amin nào đó thì sự phát triển của chúng sẽ được tăng cường hơn nhiều.

Nhu cầu về axit amin của các loại vi sinh vật khác nhau là rất khác nhau. Trong khi các loài động vật khác nhau rất xa thường cũng chỉ có nhu cầu giống nhau về các axit amin thì giữa các loài vi sinh vật rất giống nhau về hình thái và rất gần nhau về vị trí phân loại lại có thể đòi hỏi rất khác nhau về các axit amin. Các axit amin mà cơ thể sinh vật đòi hỏi phải được cung cấp (cũng tức là các axit amin mà cơ thể sinh vật không tự tổng hợp được) gọi là các axit amin không thay thế. Danh

sách các axit amin không thay thế đối với mỗi loài sinh vật được gọi là aminogram của loài ấy. Aminogram của các loại động vật thường chênh nhau rất ít. Các axit amin không thay thế chủ yếu ở động vật là metionin, treonin, valin, loxin, izoloxin, acginin, lizin, phenylalanin, triptophan và histidin. Aminogram của vi sinh vật rất khác nhau. Nhiều loại vi khuẩn tùy thuộc nhóm dị dưỡng amin nhưng chỉ đòi hỏi 1-2 loại axit amin nào đó. Trong khi đó có loại vi sinh vật nếu không được cung cấp đủ 17-18 loại axit amin thì không thể phát triển được. Không có các axit amin không thay thế chung cho tất cả các vi sinh vật. Cái là cần thiết với loại vi sinh vật này có thể là hoàn toàn không cần thiết đối với loại vi sinh vật khác.

Đối với đa số các loài vi khuẩn người ta thường nuôi cấy có thành phần như sau :

Pepton	5g
Cao thịt	3g
NaCl	8g
Nước cất	1000 ml

Nếu làm môi trường đặc thì bổ sung thêm 15-20g thạch (tùy theo chất lượng của thạch).

Tuy vậy có những vi sinh vật để nuôi cấy được ta phải chuẩn bị môi trường với rất nhiều thành phần khác nhau. Dưới đây là ví dụ về môi trường dinh dưỡng của vi khuẩn *Leuconostoc citrovorum* :

Nước : 1000ml ; Glucozơ : 25g ; NH_4Cl : 3g
 KH_2PO_4 : 600mg ; K_2HPO_4 : 600mg ; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 200mg
 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 10mg ; $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$: 20mg
 NaCl : 10mg ; Na axetat : 20g ; DL-Alanin : 200mg
L-acginin : 242mg ; L-asparazin : 400mg ; axit L-aspartic : 100mg
L-xistein : 50mg ; axit L-glutamic : 300mg ; Glixin : 100mg
L-histidin-HCl : 62mg ; DL-izoloxin : 250mg
DL-loxin : 250mg ; D-lizin-HCl : 250mg
DL-metionin : 100mg ; Phenynalanin : 100mg
L-prolin : 100mg ; DL-serin : 50mg ; DL-treonin : 200mg
DL-triptophan : 40mg ; L-tirozin : 100 mg ; DL-valin : 250mg
Adenin sunphat H_2O : 10mg ; Guanin-HCl. $2\text{H}_2\text{O}$: 10mg
Uraxin : 10mg ; Xantin - HCl : 10mg ; Tiamin : 0,5mg
Piridoxin-HCl : 1,0mg ; Piridoxamin-HCl : 0,3mg
Piridoxal-HCl : 0,3mg ; Ca pantotenat : 0,5mg ; Riboflavin : 0,5mg
Axit nicotinic : 1,0mg ; APAB : 0,1mg ; Biotin : 0,001mg
Axit folic : 0,01mg

Các đồng phân axit amin dãy D thường không được vi sinh vật hấp thụ. Chúng thường mang độc tính đối với tế bào. Người ta biết các D-axit amin có thể có mặt trong một số loại chất kháng sinh (như gramixidin, polimixin, actonomixin...). Chỉ có một số loại nấm mốc có chứa enzym raxemaza mới có khả năng chuyển hóa D-axit amin thành L-axit amin.

Để tìm hiểu mối quan hệ với axit amin của một chủng vi sinh vật nào đó trước hết người ta cấy chủng vi sinh vật này lên một môi trường dinh dưỡng có nguồn nitơ

duy nhất là muối amon. Nếu chúng phát triển được thì chúng tỏ chúng thuộc nhóm tự dưỡng amin. Nếu chúng không phát triển được và sau khi bổ sung hỗn dịch axit amin (dịch thủy phân casein có trộn thêm triptophan) lại phát triển tốt thì chúng tỏ chúng thuộc nhóm dị dưỡng amin. Nếu bổ sung hỗn dịch axit amin rồi mà chúng vẫn không phát triển được thì phải tìm xem còn những nhu cầu nào khác chưa được đáp ứng (về nguồn cacbon, về vitamin, về chất khoáng, về pH, về thế oxi hóa khử của môi trường).

Muốn biết rõ mối quan hệ của một chủng vi sinh vật với từng loại axit amin riêng biệt, người ta phải sử dụng những môi trường có chứa đầy đủ nguồn thức ăn cacbon, khoáng, vitamin (ở dạng hóa chất tinh khiết) nhưng không chứa axit amin. Lần lượt bổ sung từng loại axit amin vào môi trường và theo dõi ảnh hưởng của chúng đối với sự phát triển của chủng vi sinh vật này. Cũng có thể đưa vào môi trường một hỗn dịch đầy đủ các axit amin và các hỗn dịch đã loại bỏ một cách phân biệt từng axit amin một. Theo dõi sự phát triển của vi sinh vật sẽ xác định được nhu cầu của chúng đối với từng loại axit amin.

Kết quả thực nghiệm trình bày trong bảng dưới đây cho thấy trong số các vi sinh vật dị dưỡng amin tùy loài, thậm chí tùy từng typ khác nhau, mà có những mối quan hệ rất khác nhau đối với các axit amin.

Nói chung các vi khuẩn gây bệnh, vi khuẩn gây thối, vi khuẩn lactic (sống trong sữa)... thường đòi hỏi phải được cung cấp nhiều axit amin có sẵn. Các loài vi khuẩn thường sống trong đất (*Azotobacter*, *Clostridium pasteurianum*, các vi khuẩn tự dưỡng hóa năng...) có khả năng tự tổng hợp tất cả các axit amin cần thiết đối với chúng. Nấm mốc, nấm men và xạ khuẩn cũng thường không đòi hỏi các axit amin có sẵn. Tuy nhiên sự có mặt của các axit amin trong môi trường sẽ làm nâng cao tốc độ phát triển của chúng.

Loại Axit amin	LOẠI SINH VẬT						
	Động vật có vú	<i>Staphy- lococcus</i> gây tan máu	<i>Lacto- bacterium</i> <i>casei</i>	<i>Strepto- coccus</i> <i>faecalis</i>	<i>Corynebacterium</i> <i>diphtheriae</i>		<i>Staphy- lococcus</i> <i>aureus</i>
					HY	PW8	
Lizin	+	+	(+)	+	-	-	-
Acginin	(+)	+	+	+	-	-	-
Histidin	+	+	(+)	-	+	-	-
Phenylalanin	+	+	+	-	+	-	-
Tirozin	-	+	+	(+)	-	-	-
Triptophan	+	+	+	+	+	-	+
Prolin	-	+	-	-	-	-	-
Glixin	-	+	-	+	+	-	-
Alanin	-	+	(+)	+	-	-	-
Valin	+	+	+	-	+	+	-
Lơxin	+	+	+	+	-	+	-
Izolơxin	+	+	(+)	+	-	-	-
Xerin	-	+	+	+	-	-	-
Treonin	+	+	(+)	+	-	-	-
Xixtein	-	+	+	(+)	+	+	-
Metionin	+	+	(+)	-	+	+	+
Axit asparaginic	-	-	+	+	-	-	-
Axit glutamic	-	+	+	+	+	+	-

Ghi chú : + Cần thiết

- Không cần thiết

(+) Có tác dụng kích thích

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

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

Có thể dùng các phương pháp gây đột biến để tạo ra các chủng vi sinh vật "dinh dưỡng khuyết" (hay khuyết dưỡng), tức là những chủng mất đi khả năng tự tổng hợp một chất nào đó, chúng trở nên mẫn cảm với sự có mặt và với nồng độ của chất mà chúng cần thiết (một axit amin, một vitamin hoặc một gốc bazơ nitơ nào đó). Phương pháp phân tích axit amin nhờ vi sinh vật càng ngày càng được ứng dụng rộng rãi trên thế giới. Nó cho phép phát hiện những nồng độ axit amin rất thấp và rất thích hợp trong các trường hợp không thuận tiện sử dụng các phương pháp phân tích hóa lý khác. Bên cạnh các phân tích định lượng (so với đồ thị tiêu chuẩn) các phân tích định tính dùng các vi sinh vật chỉ thị này nhiều khi cũng rất có giá trị. Chẳng hạn như việc sử dụng vi khuẩn chỉ thị mẫn cảm với axit glutamic để phát hiện các khuẩn lạc vi sinh vật phân lập từ thiên nhiên có khả năng sinh tổng hợp axit glutamic.

Dưới đây là phạm vi nồng độ của axit amin mà một số vi khuẩn chỉ thị có khả năng mẫn cảm.

Loại axit amin	Vi khuẩn chỉ thị	Phạm vi nồng độ mẫn cảm (γ/ml)
β -Alamin	<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	0-1,5
Alanin	<i>Streptococcus faecalis</i>	0-50
Lơxin	<i>Streptococcus faecalis</i>	0-10
Izơloxin	<i>Streptococcus faecalis</i>	0-10
Aeginin	<i>Streptococcus faecalis</i>	0-8
Treonin	<i>Streptococcus faecalis</i>	0-50
Valin	<i>Streptococcus faecalis</i>	0-10
Axit asparaginic	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	0-50
Serin	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	0-25
Tirozin	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	0-8
Xixtein	<i>Lactobacillus mesenteroides</i>	0-5
Glixin	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	0-10
Histidin	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	0-5
Lizin	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	0-20
Prolin	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	0-8
Axit glutamic	<i>Lactobacillus arabinosus</i>	0-50
Metionin	<i>Lactobacillus arabinosus</i>	0-10
Phenylalanin	<i>Lactobacillus casei</i>	0-15
Triptophan	<i>Lactobacillus casei</i>	0-2,5

Thành phần các môi trường tổng hợp dùng để định lượng axit amin nhờ vi khuẩn chỉ thị thường khá phức tạp.

4. NGUỒN THỨC ĂN KHOÁNG CỦA VI SINH VẬT

Khi sử dụng các môi trường thiên nhiên để nuôi cấy vi sinh vật người ta thường không cần thiết bổ sung các nguyên tố khoáng. Trong nguyên liệu dùng làm các môi trường này (khoai tây, nước thịt, sữa, huyết thanh, pepton, giá đậu...) thường có chứa đủ các nguyên tố khoáng cần thiết đối với vi sinh vật. Ngược lại khi làm các môi trường tổng hợp (dùng nguyên liệu là hóa chất) bắt buộc phải bổ sung đủ các nguyên tố khoáng cần thiết. Những nguyên tố khoáng mà vi sinh vật đòi hỏi phải được cung cấp với liều lượng lớn được gọi là các nguyên tố đại lượng. Còn những nguyên tố khoáng mà vi sinh vật chỉ đòi hỏi với những liều lượng rất nhỏ được gọi là các nguyên tố vi lượng.

Nồng độ cần thiết của từng nguyên tố vi lượng trong môi trường thường chỉ vào khoảng $10^{-6} - 10^{-8}M$.

Hàm lượng các chất khoáng chứa trong nguyên sinh chất vi sinh vật thường thay đổi tùy loài, tùy giai đoạn phát triển và tùy điều kiện nuôi cấy. Thành phần khoáng của tế bào các loài vi sinh vật khác nhau thường là chênh lệch nhau rất nhiều. Chẳng hạn có nghiên cứu (Mesrobiana và Peuneska, 1963) cho biết thành phần khoáng ở một số vi khuẩn gây bệnh là như sau (% chất khoáng) :

P_2O_5	4,93 - 74,38	Na_2O	0,2 - 28,08
K_2O	2,4 - 39,8	Cl	0,03 - 43,69
SO_3	0,5 - 28,8	MgO	0,12 - 12,0
CaO	0,3 - 14,0		

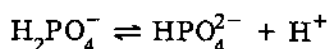
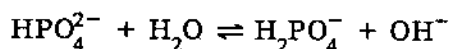
Nhu cầu của vi sinh vật cũng không giống nhau đối với tùy loài, tùy giai đoạn phát triển. Người ta nhận thấy nồng độ cần thiết về các muối khoáng đối với vi khuẩn, nấm và xạ khuẩn thường thay đổi trong các phạm vi sau đây :

Muối khoáng	Nồng độ cần thiết (g/l)	
	Đối với vi khuẩn	Đối với nấm và xạ khuẩn
K_2HPO_4	0,2-0,5	1-2
KH_2PO_4	0,2-0,5	1-2
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,1-0,2	0,2-0,5
$MnSO_4 \cdot 4H_2O$	0,005-0,01	0,02-0,1
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0,005-0,01	0,05-0,02
Na_2MoO_4	0,001-0,005	0,01-0,02
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	-	0,02-0,1
$CoCl_2$	tối 0,03	tối 0,06
$CaCl_2$	0,01-0,03	0,02-0,1
$CaSO_4 \cdot 5H_2O$	0,001-0,005	0,01-0,05

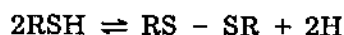
Thành phần môi trường có thể thay đổi theo một sự tính toán nào đó để sao cho nồng độ chung của mỗi cation hoặc mỗi anion phù hợp với số lượng đã nêu lên trong bảng nói trên.

P bao giờ cũng chiếm tỉ lệ cao nhất trong số các nguyên tố khoáng của tế bào vi sinh vật (nhiều khi P chiếm đến 50% so với tổng số chất khoáng). P có mặt trong cấu tạo của nhiều thành phần quan trọng của tế bào (axit nucleic, photphoprotein, photpholipit, nhiều coenzim quan trọng như ADP, ATP, UDP, UTP, XDP, XTP, NAD, NADP, flavin... ; một số vitamin như tiamin, biotin...). Để đảm bảo nguồn dinh dưỡng

photpho, người ta thường sử dụng các loại photphat vô cơ. Việc bổ sung photphat (nhất là photphat kali) vào các môi trường dinh dưỡng ngoài tác dụng cung cấp P còn có tác dụng tạo ra tính đệm của môi trường. Với các tỉ lệ thích hợp hỗn hợp muối KH_2PO_4 và K_2HPO_4 có thể tạo ra những mức pH ổn định trong khoảng pH = 4,5 - 8,0 trong môi trường axit K_2HPO_4 sẽ tạo ra ion H^+ :



S cũng là một nguyên tố khoáng quan trọng trong tế bào vi sinh vật. S có mặt trong một số axit amin (xixtin, xixtein, metionin), một số vitamin (biotin, tiamin...), xixtin, xixtein và một tripeptit là glutation không những tham gia vào cấu trúc protein mà còn có vai trò quan trọng trong các quá trình oxi hóa khử. Việc chuyển nhóm sunphidrin thành nhóm disunphit có vai trò rất lớn trong quá trình chuyển điện tử từ nguyên liệu hô hấp đến oxi phân tử :



Các hợp chất hữu cơ có chứa lưu huỳnh ở dạng oxi hóa thường có tác dụng độc đối với tế bào vi sinh vật (có thể kể tới trường hợp streptoxit và các sunphamit khác). Trong khi đó các muối sunphat vô cơ với nguyên tử lưu huỳnh cũng ở trạng thái oxi hóa thì lại được cơ thể vi sinh vật đồng hóa rất tốt. Một số vi sinh vật có thể dùng cả $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ (tiosunphat) làm nguồn thức ăn lưu huỳnh. Một số vi sinh vật khác lại đòi hỏi các thức ăn chứa lưu huỳnh ở dạng khử (H_2S , xixtin, xixtein...). Fe là nguyên tố rất cần thiết để giúp vi sinh vật có thể tổng hợp một số men loại pocphirin chứa sắt (như xitocrom, xitocromoxidaza, peroxidaza, catataza...). Nguyên tử nitơ của 4 nhân piron nhờ các liên kết hóa học thông thường là các liên kết hóa học phụ. Một số vi sinh vật tự dưỡng quang năng còn sử dụng sắt để tổng hợp ra các sắc tố quang hợp có cấu trúc pocphirin (clorophin, bacterioclorophin).

Mg là nguyên tố được vi sinh vật đòi hỏi cũng với lượng khá cao ($10^{-3} - 10^{-4}\text{M}$). Mg mang tính chất một cofacto, chúng tham gia vào nhiều phản ứng enzym có liên quan đến các quá trình photphoryl hóa (chuyển H_3PO_4 từ một hợp chất hữu cơ này sang một hợp chất hữu cơ khác). Mg^{2+} có thể làm hoạt hóa các hexokinaza, ATP - aza, pirophotphataza, photphopheraza, transaxetylaza, photphoglucomutaza, cacboxylaza, enolaza, các men trao đổi protein, các men oxi hóa khử của chu trình Krebs (tất cả khoảng trên 80 enzym khác nhau). Mg^{2+} còn có vai trò quan trọng trong việc làm liên kết các tiểu phần riboxom với nhau.

Ca mặc dầu là nguyên tố ít tham gia vào việc xây dựng nên các hợp chất hữu cơ nhưng nó có vai trò đáng kể trong việc xây dựng các cấu trúc tinh vi của tế bào. Canxi đóng vai trò cầu nối trung gian giữa nhiều thành phần quan trọng của tế bào sống (như giữa ADN và protein trong nhân, giữa các nucleotit với nhau, giữa ARN và protein trong riboxom). Canxi rất cần thiết đối với việc hình thành các cấu trúc không gian ổn định của nhiều bào quan như riboxom, ti thể, nhân...

Zn cũng là một cofacto tham gia vào nhiều quá trình enzym. Zn có tác dụng đáng kể trong việc hoạt hóa các enzym như cacboanhidraza, enolaza, photphataza kiềm, pirophotphataza, lxxitinaza...

Mn có chứa trong một số enzym hô hấp. Mn cũng có vai trò quan trọng trong việc làm hoạt hóa một số enzym như photphomonoesteraza, cacboxylaza, ATP - aza, hidroxylamin reductaza, acginaza, aminopeptidaza, enolaza, photphoglucomutaza...

Việc hoạt hóa các enzym không phải lúc nào cũng mang tính chất đặc hiệu. Lấy ví dụ như enzym izoxitratliaza (tách từ vi khuẩn *Pseudomonas aeruginosa*) có thể được hoạt hóa bởi nhiều ion khác nhau (Mg^{2+} , Mn^{2+} , Fe^{2+} , hoặc Co^{2+}). Có trường hợp một ion kim loại này lại có tác dụng đối với một ion kim loại khác. Chẳng hạn ion Na^+ có thể làm ức chế sự phát triển của vi khuẩn *Lactobacillus casei* nhưng tác dụng ức chế này có thể bị mất đi nếu bổ sung thêm vào môi trường các ion K^+ chắc rằng đã có sự cạnh tranh giữa hai ion này trong việc liên kết với các enzym hoặc coenzim.

Cũng có những nguyên tố hóa học ta chưa hiểu rõ về vai trò sinh lí của chúng. Trong số các nguyên tố này phải kể đến kali.

K là nguyên tố chiếm một tỉ lệ khá cao trong thành phần khoáng của tế bào vi sinh vật, nhưng cho đến nay người ta chưa thấy kali tham gia vào bất kì thành phần nào của nguyên sinh chất, cũng chưa tìm thấy bất kì enzym nào có chứa K. Người ta nhận thấy kali thường tồn tại trong dạng ion K^+ ở mặt ngoài của cấu trúc tế bào. Nhiều nghiên cứu sử dụng K^{40} cho biết một phần đáng kể kali tồn tại ở trạng thái liên kết hóa lí không bền với protein và các thành phần khác của nguyên sinh chất. Kali có thể tác dụng như các ion kim loại khác thông qua việc ảnh hưởng đến tính chất hóa keo và hoạt động xúc tác của các enzym. Nhưng nhiều thí nghiệm cho biết việc dự định thay thế kali trong môi trường dinh dưỡng bằng các ion kim loại kiềm hóa trị 1 (như Na, Li, Rb, Cs...) đều không có kết quả. Có những tài liệu cho biết kali tham gia vào việc hoạt hóa một số enzym như amylaza, invertaza, photphotransaxetilaza, axetyl CoA-xintetaza, piruvatphotphokinaza, ATP-aza, ketohexokinaza...). Kali làm tăng độ ngậm nước của các hệ thống keo do đó ảnh hưởng đến các quá trình trao đổi chất, nhất là các quá trình tổng hợp. Kali có thể còn tham gia vào quá trình tổng hợp một số vitamin (như tiamin...) và có những ảnh hưởng đáng kể đến quá trình hô hấp của tế bào vi sinh vật.

Na và Cl cũng là các nguyên tố mà nhiều vi sinh vật đòi hỏi với lượng không nhỏ, nhưng cho đến nay người ta vẫn còn biết rất ít về vai trò sinh lí của chúng. Hàm lượng Na và Cl đặc biệt cao trong tế bào các vi sinh vật ưa mặn sống trong nước biển, đất vùng ven biển hoặc sống trên các loại thực phẩm ướp mặn. Các vi sinh vật ưa mặn có thể được chia thành ba nhóm: nhóm ưa mặn ít, thích hợp phát triển trên môi trường chứa 2-5% (khối lượng: thể tích) NaCl, nhóm ưa mặn vừa, thích hợp phát triển trên môi trường chứa 5-20% NaCl và nhóm ưa mặn cao, thích hợp phát triển trên môi trường chứa đến 20-30% NaCl.

Bình thường khi nuôi cấy vi sinh vật, người ta không cần bổ sung các nguyên tố vi lượng. Những nguyên tố này thường có sẵn trong nước máy, trong các hóa chất dùng làm môi trường hoặc có lẫn ngay trong thủy tinh của các dụng cụ nuôi cấy. Trong một số trường hợp cụ thể người ta phải bổ sung các nguyên tố vi lượng vào môi trường nuôi cấy vi sinh vật. Chẳng hạn bổ sung Zn vào các môi trường nuôi cấy nấm mốc, bổ sung Co vào các môi trường nuôi cấy vi sinh vật tổng hợp vitamin B_{12} , bổ sung B và Mo vào môi trường nuôi cấy các vi sinh vật cố định đạm...

Sự tồn tại một cách dư thừa các nguyên tố khoáng là không cần thiết và có thể dẫn đến những ảnh hưởng xấu. Chẳng hạn việc thừa P có thể làm giảm thấp hiệu suất tích lũy một số chất kháng sinh, thừa Fe sẽ làm cản trở quá trình tích lũy vitamin B_2 hoặc vitamin B_{12} .

5. NHU CẦU VỀ CHẤT SINH TRƯỞNG CỦA VI SINH VẬT

Vấn đề một số vi sinh vật muốn phát triển cần phải được cung cấp những chất sinh trưởng nào đó thật ra đã được L. Pasteur phát hiện từ khoảng các năm 1859 - 1864. Pasteur nuôi cấy vi sinh vật trên các môi trường chứa thức ăn cacbon (đường, rượu, axit hữu cơ), muối amon và một số muối khoáng khác. Ông nhận thấy vi sinh vật phát triển rất yếu. Nhưng nếu bổ sung thêm một ít nước chiết các nguyên liệu thiên nhiên vào các môi trường nói trên thì sự phát triển của vi sinh vật sẽ tăng lên rất nhiều.

Năm 1901 Winldiers phát hiện thấy một nấm men muốn phát triển tốt cần phải được cung cấp những chất hữu cơ đặc biệt nào đấy, chứa trong bản thân tế bào nấm men, trong mầm lúa hoặc trong những cơ chất thiên nhiên khác. Ông gọi loại chất hữu cơ này là "Bios" (có nghĩa là "sự sống"). Năm 1904 nhà nghiên cứu người Nga Nikitinskii phát hiện thấy nấm mốc trong quá trình phát triển có thể tiết vào môi trường những chất hữu cơ nào đấy có khả năng làm tăng cường sự phát triển của nấm.

Thực ra từ trước đó Lunin, đã phát hiện thấy chuột bạch muốn phát triển bình thường không những đòi hỏi phải được cung cấp protein, lipit, glucit, muối khoáng mà còn cần tới những chất hữu cơ đặc biệt mà theo ông thì những chất này có chứa trong sữa.

Năm 1912 K. Funk, nhà sinh hóa học người Ba lan, nhận thấy trong cám gạo có chứa một chất hữu cơ có thể dùng để điều trị được bệnh tê phù (beriberi) ở gà. Ông cho rằng những chất này thuộc loại axit amin không thay thế và đặt tên cho chúng là "vitamin" (có nghĩa là các axit amin cần thiết cho sự sống). Thuật ngữ này hiện được sử dụng rộng rãi để chỉ hàng loạt các chất sinh trưởng mặc dầu cho đến nay người ta đều biết rằng vitamin không phải là axit amin, nhiều loại vitamin không có chứa gốc amin nào trong cấu trúc của chúng. Người ta định nghĩa vitamin là những chất hữu cơ ngoại sinh hoàn toàn cần thiết đối với hoạt động sinh sống bình thường của cơ thể người và động vật, mặc dầu cơ thể thường chỉ đòi hỏi cung cấp với một số lượng rất nhỏ. Thiếu bất kì một vitamin nào cơ thể người và động vật đều có thể bị những rối loạn nhất định trong trao đổi chất.

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

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

Tùy thuộc vào khả năng sinh tổng hợp của từng loại vi sinh vật mà cùng một chất có thể là hoàn toàn không cần thiết (nếu vi sinh vật này tự tổng hợp được ra nó) có thể là có tác dụng kích thích sinh trưởng (nếu vi sinh vật nào tự tổng hợp được nhưng nhanh chóng tiêu thụ hết) hoặc có thể là rất cần thiết đối với quá trình sinh trưởng phát triển, giống như là trường hợp các vitamin đối với người và động vật (nếu vi sinh vật này hoàn toàn không có khả năng tự tổng hợp được ra nó).

Như vậy là những chất được coi là chất sinh trưởng của loại vi sinh vật này hoàn toàn có thể không phải là chất sinh trưởng đối với một loại vi sinh vật khác. Hầu như không có chất nào là chất sinh trưởng chung đối với tất cả các loại vi sinh vật.

Đặc điểm của môi trường sống một mặt ảnh hưởng đến khả năng tổng hợp chất sinh trưởng của vi sinh vật, mặt khác ảnh hưởng đến đặc điểm trao đổi chất của chúng. Chính thông qua các ảnh hưởng này mà môi trường sống của từng loại vi sinh vật đã góp phần quyết định nhu cầu của chúng về các chất sinh trưởng. Khi sống lâu dài trong các môi trường thiếu các chất sinh trưởng, vi sinh vật sẽ dần dần tạo ra được khả năng tự tổng hợp các chất sinh trưởng mà chúng cần thiết. Mặt khác do sống trong các điều kiện môi trường khác nhau, các loại vi sinh vật sẽ có thể có những kiểu trao đổi chất khác nhau cũng có nghĩa là đòi hỏi các hệ thống enzym khác nhau (do đó đòi hỏi các chất sinh trưởng khác nhau). Việc một loại vi sinh vật không đòi hỏi một chất sinh trưởng nào đó có thể do hai nguyên nhân : một là vi sinh vật này không tự tổng hợp ra được chất sinh trưởng đó, hai là trong quá trình trao đổi chất của loại vi sinh vật này không có sự tham gia của loại coenzim chứa chất sinh trưởng đó.

Cùng một loài sinh vật nhưng nếu nuôi cấy trong các điều kiện khác nhau cũng có thể có những nhu cầu khác nhau về chất sinh trưởng. Chẳng hạn nấm mốc *Mucor rouxii* được chứng minh là chỉ cần biotin và tiamin khi phát triển trong điều kiện kỵ khí. Khi nuôi cấy trong điều kiện hiếu khí, chúng sẽ tự tổng hợp ra được các chất sinh trưởng này. Điều kiện pH và nhiệt độ của môi trường nhiều khi cũng ảnh hưởng rõ rệt đến nhu cầu và chất sinh trưởng của vi sinh vật. Sự có mặt của một số chất dinh dưỡng khác có khi cũng ảnh hưởng đến nhu cầu và chất sinh trưởng của vi sinh vật. Chẳng hạn việc đòi hỏi axit pantotenic của một số vi sinh vật (ví dụ vi khuẩn bạch hầu *Corynebacterium diphtheriae*) có thể thỏa mãn khi chỉ cần cung cấp cho chúng β - alanin. Chúng có thể tự tổng hợp được axit pantonic mà như chúng ta đã biết axit pantotenic cấu tạo từ axit pantonic và β - alanin.

Theo đề nghị của Shopfer (1938) thì những vi sinh vật nào có thể tự túc về mặt chất sinh trưởng được gọi là các vi sinh vật "tự dưỡng chất sinh trưởng", còn ngược lại những vi sinh vật đòi hỏi phải được cung cấp một hoặc nhiều chất sinh trưởng được gọi là các vi sinh vật "dị dưỡng chất sinh trưởng".

Về sau theo đề nghị của Davis (1950), người ta lại còn dùng thêm một khái niệm khác. Tất cả các vi sinh vật dị dưỡng amin và dị dưỡng chất sinh trưởng được xếp chung vào nhóm "dinh dưỡng chất sinh trưởng" còn tất cả các vi sinh vật có thể phát triển được mà không cần đòi hỏi bất kì một axit amin hoặc một chất sinh trưởng nào thì được xếp vào nhóm "nguyên dinh dưỡng". Trước đây thuật ngữ "nguyên dinh dưỡng" thường được dùng để chỉ các vi sinh vật tự dưỡng hóa năng và các vi sinh vật cố định đạm.

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

Một số gốc kiềm purin không chỉ có mặt trong axit nucleic mà còn có mặt trong nhiều coenzim, chẳng hạn như sự có mặt của adenin trong coenzim A, FAD, FMN, ATP, ADP, NAD, NADP, S-adenozimmetionin, axiladenilat, sự có mặt của uraxin trong UDP, của xitozin trong XDP, của guanin trong GDP...

Nhu cầu về các gốc kiềm purin và pirimidin không giống nhau đối với các loại vi sinh vật khác nhau. Phản ứng dương tính đối với các chất này thường thấy ở nguyên sinh động vật, nhiều vi khuẩn gây bệnh, vi khuẩn lactic, nấm kí sinh... Nồng độ thích hợp của các chất này đối với vi sinh vật thường vào khoảng 5 - 20 γ /ml (trong khi nồng độ vitamin thường chỉ cần vào khoảng 0,1 - 0,5 γ /ml). Chúng ta biết rằng tỉ lệ các gốc kiềm purin và pirimidin trong tế bào vi sinh vật thường chiếm đến 5 - 20% tính theo khối lượng khô.

Một số vi sinh vật không tổng hợp lấy được nucleotit từ các gốc kiềm purin và pirimidin có sẵn trong môi trường. Chúng đòi hỏi phải được cung cấp một số nucleozit (nhiều loài trong các giống *Thermobacterium*, *Lactobacillus*), đôi khi đòi hỏi phải cung cấp sẵn cả một số nucleotit (một số loài trong các giống *Gaffkya*, *Mycoplasma*, *Tetrahymena*...). Nồng độ nucleozit và nucleotit mà chúng yêu cầu thường khá cao (khoảng 200 - 2000 γ /ml).

Có những chất được coi là chất sinh trưởng đối với một số vi sinh vật (*mycoplasma*, nguyên sinh động vật, một số vi khuẩn) vì những chất này tham gia vào thành phần của thành tế bào mà các vi sinh vật đó không tự tổng hợp được ra chúng (S.H. Hutner, G.G. Holtz, 1962). Chẳng hạn *Mycoplasma mycoides* thường đòi hỏi phải được cung cấp glixerin, nhiều loại khác đòi hỏi các axit béo với chuỗi cacbon khá dài. Nói chung nhu cầu về axit béo của *Mycoplasma* và nguyên sinh động vật thường là không đặc hiệu, nghĩa là có thể cung cấp bất kì axit béo nào thuộc loại bão hòa hoặc chưa bão hòa. Một số xạ khuẩn (như *Actinomyces israeli*) đòi hỏi axit oleic. Nấm thường ít đòi hỏi các axit béo mạch dài nhưng có một số nấm men (như *Pityrosporum ovale*) muốn phát triển cần phải được cung cấp các axit béo 14C hoặc 16C. Một số vi khuẩn sống trong dạ cỏ trâu, bò đòi hỏi phải có sẵn một số các axit béo mạch ngắn.

Nhiều *Mycoplasma* đòi hỏi phải được cung cấp cả một số xterin với các mạch bên có cấu tạo xác định. Nhiều loại nguyên sinh động vật cũng đòi hỏi các xterin có cấu trúc đặc hiệu.

Inozit và colin tham gia vào thành phần photpholipit của màng tế bào do đó cũng là chất sinh trưởng đối với một số loại vi sinh vật. Chúng thường cần các chất này với nồng độ trong môi trường vào khoảng 10-20 γ /ml ; Chẳng hạn mezoinozit là chất sinh trưởng của nhiều loại nấm men, còn colin là chất sinh trưởng của một số chủng *Diplococcus pneumoniae*.

Một số vi sinh vật (như *Haemophilus parainfluenzae*, *Neisseria perflava*) đòi hỏi phải có các chất sinh trưởng thuộc loại diamín và poliamin để hoạt hóa riboxom. Đó là các chất xpermin, xpermidin, putrisin. Chúng thường được các vi sinh vật này đòi hỏi với nồng độ trong môi trường khoảng 2 - 10 γ /ml.

Từ khi phát sinh ra "men hô hấp vàng" (Warburg và Christian, 1932) mà coenzim được xác định là riboflavin photphat, người ta đã chú ý rất nhiều đến việc nghiên cứu cơ chế tác dụng của các vitamin. Ngày nay người ta đã xác định thấy rất nhiều các vitamin tan trong nước, tham gia vào thành phần coenzim của các enzym và nhờ đó chúng có vai trò rất lớn trong các quá trình trao đổi chất. Vai trò của các vitamin tan trong lipid đối với các chuyển hóa trong cơ thể sinh vật được biết đến ít hơn.

Trong số các vi sinh vật dị dưỡng chất sinh trưởng thì cũng tùy từng loại mà có những nhu cầu khác nhau đối với từng vitamin.

Đã có không ít các tài liệu nghiên cứu nhằm làm sáng tỏ cơ chế, tác dụng của từng loại vitamin trong các hoạt động trao đổi chất ở cơ thể sống.

Nhiều vitamin có vai trò quan trọng trong quá trình oxi hóa khử. Ví dụ riboflavin tham gia vào enzym flavin, nicotinamit tham gia vào enzym piridinhidrogenaza, axit ascohic cũng có tác dụng như một hệ oxi hóa khử, còn biquinon (có cấu trúc gần gũi với vitamin E) được chứng minh là tham gia vào việc chuyển electron giữa flavoprotein và xitocrom C.

Nhiều vitamin có vai trò quan trọng trong quá trình hoạt hóa các axit amin. Chẳng hạn piridoxin tham gia vào nhiều enzym decarboxylaza axitamin và nhiều enzym trasaminaza. Phản ứng đồng phân hóa axit glutamic thành axit β -metylasparaginic và phản ứng đồng phân hóa axit xucxinic thành axit metilamalonic có sự tham gia của các coenzim cobamit.

Coenzim A (cấu tạo bởi axit adenilic, axit photphoric, xiteamin và axit pantotenic) có vai trò quan trọng trong việc chuyển gốc axetyl, chúng còn tham gia vào quá trình benzoyl hóa glixin thành axit hiuric.

Chuyển gốc cacbon. Tiamin tham gia vào enzym decarboxylaza piruvic và các decarboxylaza của α - ketoaxit khác. Biotin tham gia vào coenzim của phản ứng β -cacboxyl hóa (có vai trò quan trọng trong chu trình Krebs). Axit folic tham gia vào nhiều coenzim quan trọng như focmiltetrahydrofolic (có tác dụng chuyển focmin khi tổng hợp purin), metilentetrahydrofolic (có tác dụng chuyển hidroximetyl, ví dụ chuyển glixin thành xerin, chuyển axit dezoxiuridilic thành axit timidilic). Nhiều vitamin tham gia vào các coenzim có vai trò quan trọng trong việc thực hiện các phản ứng của quá trình quang hợp (chẳng hạn các coenzim piridinnucleotit, flavinnucleotit, axit tiocianic).

Một số vi sinh vật (các chủng tự nhiên hoặc các chủng có được do gây đột biến) không có khả năng tự tổng hợp ra những vitamin nhất định nhưng lại rất cần tới sự có mặt của các vitamin này. Một số chủng có mức độ phát triển tỉ lệ thuận với nồng độ của những vitamin nhất định trong môi trường. Người ta đã sử dụng chúng để định lượng các vitamin này. Phương pháp định lượng vitamin bằng vi sinh vật có những ưu điểm đáng kể. Một mặt nó cho phép xác định được cả những nồng độ vitamin rất nhỏ, xác định được cả những lượng vật mẫu rất ít và mặt khác trong nhiều trường hợp cho phép phân biệt được những loại "vitamin thật" (có hoạt tính sinh học) với những "vitamin giả" có cấu trúc tương tự.

Dưới đây là bảng kê một số vi sinh vật có thể dùng để định lượng vitamin và phạm vi nồng độ vitamin thích hợp khi tiến hành phân tích bằng phương pháp này.

Loại vitamin	Vi sinh vật chỉ thị	Phạm vi nồng độ vitamin trong mẫu phân tích (lượng chứa trong 1ml)
(1)	(2)	(3)
1 - Tiamin (vitamin B ₁)	<i>Staphylococcus aureus</i>	0-0,5 my ^(*)
	<i>Lactobacillus fermenti</i>	
	ATCC 9338	0-5 my
	<i>Lactobacillus viridescens</i>	
	ATCC 12706	0-0,01 y
	<i>Streptococcus S20B</i>	0-0,2 my
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	
	ATCC 77.53	0-0,3 my
	<i>Endomyces vernalia</i>	0-0,1 y
	<i>Phycomyces blakesleeanus</i>	0-0,01 y
	<i>Phytophthora cinnamomi</i>	0-1,25 my

(*) my (miligamma = ng (nanogam) = 10^{-3} y = 10^{-9} g

(1)	(2)	(3)
2 - Riboflavin (vitamin B ₂)	<i>Lactobacillus casei</i> ATCC 7469	0-0,15 γ
3 - Axit pantotenic (vitamin B ₃)	<i>Lactobacillus casei</i> ATCC 7469	0-02 γ
	<i>Lactobacillus arabinosus</i>	0-0,02 γ
	<i>Lactobacillus plantarum</i> ATCC 8014	0-2,5 γ
	<i>Proteus morganii</i> ATCC 8091	0-0,5 γ
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> hoặc	
	<i>Saccharomycodes ludwigii</i>	0-0,4 γ
	<i>Saccharomyces carlsbergensis</i> ATCC 9080	0-0,04 γ
	<i>Neurospora crassa</i> N. 5531	0-1 γ
4 - Axit nicotinic	<i>Acetobacter suboxydans</i>	0-3 γ
	<i>Proteus vulgaris</i> 19 hay HX. 19	0-0-3 γ
	<i>Lactobacillus arabinosus</i> 17-5	0-0,1 γ
	<i>Lactobacillus plantarum</i> ATCC 8014	0-0,1 γ
	<i>Shigella paradysenteriae</i>	0-0,05 γ
	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> ATCC 9135	0-0,05 γ
	<i>Torula cremoris</i> ATCC 2512	0-0,2 γ
5 - Piridoxin	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	0-0,02 γ
	<i>Neurospora sitophila</i> ATCC 9276	0-0,25 γ
	<i>Saccharomyces carlsbergensis</i> ATCC 9080	0-0,1 γ
	<i>Saccharomycodes ludwigii</i>	0-0,2 γ
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	0-0,01 γ
	<i>Lactobacillus casei</i>	0-0,4 my
	<i>Streptococcus faecalis</i>	0-1,0 my
	<i>Ophiostoma multiannulatum</i>	0-1,0 my
6 - Axit folic	<i>Streptococcus faecalis</i> ATCC 8043	0-0,016 γ
	<i>Lactobacillus casei</i> ATCC 7469	0-10 my
	<i>Clostridium acetobutylicum</i>	0-0,1 my
7 - Axit p-aminobenzoic (APAB, vitamin B ₁₀)	<i>Lactobacillus arabinosus</i>	0-0,15 my
	<i>Acetobacter suboxydans</i> ATCC 621	0-0,05 my
8 - Biotin (vitamin H, B ₇)	<i>Clostridium butylis</i> 21	0-0,01 my
	<i>Lactobacillus casei</i>	0-0,1 my
	<i>Lactobacillus arabinosus</i> ATCC 17-5	0-0,1 my
	<i>Lactobacillus plantarum</i> ATCC 8014	0-0,2 my
	<i>Neurospora crassa</i> N. 34486	0-0,1 my
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 7754	0-0,1 my
9 - Vitamin B ₁₂ (xianocobalamin)	<i>Escherichia coli</i> 113-3	0-0,2 my
	<i>Escherichia coli</i> M-200	0-0,05 my
	<i>Lactobacillus leichmannii</i> ATCC 7830	0-0,05 my
	<i>Lactobacillus leichmannii</i> ATCC 4797	0-0,08 my
	<i>Ochromonas methamensis</i> ATCC 11532	0-0,05 my
	<i>Euglena gracilis</i> ATCC 12715	0-0,08 γ
	<i>Lactobacillus lactis</i> ATCC 8000	0-05 γ
10 - Inozit (vitamin B ₈)	<i>Saccharomyces carlsbergensis</i> ATCC 9774	0-0,8 γ
11 - Colin (vitamin B ₄)	<i>Neurospora crassa</i> ATCC 9277	0-0,05 γ
12 - Nixin	<i>Lactobacillus plantarum</i> ATCC 8014	0-50 my

Ngoài các vi sinh vật chỉ thị mất cảm cao với một số loại vitamin kể trên trong thiên nhiên còn rất nhiều các vi sinh vật khác muốn phát triển bình thường cũng cần phải được cung cấp một hoặc nhiều loại vitamin khác nhau. Có thể kể tới một số ví dụ sau đây: Nhiều loài *Leptospira*, *Staphylococcus* cần vitamin B₁. *Clostridium tetani* (trực khuẩn uốn ván), vi khuẩn lactic cần vitamin B₂. Vi khuẩn lactic, vi khuẩn axetic, nhiều loài *Clostridium*, nấm men cần axit pantotenic. Một số *Pneumococcus* (phế cầu khuẩn) cần colin. *Staphylococcus aureus* (tụ cầu vàng), *Shigella flexneri* (trực khuẩn lỵ Flexne) *Corynebacterium diphtheriae* (trực khuẩn bạch hầu) *Salmonella paratyphi* (trực khuẩn phó thương hàn) một số loài *Pasteurella*, *Pneumococcus* cần vitamin PP. Nhiều loại *Streptococcus*, *Clostridium* và vi khuẩn lactic cần vitamin B₆. Một số loài nấm men và

vi khuẩn lactic cần biotin. Nhiều loài *Clostridium* và vi khuẩn lactic cần axit folic. *Pneumococcus*, *Meningococcus* (cầu khuẩn viêm màng não), *Shigella* (trực khuẩn lị) cần axit paraaminobenzoic. Nhiều *Leptospira* và vi khuẩn lactic cần vitamin B₁₂. Vitamin C có khả năng kích thích sự phát triển của *Clostridium tetani*, *Clostridium perfringens* kích thích sự lên men của vi khuẩn lactic. Vitamin K được biết là cần thiết đối với sự phát triển của *Mycobacterium paratuberculosis* (trực khuẩn pho lao)...

Mặt khác người ta nhận thấy rằng rất nhiều vi sinh vật có khả năng tổng hợp vitamin. Sinh khối vi sinh vật thường chứa hầu hết các loại vitamin chủ yếu với những hàm lượng khá cao.

Nhìn chung sinh khối nấm men thường chứa nhiều vitamin hơn so với sinh khối các loại vi sinh vật khác. Mặt khác nấm men lại có hàm lượng protein cao (48 - 52%) và có tốc độ sinh sôi nảy nở rất nhanh. Chính vì những lí do này mà từ lâu người ta đã xây dựng các nhà máy nhằm sản xuất sinh khối vitamin dùng làm thức ăn bổ sung cho người và gia súc, gia cầm.

Sản lượng men gia súc (nấm men dùng để nuôi gia súc, gia cầm) tăng lên rất nhanh chóng ở hầu hết các nước có công nghiệp phát triển. Chỉ tính riêng ở Liên Xô (cũ) sản lượng men gia súc (đi từ nguyên liệu thực vật) năm 1965 là 93.000 tấn, năm 1966 là 124.600 tấn, năm 1970 : 260.500 tấn, năm 1971 : 314.200 tấn. Quy mô của việc sản xuất men càng được nhân lên nhanh chóng sau khi các nhà khoa học nghiên cứu thành công việc sản xuất sinh khối nấm men đi từ các phụ phẩm của công nghiệp dầu hỏa.

Người ta đã kiểm tra thấy trong 1kg men gia súc sản xuất ở Liên Xô (cũ) có chứa khoảng 13 - 18mg tiamin, 20 - 40mg riboflavin, 60 - 100mg axit pantotenic và nhiều vitamin khác. Tế bào nấm men có chứa khá nhiều ecgosterin (tiền vitamin D). Sau khi xử lí bằng tia tử ngoại ecgosterin sẽ chuyển biến thành ecgocaxiferon (vitamin D₂). Một số phân tích cho biết trong mỗi gam nấm men gia súc khô đã chiếu tia tử ngoại thường chứa đến 10.000 - 20.000 đơn vị quốc tế vitamin D₂.

Các sản phẩm lên men (rượu, bia, bánh mì, bánh bao...) và các loại dược phẩm chế tạo từ men bia khô đều chứa phong phú vitamin. Việc nghiên cứu để sản xuất các loại "thịt nhân tạo" dùng cho người từ sinh khối nấm men cũng có những triển vọng rất lớn.

Người ta đã sử dụng thành công một số loại vi sinh vật để sản xuất ở quy mô công nghiệp một số loại vitamin tinh khiết dùng trong y học. Đáng chú ý nhất là axit ascobic (vitamin C), riboflavin (vitamin B₂), xianocobalamin (vitamin B₁₂) và ecgocaxiferon (vitamin D₂).

Việc oxi hóa socbit thành socbozơ là một giai đoạn quan trọng của công nghiệp sản xuất vitamin C. Để có socbit người ta đem tinh bột thủy phân bằng axit thành D-glucosơ. Sau đó đưa niken ở dạng khử vào dung dịch chứa 40 - 50% glucosơ. Tiến hành thổi khí hidro ở điều kiện áp suất cao (150 - 175atm) để khử glucosơ thành socbit (D-gluxit). Loại bỏ niken rồi dùng phương pháp trao đổi ion để tách socbit ra. Muốn chuyển hóa socbit thành socbozơ người ta phải sử dụng khả năng oxi hóa của loài vi khuẩn *Acetobacter suboxydans*. Khi đó socbit sẽ bị oxi hóa thành L-socbozơ. Tiếp đó thông qua một loạt các xử lí hóa học khác L-socbozơ sẽ chuyển hóa thành axit ascobic.

Có thể sử dụng phương pháp lên men bề mặt hoặc lên men chìm để chuyển hóa socbit thành socbozơ. Quá trình lên men bề mặt đòi hỏi khoảng 7 ngày. Khi đó có khoảng 80 - 90% socbit được chuyển hóa thành socbozơ. Nếu tiến hành lên men chìm trong điều kiện có áp suất không khí cao thì quá trình này có thể rút ngắn lại rất nhiều. Một số nhà nghiên cứu Anh (Wells, Stubbs...) cho biết khi lên men dung dịch socbit 10% dưới áp lực không khí là 2,1 atm sẽ thu nhận được socbozơ với hiệu suất là 98% so với hiệu suất lý thuyết ngay sau khi bắt đầu lên men khoảng 14 giờ. Với dung dịch socbit 20% thời gian lên men cần khoảng 24 giờ, còn với dung dịch socbit 29% thì cần khoảng 40 giờ. Môi trường lên men chìm thường được sử dụng là môi trường có chứa khoảng 10 - 25% socbit ; 0,5% cao ngô (50% chất khô) và 0,1% chất khử bọt. Lượng cấy giống là 3% (theo thể tích) và nhiệt độ lên men là 30 - 35°C.

Nhiều vi sinh vật có khả năng tổng hợp riboflavin. Trong mỗi gam sinh khối nấm men (tính theo khối lượng khô) thường có đến 40 - 120 riboflavin. Nấm men thuộc chi *Candida* (*C. guillemondii*, *C. flareri*...) thường chứa khá nhiều riboflavin. Trong những điều kiện nuôi cấy thích hợp chúng có thể tích lũy được đến 500 - 600γ riboflavin/g sinh khối khô. Một số vi khuẩn cũng có khả năng tích lũy riboflavin ở mức độ thấp hơn (mỗi g chất khô của *Bacillus subtilis* có thể chứa khoảng 7,5γ riboflavin, còn của *Clostridium butyricum* khoảng 90γ).

Loại vi sinh vật có khả năng tổng hợp riboflavin cao nhất là hai loại nấm *Eremothecium ashbyii* và *Ashbya gossypii*. Những loại nấm này nguyên là các loại nấm kí sinh gây bệnh ở cây bông. Massey là người đầu tiên phân lập được *E. ashbyii* ở Xudăng còn Ashby và Nowell là những người đầu tiên phân lập được *A. gossypii* ở quần đảo Tây Ấn độ).

Hai loại nấm này có đặc điểm hình thái khá giống nhau nhưng có nhiều đặc điểm sinh lý khác nhau. *E. ashbyii* có thể phát triển tốt trên các môi trường tổng hợp. Chúng có khả năng đồng hóa nhiều loại đường khác nhau, có khả năng sử dụng đạm vô cơ. *A. gossypii* không đồng hóa được đạm vô cơ và ri đường. Chúng đòi hỏi các loại đường glucosơ, maltozơ hoặc saccarozơ ở dạng khá tinh khiết và đòi hỏi các nguồn đạm hữu cơ như pepton, cao ngô, cao nấm men...

Hai loại nấm này có thể phát triển trong những biên độ khá rộng, nhưng nhiệt độ thích hợp nhất để tổng hợp riboflavin là 26 - 28°C. *E. ashbyii* thích hợp riboflavin ở điều kiện pH = 5,5 - 6,0 còn *A. gossypii* ở điều kiện pH = 6,0 - 7,0.

Trên những môi trường thích hợp các loại nấm này có khả năng tích lũy một lượng riboflavin rất cao (đến 4,5 - 5 g/lít). Khả năng sinh tổng hợp riboflavin của *E. ashbyii* thường cao hơn *A. gossypii*.

Ngoài việc sử dụng các nấm này để sản xuất các chế phẩm riboflavin tinh khiết dùng trong y học, người ta còn dùng chúng để tạo ra các chế phẩm thô dùng trong chăn nuôi. Chế phẩm riboflavin thô sản xuất ở Liên xô (cũ) có dạng bột vàng, độ ẩm 8 - 9%, protein thô 20% và có hàm lượng riboflavin là 10 mg/g.

Vitamin B₁₂ hầu như chỉ được tổng hợp nhờ vi sinh vật. Đã có đủ cơ sở để khẳng định rằng toàn bộ số lượng vitamin B₁₂ chứa trong cơ thể người và động vật, hoặc chứa trong đất, trong nước, trong bùn, trong phân chuồng... đều có nguồn gốc vi sinh vật.

Những tảo có khả năng tổng hợp vitamin B₁₂ thường thuộc nhóm, tảo nâu hoặc tảo đỏ. Nhiều vi khuẩn lam cũng có khả năng này. Nhiều tác giả cho rằng vitamin B₁₂ tìm thấy ở tảo có thể không phải là do tảo tổng hợp ra mà là được sinh ra từ loại vi khuẩn sống trên bề mặt các tảo này.

Khuẩn ti xạ khuẩn chứa khá nhiều vitamin B₁₂. Ngày nay người ta đã thu nhận và sử dụng rộng rãi trong chăn nuôi các chế phẩm vitamin B₁₂ thô đi từ bã khuẩn ti xạ khuẩn của các nhà máy sản xuất chất kháng sinh. Chế phẩm Biovit-40 đi từ khuẩn ti của loài *A. aureofaciens* có chứa khoảng 35 - 40% protein, 7 - 10% lipit, 8 - 9% muối khoáng và trong mỗi gam chế phẩm có khoảng 40.000 đơn vị clotetraxilin (biomixin), cùng với khoảng 10 - 15 γ vitamin B₁₂. Ngoài Biovit-40, ở Liên Xô (cũ) và ở nhiều nước còn có những chế phẩm thô khác vừa chứa chất kháng sinh, vừa chứa vitamin. Chẳng hạn như chế phẩm propomixelin làm từ khuẩn ti của loài *A. collinus* (sinh colinomixin) hoặc chế phẩm eritromixel làm từ khuẩn ti của loài *A. erythreus* (sinh eritromixin).

Nhóm vi khuẩn metan cũng có khả năng tích lũy khá nhiều vitamin B₁₂. Người ta cho lên men bã rượu (hoặc bã của các nhà máy sản xuất axetonbutanol) bằng nhóm vi khuẩn metan sau đó sản xuất ra một loại chế phẩm thô có đặc khá giàu vitamin B₁₂. Ở Liên Xô (cũ) chế phẩm này có tên gọi là chế phẩm KMB-12. Mỗi gam chế phẩm này có chứa tới 25γ vitamin B₁₂; 70γ axit folic, 5000γ coli, 50γ, vitamin B₂; 90γ axit nicotinic; 125γ axit pantotenic...

Nhiều loại vi khuẩn lactic có khả năng tổng hợp vitamin B₁₂. Chính vì vậy cho nên mặc dù thực vật không chứa vitamin B₁₂ nhưng sau khi ủ chua lại thấy chứa khá nhiều loại vitamin này khoảng 5 - 10 γ trong mỗi kg thức ăn thực vật tươi (Iu.I. Ralskaia, 1963). Lượng vitamin B₁₂ sẽ tăng lên rõ rệt nếu thức ăn trước khi ủ chua được bổ sung thêm một ít coban (0,1mg%).

Loại vi khuẩn có khả năng tổng hợp vitamin B₁₂ mạnh mẽ nhất là một số loài vi khuẩn thuộc chi *Propionibacterium* (điển hình nhất là loài *P. shermanii*). Ngày nay người ta đã sử dụng loại vi khuẩn này một cách rộng rãi để sản xuất ở quy mô công nghiệp chế phẩm vitamin B₁₂ tinh khiết dùng trong y học. Để phục vụ chăn nuôi người ta còn sử dụng dịch ép cá (phụ phẩm của các nhà máy sản xuất bột cá) để nuôi cấy vi khuẩn *P. shermanii* và sản xuất ra một loại chế phẩm thô chứa khoảng 400.000 - 1.000.000γ vitamin B₁₂/kg.

Tiền vitamin D (ecgoxterin) là chất dưới tác động của tia tử ngoại sẽ được chuyển hóa thành vitamin D₂ (ecgocanzipherol). Ecgoxterin chứa phong phú trong tế bào nhiều loại nấm, nhất là nấm men. Các vi sinh vật khác (như vi khuẩn, nguyên sinh động vật) thường chứa rất ít ecgoxterin.

Ecgoxterin là loại xterin chủ yếu của nấm. Các loại xterin khác (như dihydro - ecgoxterin, zimoxterin, epixterin, hipoxterin, ascoxterin, phecoxterin...) chỉ chiếm khoảng 10 - 14% so với tổng số xterin trong tế bào. Hàm lượng ecgoxterin ở nhiều loài thuộc chi *Saccharomyces* (*S. cerevisiae*, *S. carlsbergensis*, *S. oviformis*) thường khá cao (trên 2% tính theo khối lượng khô). Hàm lượng ecgoxterin ở các chi *Endomyces*, *Nadosnia*, *Mycoderma*, *Zygosaccharomyces* thường chỉ vào khoảng 0,2 - 0,3%. Chúng men bia *Saccharomyces carlsbergensis* 10 D (của Liên Xô cũ) có hàm lượng ecgoxterin đạt đến 3 - 3,5%. Các loại nấm *Candida* thường dùng để sản xuất sinh khối protein cũng là những loài có chứa không ít ecgoxterin. Một gam nấm men gia súc sản xuất ở nhiều nước sau khi được xử lý bằng tia tử ngoại có thể chứa tới 10.000 - 20.000 đơn vị quốc tế vitamin D₂.

Nấm mốc thuộc các giống *Aspergillus* và *Penicillium* cũng chứa khá nhiều ecgoxterin. Người ta đã nghiên cứu quy trình tách ecgoxterin từ bã khuẩn ti *Aspergillus niger* của nhà máy sản xuất axit limonic hoặc từ bã khuẩn ti *Penicillium chrysogenum* của nhà máy sản xuất penixilin.

Về mặt sinh lí một số nghiên cứu cho biết nấm men nuôi cấy trong điều kiện hiếu khí chứa một lượng ecgoxterin nhiều hơn gấp 10 lần so với khi nuôi cấy trong điều kiện kỵ khí. Các hợp chất kích thích quá trình hình thành ecgoxterin ở nấm men là glucosơ, saccarozơ, axit piruvic, etanol và axetat. Các chất kim hãm hô hấp (như acriflavin, cloramphenicol) cũng sẽ ức chế việc tổng hợp ecgoxterin.

6. CƠ CHẾ VẬN CHUYỂN CÁC CHẤT DINH DƯỠNG VÀO TẾ BÀO VI SINH VẬT

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

Theo cơ chế khuếch tán thụ động các phân tử đi qua màng nhờ sự chênh lệch nồng độ (trong trường hợp các chất không điện phân) hay chênh lệch điện thế (trong trường hợp các ion) ở 2 phía của màng. Hàng loạt nghiên cứu đã khẳng định trừ nước ra rất ít hợp chất có thể qua màng theo cơ chế nói trên. Trái lại đa số các chất hòa tan qua màng do tác dụng của các cơ chế vận chuyển đặc biệt : những phân tử vận chuyển sắp xếp trong màng liên kết với các phân tử chất hòa tan rồi chuyển chúng vào bề mặt bên trong của màng : từ đây các phân tử chất hòa tan được chuyển vào tế bào chất. Kiểu khuếch tán này được gọi là khuếch tán xúc tiến. Các phân tử protein vận chuyển (carrier protein) nói trên gọi là protein thấm - pecmeaza (Rickenberg, Cohen, Buttin, Monod, 1956). Bản chất protein của các pecmeaza đã được khẳng định bởi các dẫn chứng sau đây :

- Việc tổng hợp pecmeaza thường được cảm ứng hoặc bị kiểm chế theo cùng một cách như tổng hợp một số men.
- Cloramphenicol ức chế tổng hợp protein cũng ức chế quá trình tổng hợp pecmeaza.
- Hàng loạt protein màng mang tính chất của pecmeaza đã được tách ra.

Tế bào vi sinh vật có khả năng tổng hợp một lượng lớn các pecmeaza của axit amin và hidrat cacbon. Tuy nhiên, nếu các hệ thống vận chuyển này đều được tổng hợp thường xuyên theo kiểu cấu trúc thì tế bào sẽ hết sức phí phạm về vật chất và năng lượng. Do đó ta không lấy làm lạ là nhiều pecmeaza được tổng hợp theo kiểu cảm ứng hoặc kiểm chế. Ngoài protein thấm còn có enzym vận chuyển.

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

Tuy nhiên vi sinh vật có khả năng tích lũy một số chất với nồng độ cao hơn nhiều so với nồng độ bên ngoài. Chẳng hạn nồng độ K^+ bên trong một số tế bào vi sinh vật có thể lớn hơn nồng độ bên ngoài hàng ngàn lần. Để đảm bảo độ trung hòa điện tế bào cũng đồng thời phải thải ra bên ngoài các ion H^+ hoặc Na^+ . Thêm vào đó, người ta đã phát hiện thấy ở các màng vi khuẩn có hoạt tính của ATP-aza (adenozin trifosfataza) là men có liên quan đến việc vận chuyển các chất. Rõ ràng trong tế bào vi sinh vật ngoài cơ chế vận chuyển thụ động còn tồn tại cơ chế vận chuyển chủ động nhờ pecmeaza. Sự vận chuyển này được tiến hành ngược với gradien nồng độ, nghĩa là theo kiểu "ngược dòng"; năng lượng tiêu thụ có lẽ do ATP (hình thành trong mezoxom hoặc màng tế bào chất) cung cấp. Trong sự vận chuyển thụ động P được di động thuận nghịch hoặc ở dạng đơn độc (P) hoặc ở dạng phức hợp với S (PS); hướng di chuyển của S phụ thuộc vào nồng độ của nó ở hai phía màng tế bào. Trong sự vận chuyển chủ động có ATP cung cấp năng lượng P bị chuyển thành dạng P_i bất hoạt ở phía bên trong màng có ái lực rất thấp đối với S. Sau khi S được tách khỏi phức hợp PS và được chuyển vào tế bào chất P_i lại được chuyển thành P hoạt động ở phía ngoài của màng nhờ một phản ứng cung cấp năng lượng nào đó.

Cần nói thêm rằng theo mẫu ở hình trên thì cùng một pecmeaza có thể đảm nhận cả chức phận vận chuyển thụ động lẫn chủ động (tùy theo sự có mặt hay vắng mặt của ATP) và phản ứng cung cấp năng lượng nhờ ATP diễn ra ở phía trong của màng, tuy nhiên đây mới chỉ giả thuyết.

Cho tới nay người ta đã phân lập được hàng loạt protein vận chuyển trong các loài vi sinh vật. Giống như enzym, chúng có tính đặc hiệu cơ chất khác nhau. Một số có tính đặc hiệu hầu như tuyệt đối. Chẳng hạn pecmeaza của galactozơ ở *E. coli* chỉ vận chuyển galactozơ. Các pecmeaza của các đường và axit amin khác thể hiện tính đặc hiệu yếu hơn đối với các chất hòa tan. Điều đáng chú ý là trong vi khuẩn sự vận chuyển chủ động của hầu hết các đường phụ thuộc vào quá trình photphoryl hóa. Năm 1964 Kundig phân lập được một hệ thống photphototransferaza từ *E. coli*. Thí nghiệm của nhiều tác giả cho biết hệ thống này đảm nhận sự vận chuyển của hầu hết đường trong vi khuẩn. Hệ thống photphototransferaza bao gồm hai men (E_I và E_{II}) và một protein vận chuyển bền nhiệt (HPr) có khối lượng phân tử thấp. Các thành phần protein của hệ thống này đã được thuần khiết và phản ứng diễn ra theo hai bước.

Trước hết E_I chuyển photphat từ photphoenolpiruvat (PEP) đến HPr :



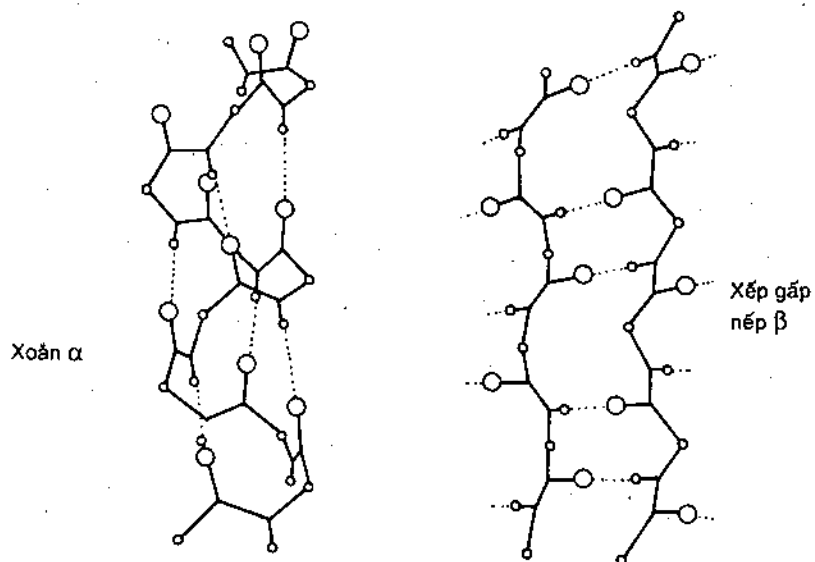
Sau đó E_{II} chuyển photphat từ HPr-P đến C-6 của đường đơn.

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

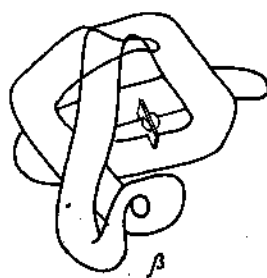
Việc phát hiện ra hệ thống photphototransferaza lần đầu tiên cung cấp cho ta một ví dụ về mối liên quan giữa vận chuyển đường và hệ thống sản sinh năng lượng trong tế bào.



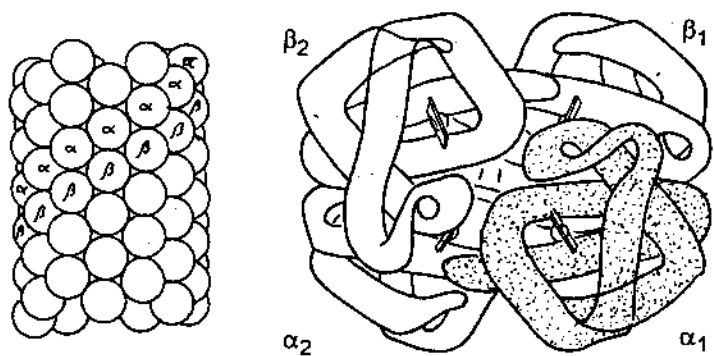
Cấu trúc bậc I của protein



Cấu trúc bậc II của protein

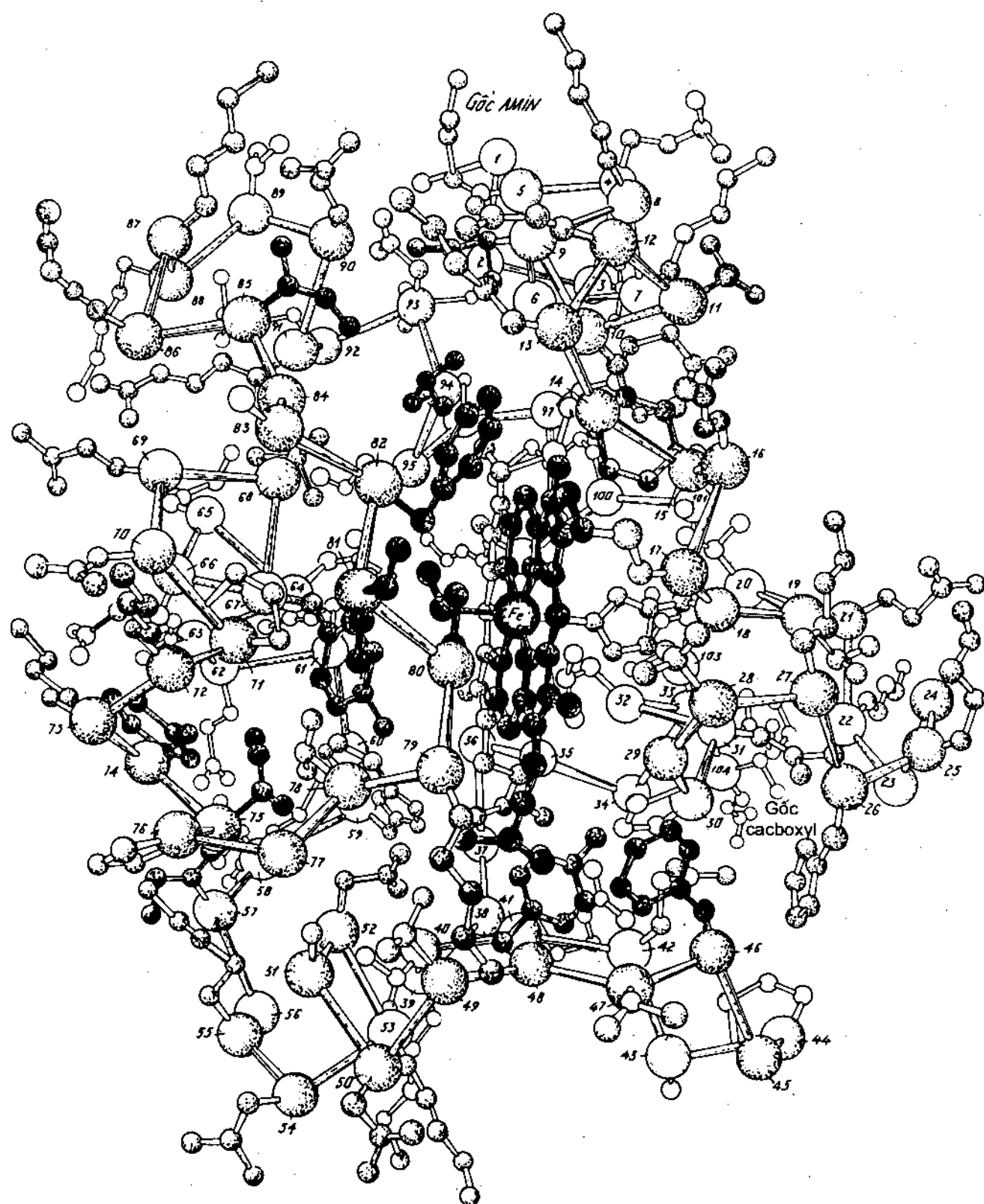


Cấu trúc bậc III của protein

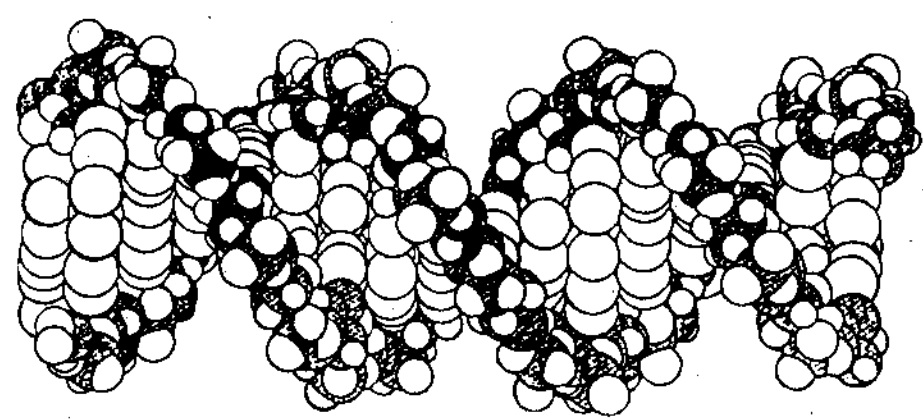
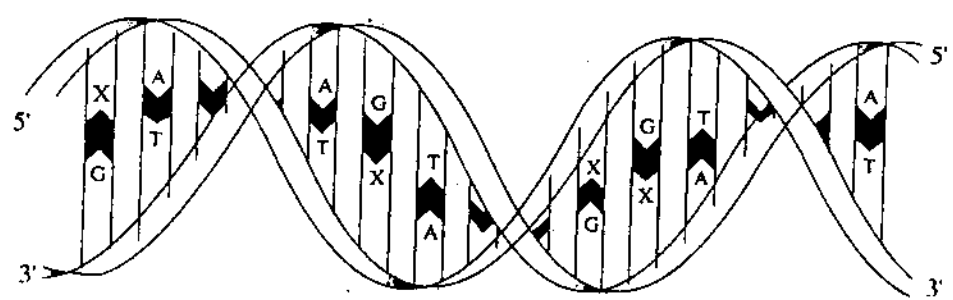
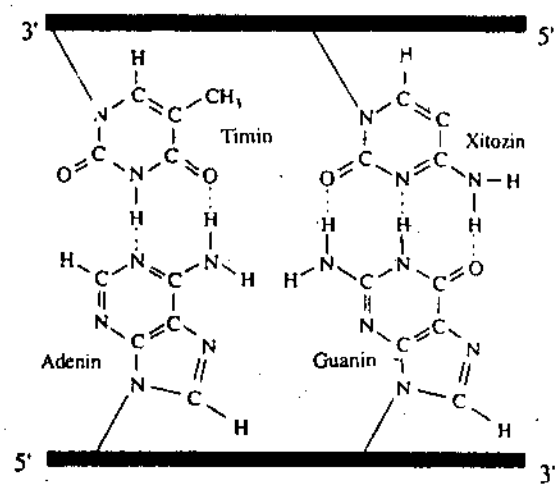
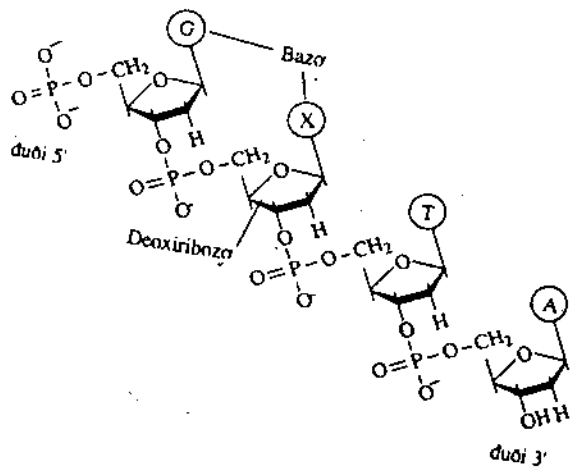


Cấu trúc bậc IV của protein

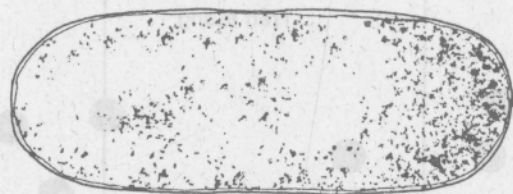
198.146



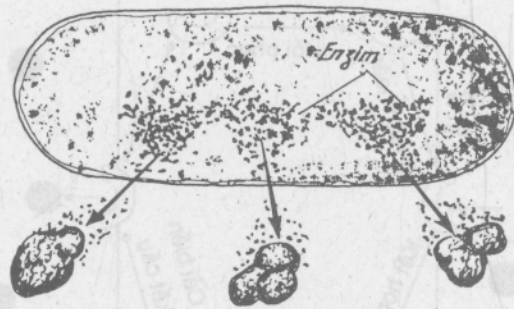
Sơ đồ cấu trúc của phân tử protein xitocrom C



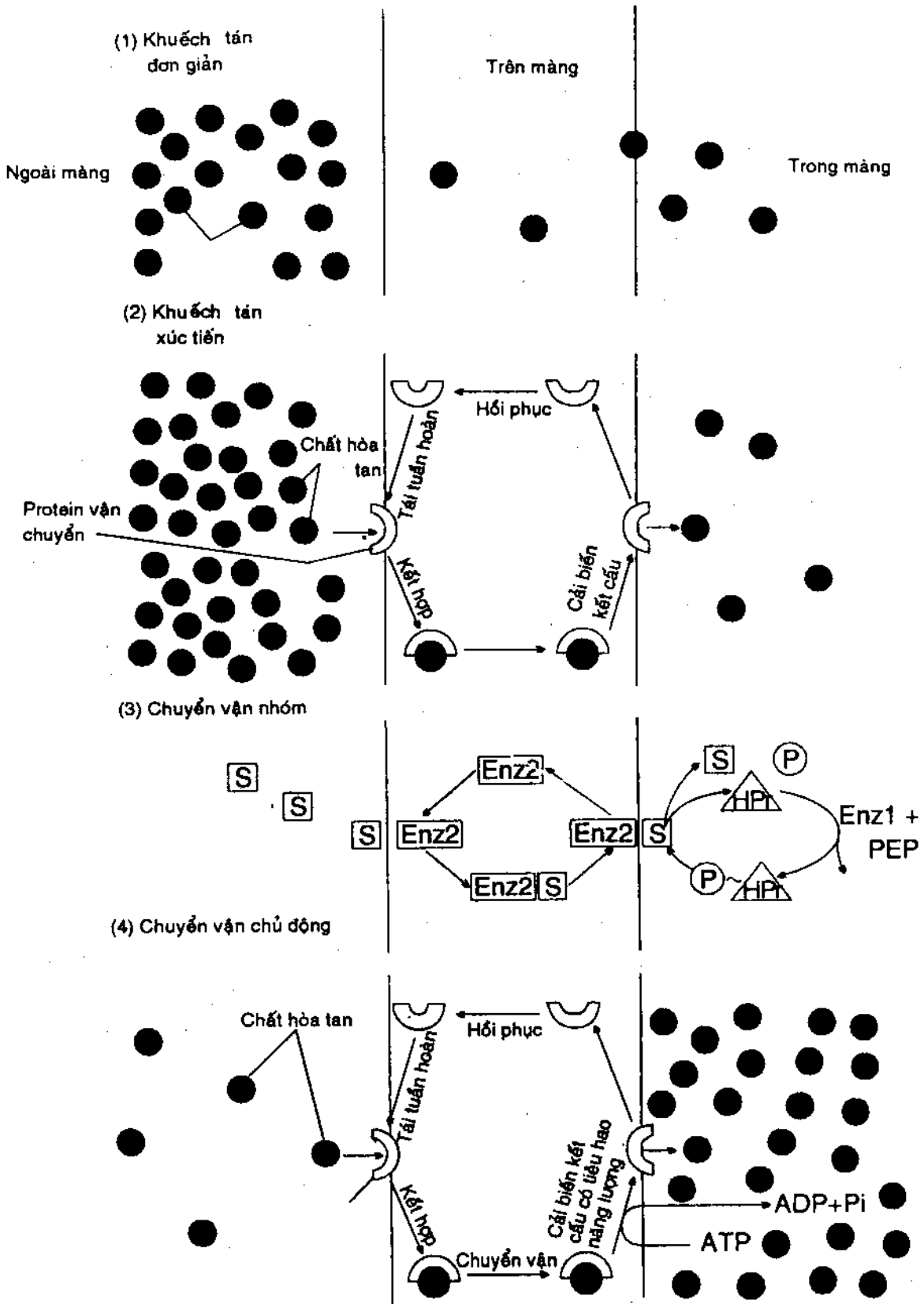
Cấu trúc phân tử ADN



Thức ăn hữu cơ cao phân tử

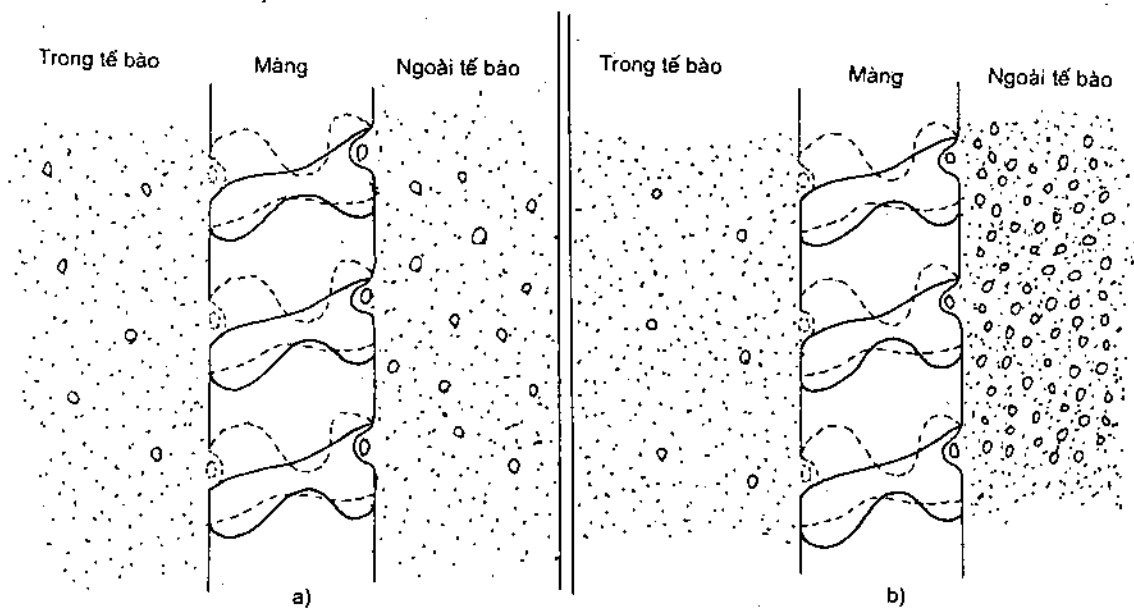


Vi khuẩn sản sinh enzym phân giải các thức ăn hữu cơ cao phân tử trước khi hấp thụ



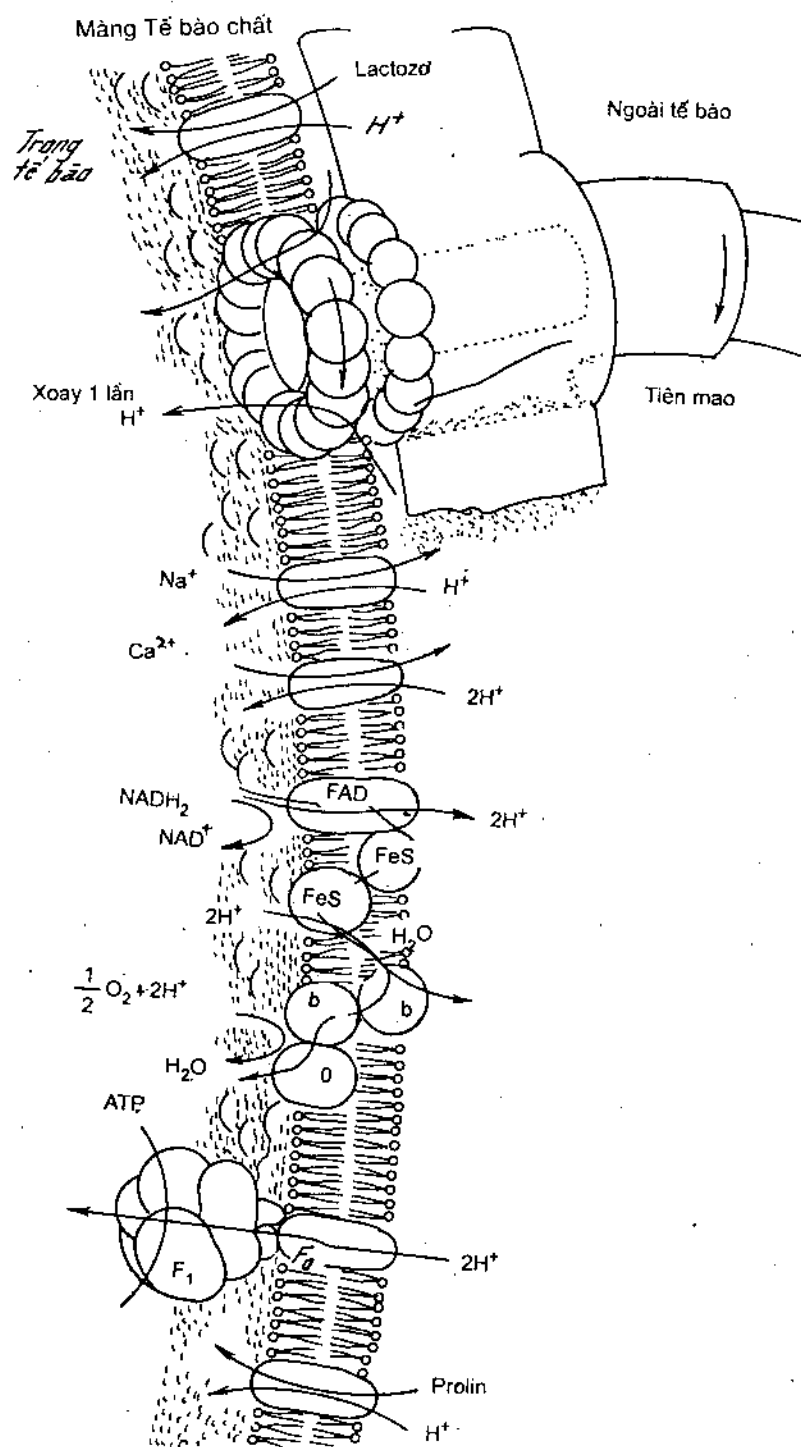
Bốn kiểu vận chuyển chất dinh dưỡng vào tế bào

Chú thích về kiểu chuyển vận nhóm : khác với kiểu vận chuyển chủ động ở chỗ chất hòa tan trước và sau quá trình chuyển vận có biến đổi kết cấu. (HP_r - heat - stable carrier protein - protein vận chuyển bền nhiệt, PEP = photphoenolpiruvat, PA - axit piruvic)



Quá trình khuếch tán xúc tiến

Chú thích : Nồng độ chất cần vận chuyển ngoài tế bào ở hình (a) nhỏ hơn nhiều so với ở hình (b), nhưng do số lượng protein vận chuyển tương đối ổn định do đó hiệu suất vận chuyển như nhau.



Sự vận chuyển các chất qua màng tế bào chất ở vi khuẩn *E. coli*

FeS = Protein chứa Fe, S

FAD = Flavin adenin dinucleotit

NAD = Nicotinamit adenin dinucleotit

CHƯƠNG VI

TRAO ĐỔI CHẤT VÀ TRAΟ ĐỔI NĂNG LƯỢNG Ở VI SINH VẬT

1. MỘT SỐ KHÁI NIỆM CHUNG

Cấu trúc và chức năng của một tế bào sống liên quan trực tiếp hoặc gián tiếp đến các phản ứng hóa học. Trao đổi chất là tổng các phản ứng hóa học do tế bào thực hiện và gồm 2 loại : các phản ứng giải phóng năng lượng hay còn gọi là các phản ứng tỏa nhiệt và các phản ứng thu năng lượng hay còn gọi là các phản ứng thu nhiệt.

Tế bào cần sử dụng năng lượng trong nhiều mục đích khác nhau : tổng hợp các cấu trúc tế bào (thành, màng...), các phần phụ bên ngoài (vỏ nhầy, tiên mao, nhung mao...), tổng hợp các cao phân tử sinh học (axit nucleic, protein, polisaccarit, lipid...) và các thành phần hóa học khác, sửa chữa và duy trì tế bào, sinh trưởng và sinh sản, tích lũy chất dinh dưỡng và bài tiết các sản phẩm dư thừa, di động, tiếp hợp...

Đối với một số nhóm vi sinh vật thì nguồn năng lượng là các chất dinh dưỡng đã được tế bào hấp thu. Khi liên kết hóa học trong các chất dinh dưỡng bị đứt, năng lượng được giải phóng ra ở dạng hóa năng và sẽ được tế bào thu nhận để sử dụng. Với một nhóm vi sinh vật khác thì nguồn năng lượng lại là ánh sáng. Chúng chuyển hóa quang năng thành hóa năng để sử dụng được trong các quá trình trao đổi chất.

Quá trình chuyển hóa các chất dinh dưỡng và chế biến lại để tổng hợp ra các hợp chất riêng của tế bào vi sinh vật được gọi là quá trình đồng hóa. Quá trình này còn được gọi là quá trình trao đổi chất xây dựng hay trao đổi chất kiến tạo. Ngược lại với quá trình đồng hóa là quá trình phân hủy các thành phần của cơ thể, đó là quá trình dị hóa.

Hai quá trình đồng hóa và dị hóa tương tác với nhau và diễn ra đồng thời. Mặc dầu rất phức tạp nhưng ta vẫn có thể tóm tắt trong các sơ đồ (xem phần sơ đồ).

Quá trình đồng hóa còn được gọi là quá trình sinh tổng hợp. Trong quá trình này bao giờ năng lượng tự do của sản phẩm cũng lớn hơn năng lượng tự do của các chất phản ứng ($\Delta G > 0$). Ngược lại, trong quá trình dị hóa, năng lượng tự do của các chất phản ứng bao giờ cũng lớn hơn năng lượng tự do của sản phẩm ($\Delta G < 0$).

Các quá trình oxi hóa - phân hủy kèm theo sự giải phóng năng lượng cần thiết cho hoạt động sống được gọi là quá trình trao đổi năng lượng. Ở động vật và các thực vật bậc cao các quá trình này thường xảy ra với cơ chất là các chất dự trữ của cơ thể (protein, polisaccarit, lipid). Nhưng ở tế bào vi sinh vật, số lượng các chất dự trữ thường rất nhỏ. Vì thế chúng phải sử dụng chủ yếu là các chất hấp thu từ môi trường xung quanh.

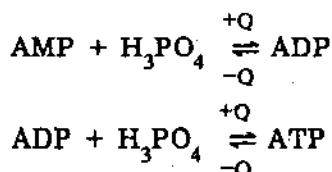
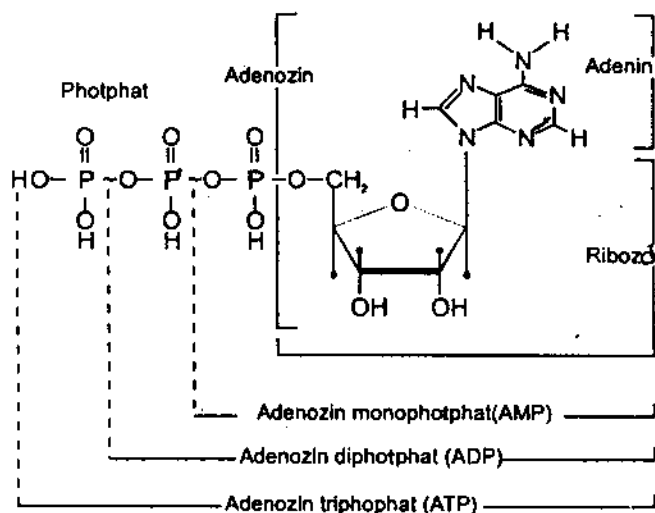
Phần lớn các loài vi sinh vật thuộc loại dinh dưỡng hóa năng. Chúng sử dụng các hợp chất hóa học để làm nguồn sinh năng lượng. Năng lượng này không biến thành nhiệt năng mà truyền trực tiếp từ hợp chất này sang hợp chất khác cùng với các điện tử hoặc các nguyên tử. Trong số này các vi sinh vật dị dưỡng hóa năng hay dinh dưỡng hóa năng hữu cơ sử dụng các hợp chất hữu cơ có sẵn. Còn các vi sinh vật tự dưỡng hóa năng hay dinh dưỡng hóa năng vô cơ thì lại sử dụng các hợp chất vô cơ. Các vi sinh vật dinh dưỡng quang năng bao gồm nhóm dinh dưỡng quang năng vô cơ và nhóm dinh dưỡng quang năng hữu cơ sử dụng trực tiếp năng lượng của ánh sáng.

Đối với các nhóm vi sinh vật kỵ khí quá trình oxi hóa sinh năng lượng không kèm theo việc liên kết với oxi không khí. Ngày nay người ta hiểu rằng oxi hóa không chỉ có nghĩa là liên kết với oxi mà còn bao gồm cả quá trình mất hidro ($RH_2 + A \rightarrow R + AH_2$), quá trình tách hidro ra sau khi kết hợp với nước ($A + H_2O \rightarrow B \rightarrow C$) hoặc quá trình mất electron và làm tăng thêm hóa trị dương ($Fe^{2+} \rightarrow Fe^{3+} + e$, $Cu^+ \rightarrow Cu^{2+} + e$...).

Năng lượng giải phóng ra từ các phản ứng oxi hóa sẽ được giữ lại trong một số hợp chất giàu năng lượng có mặt trong tế bào vi sinh vật. Đó là các hợp chất như nucleozit triphotphat (ATP, UTP...), các axyl photphat, các dẫn xuất của axit cacbonic (Axetyl - CoA...).

Hợp chất giàu năng lượng quan trọng nhất là ATP (adenozin triphotphat). Nó chứa 2 liên kết cao năng (~), mỗi liên kết chứa khoảng 1200cal (trong khi mỗi liên kết photphat bình thường chỉ chứa khoảng 300cal).

ATP được coi như "tiền tệ" của năng lượng trong tế bào. Chúng được tiêu dùng trong tất cả các phản ứng trao đổi cần năng lượng. Các phân tử giàu năng lượng này được hình thành trong tế bào của vi sinh vật cũng như trong tế bào của mọi sinh vật khác. Có thể nói sự hình thành liên kết cao năng giữa P và O còn gọi là quá trình photphoryl hóa là phương thức chủ yếu để tích lũy năng lượng cần thiết cho tế bào



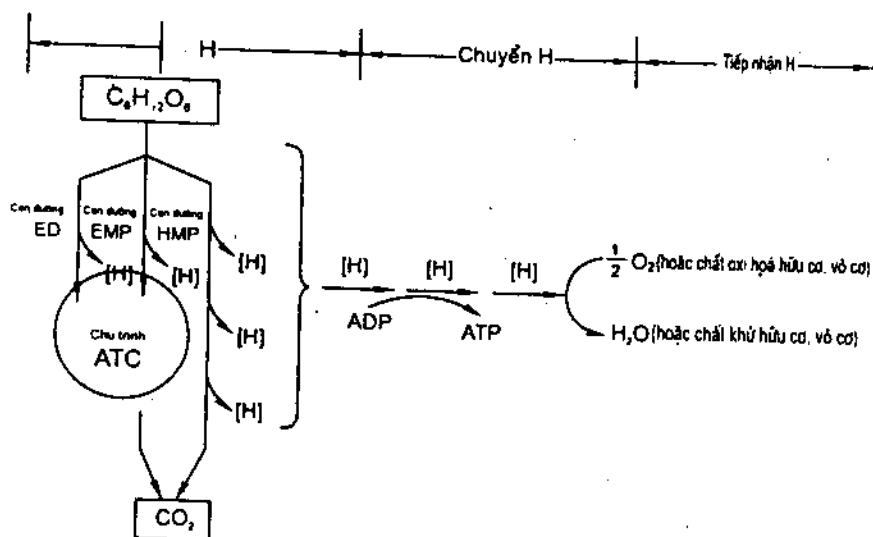
2. SỰ OXI HÓA SINH HỌC VÀ SINH NĂNG LƯỢNG Ở CÁC VI SINH VẬT DỊ DƯỠNG

Sự oxi hóa sinh học là khái niệm chung để chỉ một loạt các phản ứng oxi hóa sinh năng lượng xảy ra trong các tế bào sống. Sự oxi hóa sinh học và sự oxi hóa phi sinh học (sự cháy) có những điểm giống nhau và những điểm khác nhau. Giống nhau là cùng oxi hóa chất hữu cơ để giải phóng ra năng lượng. Còn khác nhau có thể kể đến như sau :

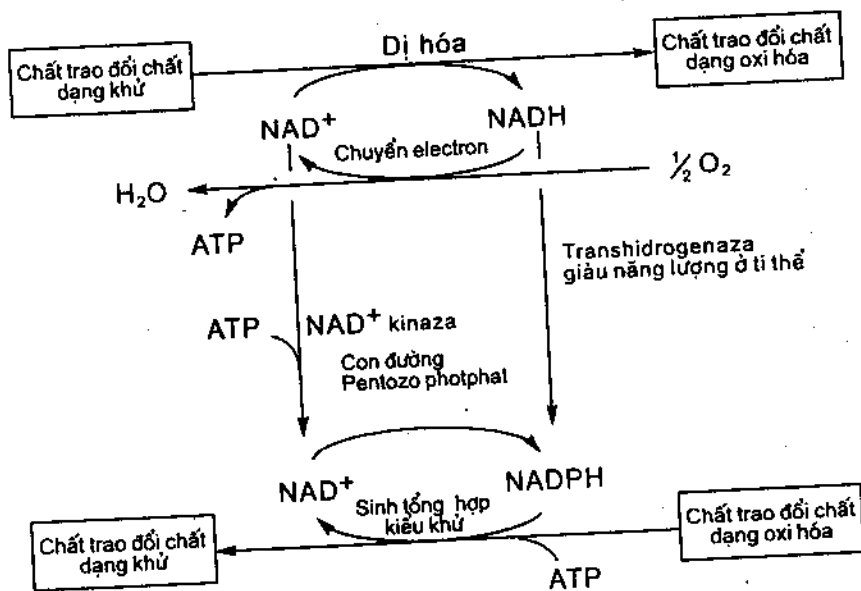
	Sự cháy	Sự oxi hóa sinh học
Phương thức phản ứng	$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 \xrightarrow{3\text{O}_2} 6\text{H}_2\text{O}$ $\downarrow 3\text{O}_2$ 6CO_2	$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 \xrightarrow[\text{đồng electron}]{\text{O}_2} 6\text{H}_2\text{O}$ $\downarrow \text{đồng cacbon}$ 3O_2 \downarrow 6CO_2
Các bước phản ứng	Phản ứng nhanh một bước	Phản ứng bậc thang nhiều bước
Điều kiện	Kịch liệt	Ôn hòa
Chất xúc tác	Không	Enzim (ở vị trí nhất định trong tế bào)
Hình thức năng lượng sinh ra	Nhiệt, ánh sáng	Phần lớn là ATP
Hiệu suất sử dụng năng lượng	Thấp	Cao

Sự mất hidro của cơ chất có thể theo 4 con đường khác nhau. Ở mỗi con đường đều có chức năng mất hidro, sinh năng lượng và sản sinh các sản phẩm trao đổi chất phân tử nhỏ cung cấp làm nguyên liệu cho các phản ứng sinh tổng hợp. Hidro tách ra được vận chuyển và cuối cùng được tiếp nhận bởi oxi để tạo ra nước.

Có thể biểu thị tóm tắt như sau :



Có thể biểu thị các dòng chảy electron trong dị hóa và trong sinh tổng hợp kiểu khử ở vi sinh vật bằng sơ đồ sau đây :



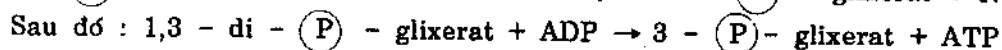
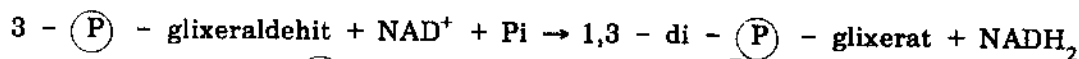
2.1. Con đường đường phân (glycolysis)

Con đường này còn gọi là con đường EMP (Embden - Meyerhof - Parnas pathway)

Trong điều kiện có hay vắng mặt O_2 , glucosơ đều được chuyển thành piruvat qua 10 phản ứng trong đó chỉ 3 phản ứng (1, 3 và 10) là một chiều còn lại là 2 chiều. Trừ chất đầu (glucosơ) và chất cuối (piruvat) các chất trung gian đều ở dạng photphoryl hóa. Gốc photphoryl ở đây có 3 chức năng : 1. Giúp cho chất trung gian mang điện tích âm cao không thể thoát ra ngoài ; 2. Là vị trí gắn enzym ; 3. Là vị trí cung cấp liên kết photphat cao năng ($\sim \text{P}$).

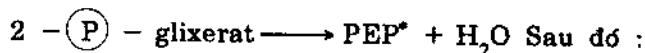
Cân bằng chung : Glucosơ \rightarrow 2piruvat + 2ATP + 2NADH₂

ATP ở đây được tạo thành từ 2 phản ứng 7 và 10. Phản ứng 7 là phản ứng oxi hóa :

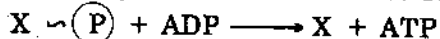


Enzim xúc tác (3 - P-glixeraldehit dehidrogenaza) chứa nhóm SH, do đó bị kìm hãm bởi các kim loại nặng. Mặt khác, 1,3 - di-P-glixerat chứa một $\sim \text{P}$ ở C₁.

Trong sự có mặt của arsenat, gốc AsO_4 , do tương tự với gốc PO_4^{3-} , đã liên kết cạnh tranh với $\sim \text{P}$ ở C₁. Kết quả là sự tạo thành ATP ở đây bị kìm hãm. Phản ứng 10 là phản ứng loại nước :

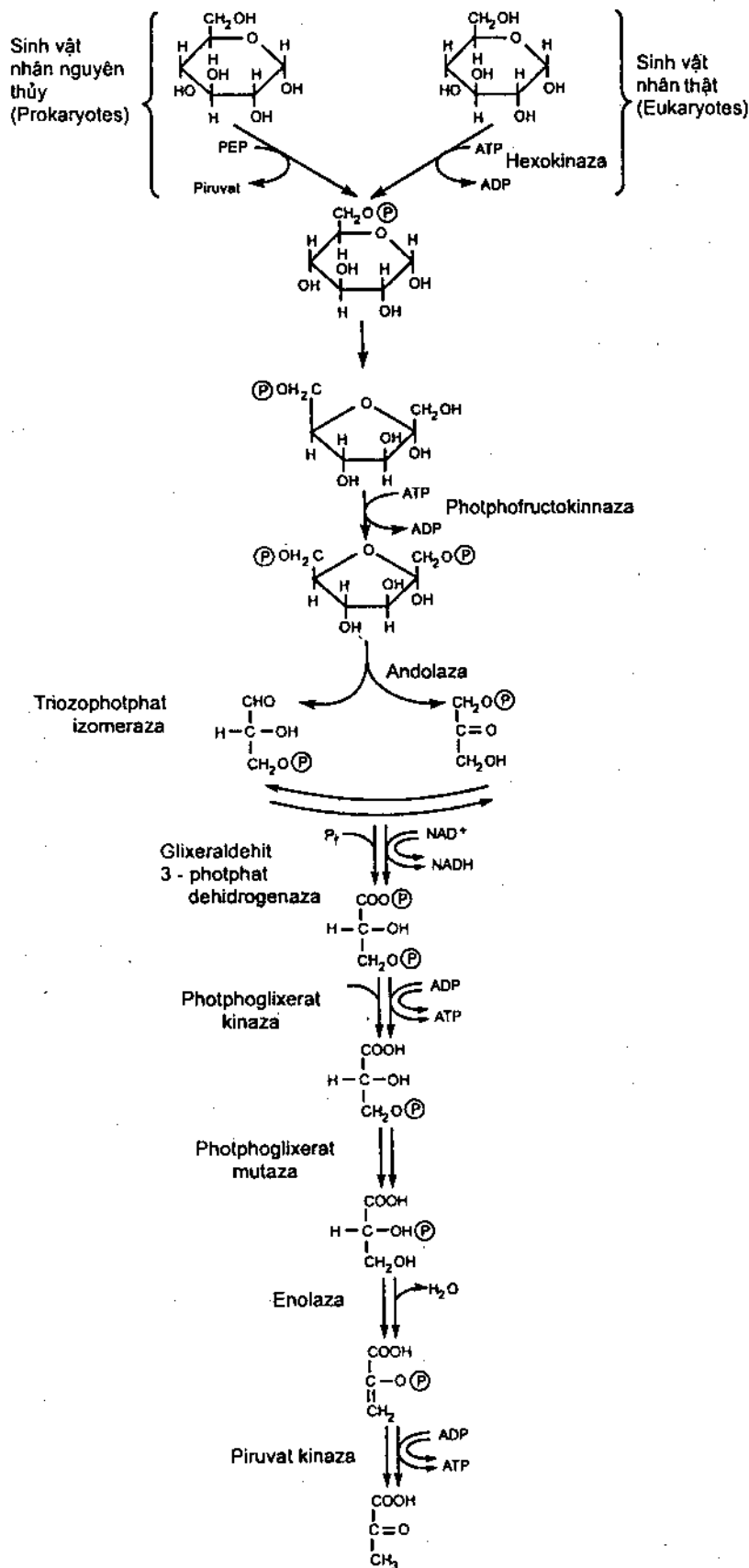


Sự tạo thành ATP ở 2 phản ứng trên gọi là photphoryl hóa ở mức độ cơ chất vì photphat cao năng ($\sim \text{P}$) trước đó là một phần của phân tử chất trao đổi (1,3 - di-P-glixerat và PEP). Khi có mặt ADP chất trao đổi sẽ chuyển $\sim \text{P}$ cho ADP :



Đường phân cũng cung cấp cho tế bào 6 trong số 12 tiền chất dùng tổng hợp các đơn vị kiến trúc : glucosơ - 6 - P, fructosơ - 6 - P, 3 - P-glixeraldehit, 3 - P-glixerat, PEP, piruvat, ribosơ - 5 - P, eritrosơ - 4 - P, axetyl - CoA, α - ketoglutarat, oxalaxetat (AOA) và xuxinyl - CoA.

PEP* : photphoenolpiruvat

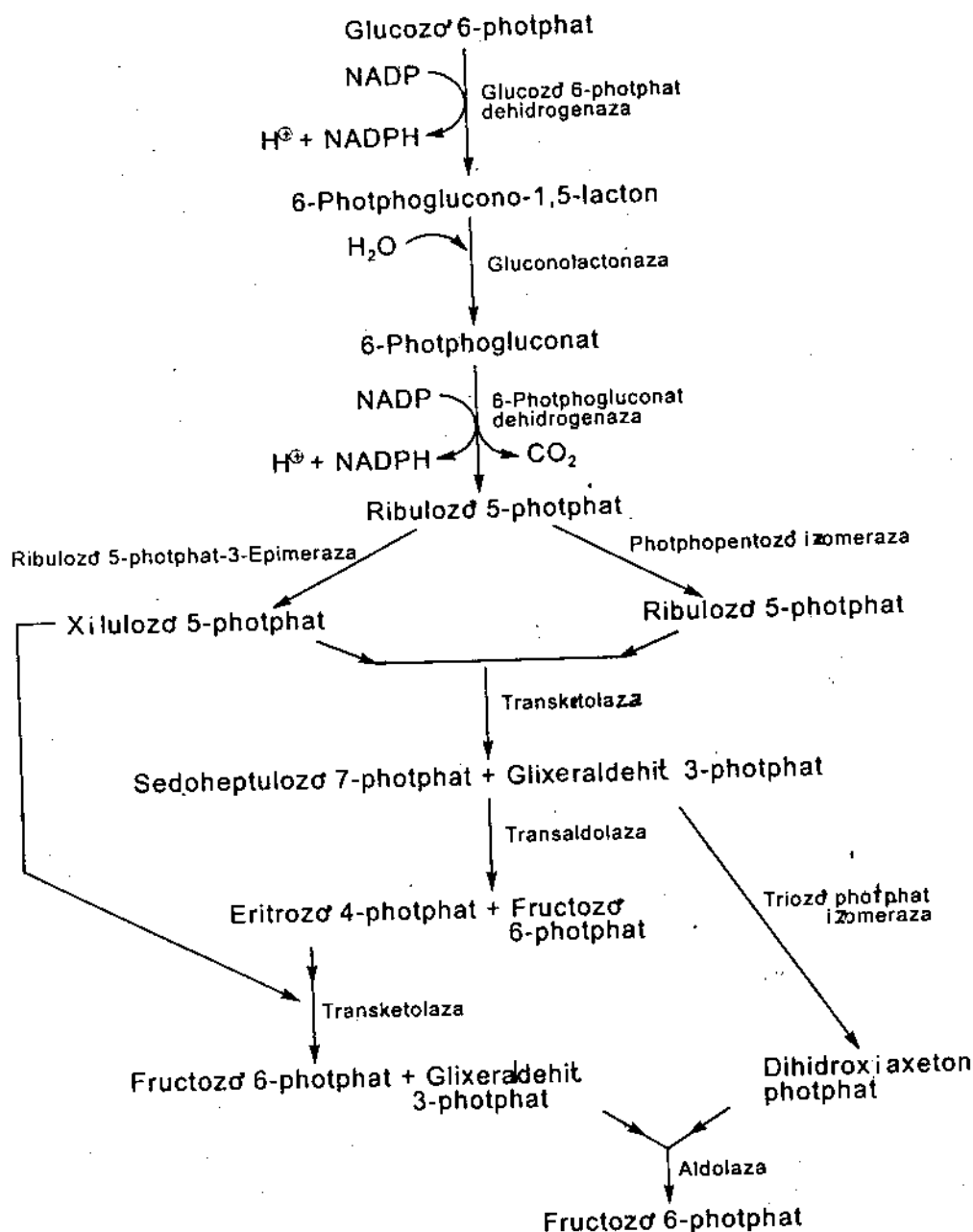


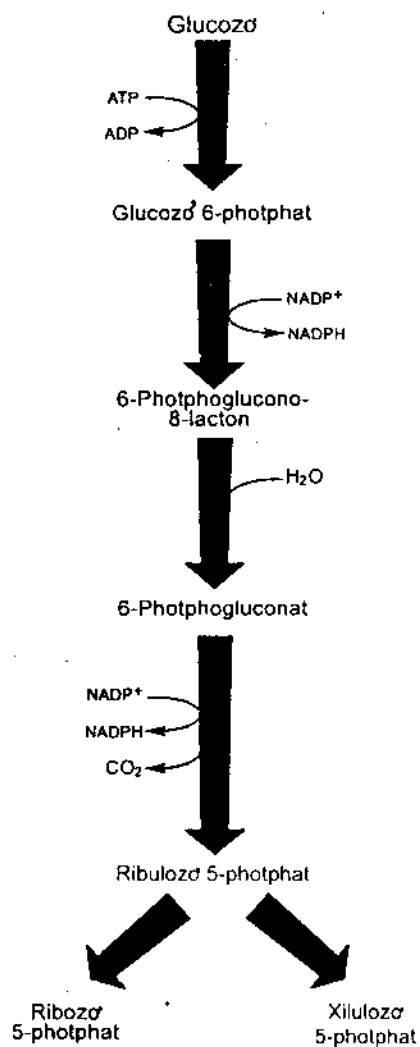
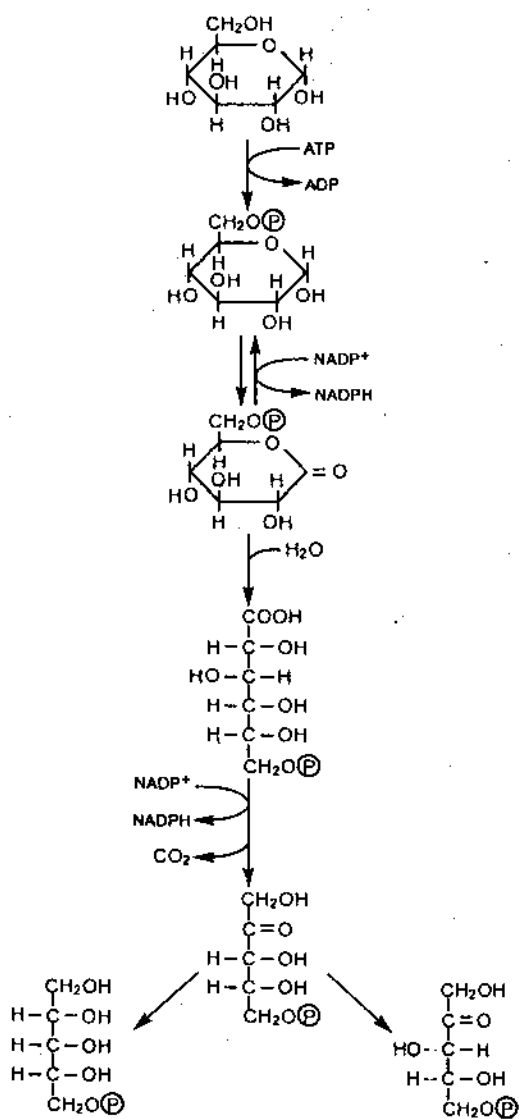
Quá trình đường phân (glycolysis)

2.2. Con đường Pento - photphat (PP, Pentose phosphate pathway) còn gọi là con đường Hexo-mono photphat (HMP).

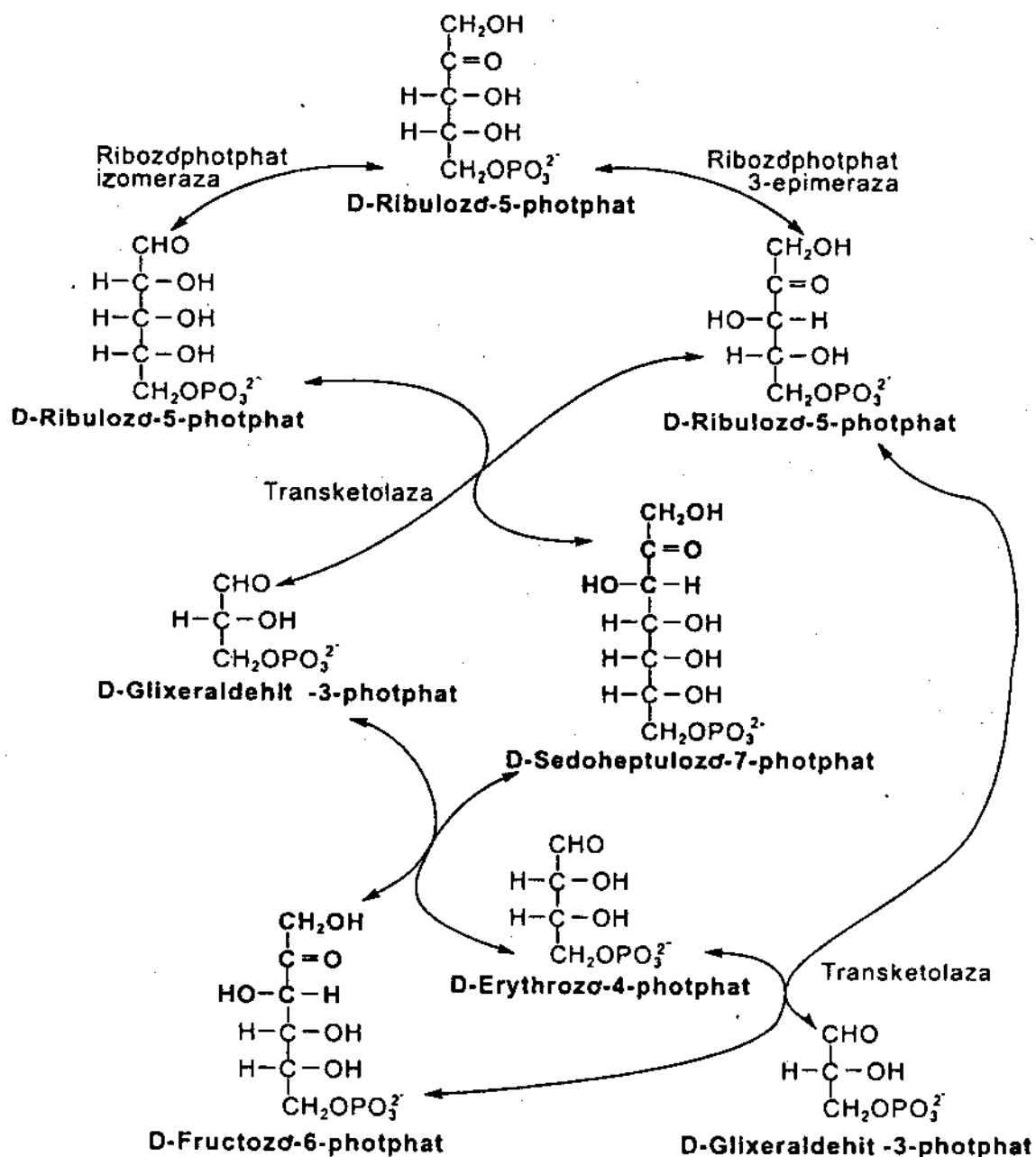
Con đường này giúp cho nhiều vi khuẩn chuyển hóa glucosơ thành piruvat không qua con đường EMP (do bị đột biến ở ≥ 1 enzym của con đường này) đồng thời cung cấp cho tế bào 2 tiền chất khác là ribosơ - 5 - P (dùng tổng hợp axit nucleic) và eritrosơ - 4 - P (cùng với PEP dùng tổng hợp các axit amin thơm) Ngoài ra con đường PP còn cung cấp NADPH cần cho các phản ứng tổng hợp khử :

Con đường PP diễn ra như sau :

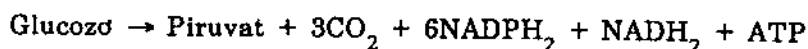




Giai đoạn I



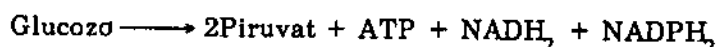
Qua 2 phản ứng oxi hóa xúc tác bởi glucozơ - 6 - P và 6 - P - gluconat - dehidrogenaza, glucozơ được tách thành ribulozơ - 6 - P và CO₂. Quá trình oxi hóa được kết thúc tại đây. Các phản ứng tiếp theo chỉ là sự chuyển hóa qua lại giữa pentozơ - P và hexozơ - P, từ đó con đường đóng kín thành chu trình nhờ sự xúc tác của 2 enzym : TK và TA. Nếu 3 - P - glixeraldehyt đi vào con đường EMP và chuyển thành piruvat ta sẽ có :



Như vậy, con đường Pentozơ photpho oxi hóa (PPO) mang tính chất đóng hóa là chủ yếu, về năng lượng PPO cho 1ATP, nghĩa là chỉ bằng nửa con đường EMP.

2.3. Con đường 2 - keto - 3 deoxi - 6 - P - gluconat (KDPG, 2 - keto - 3 deoxi - 6 - photphatgluconat pathway) hay còn gọi là con đường Entner - Doudoroff, con đường ED (Entner - Doudoroff pathway).

Trước hết glucozơ - 6 - P được chuyển thành 6 - P - gluconat như con đường PP. Sau đó, chất này bị loại nước nhờ P - gluconat - dehidraza thành KDPG. KDPG bị phân giải thành piruvat và 3 - P - glixeraldehyt nhờ một aldolaza đặc hiệu. Cuối cùng, 3 - P - glixeraldehyt lại đi vào con đường EMP để cho piruvat. Do đó cân bằng chung của con đường KDPG là :



Con đường này chỉ gặp ở một số vi khuẩn.

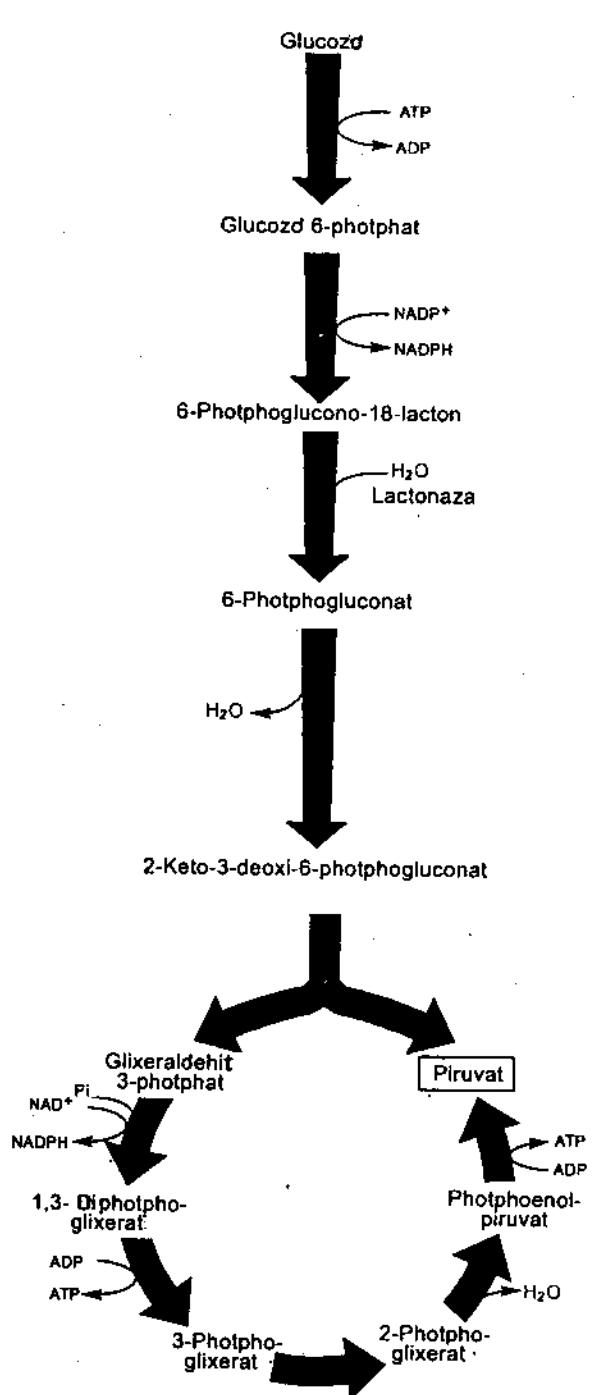
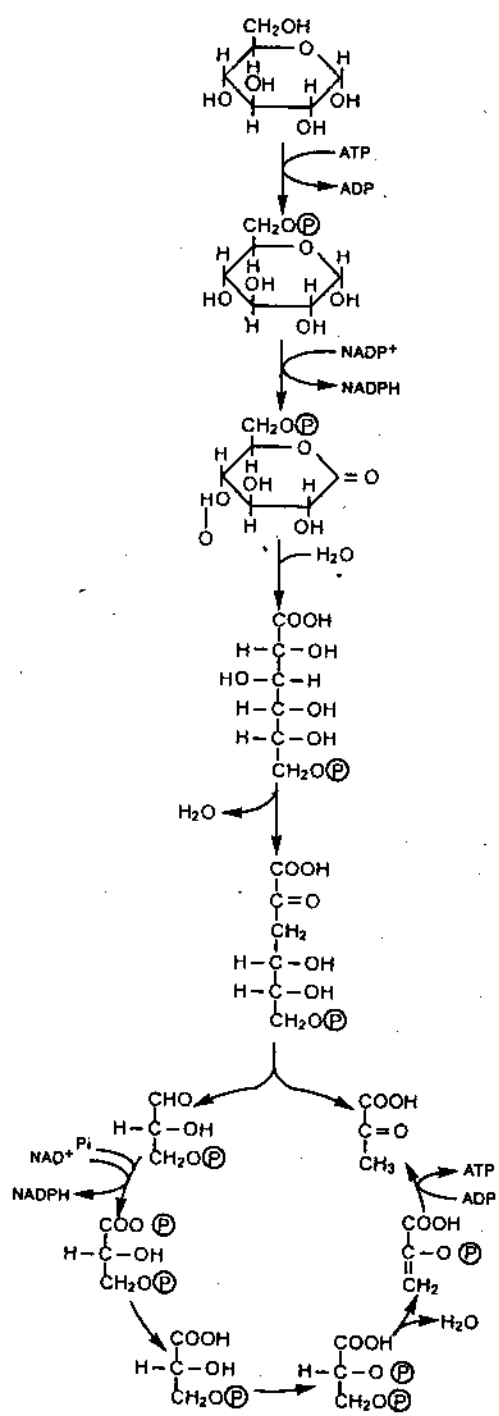
Các vi sinh vật khác nhau ở mức độ sử dụng một trong 3 con đường trên. Con đường EMP và PPO phổ biến ở mọi sinh vật. Con đường KDPG giúp cho nhiều vi khuẩn sử dụng gluconat. Chẳng hạn, *E.coli* và nhiều loài của *Clostridium* chuyển hóa glucozơ qua con đường EMP nhưng phân giải gluconat qua con đường KDPG.

Các *Clostridia* và một số vi khuẩn hiếu khí chuyển hóa gluconat qua con đường KDPG cải biến : gluconat được chuyển thành 2 - keto - 3 - deoxitgluconat nhờ gluconat-dehidrataza và được phosphoryl hóa với ATP chỉ ở bước này nhờ ketodeoxiglucokinaza ; KDPG bị phân giải nhờ P - 2 - keto - 3 - deoxigluconat - aldolaza.

Sự tham gia của 3 con đường trong sự phân giải hexozơ :

	EMP (%)	HMP (%)	ED(%)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	88	12	-
<i>Candida utilis</i>	66-81	19-34	-
<i>Streptomyces griseus</i>	97	3	-
<i>Penicillium chrysogenum</i>	77	23	-
<i>Escherichia coli</i>	72	28	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	29	71
<i>Pseudomonas saccharophila</i>	-	-	100
<i>Bacillus subtilis</i>	74	26	-
<i>Gluconobacter oxydans</i>	-	100	-
<i>Alcaligenes eutrophus</i>	-	-	100
<i>Zymomonas mobilis</i>	-	-	100
<i>Sarcina lutea</i>	70	30	-

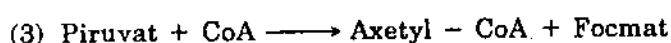
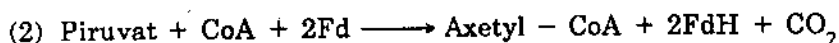
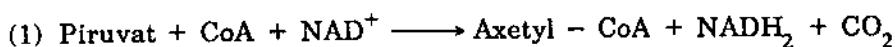
198
198
198



Con đường KDPG (hay con đường ED)

2.4. Quá trình oxi hóa piruvat

Piruvat chiếm vai trò trung tâm trong trao đổi chất trung gian và là tiền chất của nhiều sản phẩm. Nhiều vi sinh vật oxi hóa piruvat thành axetyl - CoA. Quan trọng nhất ở vi khuẩn là 3 phản ứng :

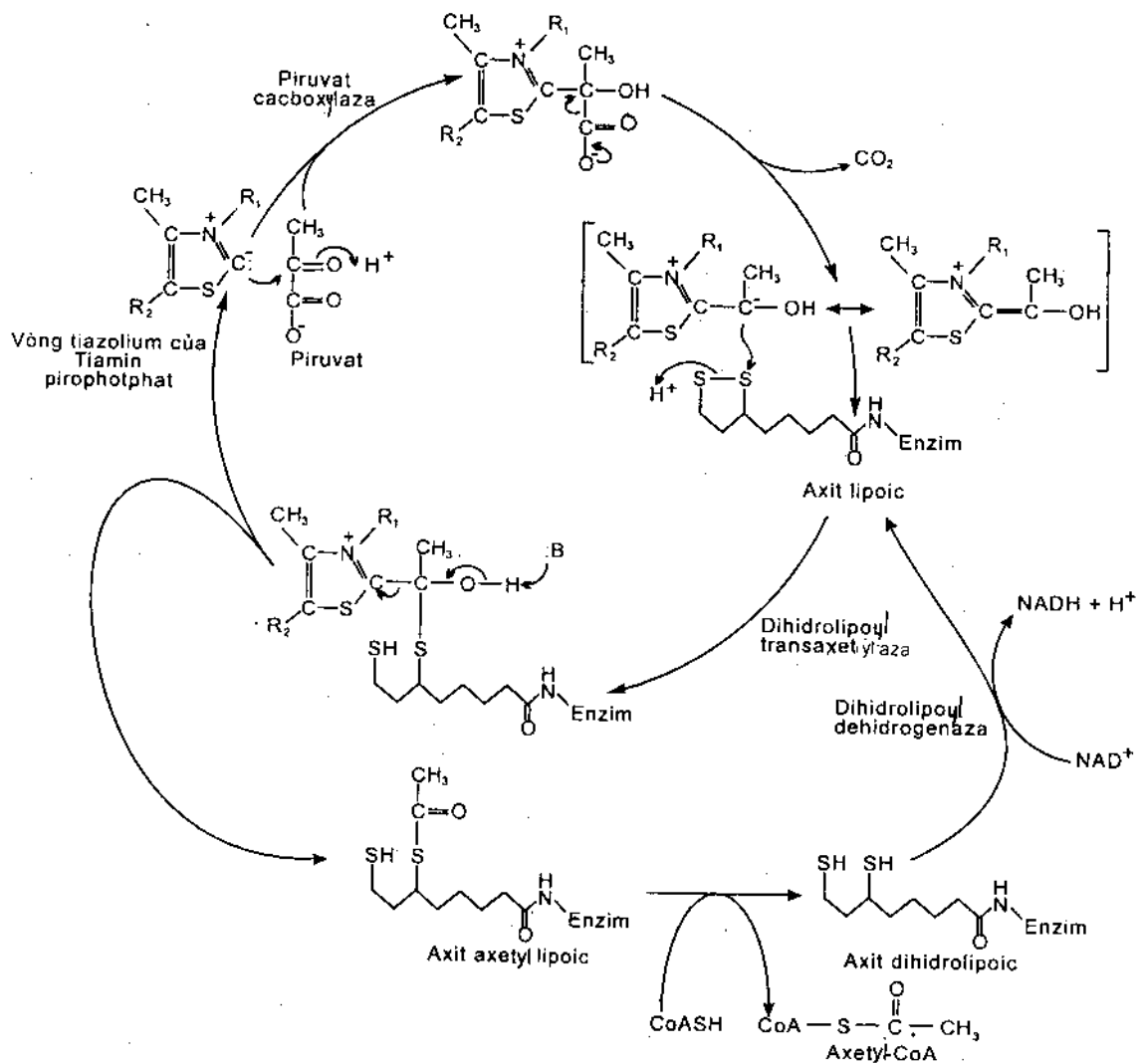


Focmat (Fd = ferredoxin)

Phản ứng (1) do phức hệ piruvat - dehydrogenaza (PDH) xúc tác. PDH gặp ở hầu hết sinh vật hiếu khí (không gặp ở vi khuẩn kỵ khí bắt buộc) và axetyl - CoA tạo thành chủ yếu đi vào chu trình ATC. PDH gồm 3 enzym ; ngoài CoA và NAD^+ còn cần TPP (tiamin - piro - photphat) và axit lipoic.

Phản ứng (2) xúc tác bởi piruvat - Fd - oxidoreductaza gặp ở nhiều vi khuẩn kỵ khí như *Clostridium*.

Phản ứng (3) do piruvat, focmat - liaza xúc tác. Enzim gặp ở nhiều vi khuẩn kỵ khí tiết axit focmic (họ Enterobacteriaceae) cũng như vi khuẩn quang dưỡng.



Quá trình oxy hóa piruvat với sự tham gia của PDH (piruvat dehydrogenaza), TPP (tiamin - piro - photphat), axit lipoic, coenzim A và NAD^+ .

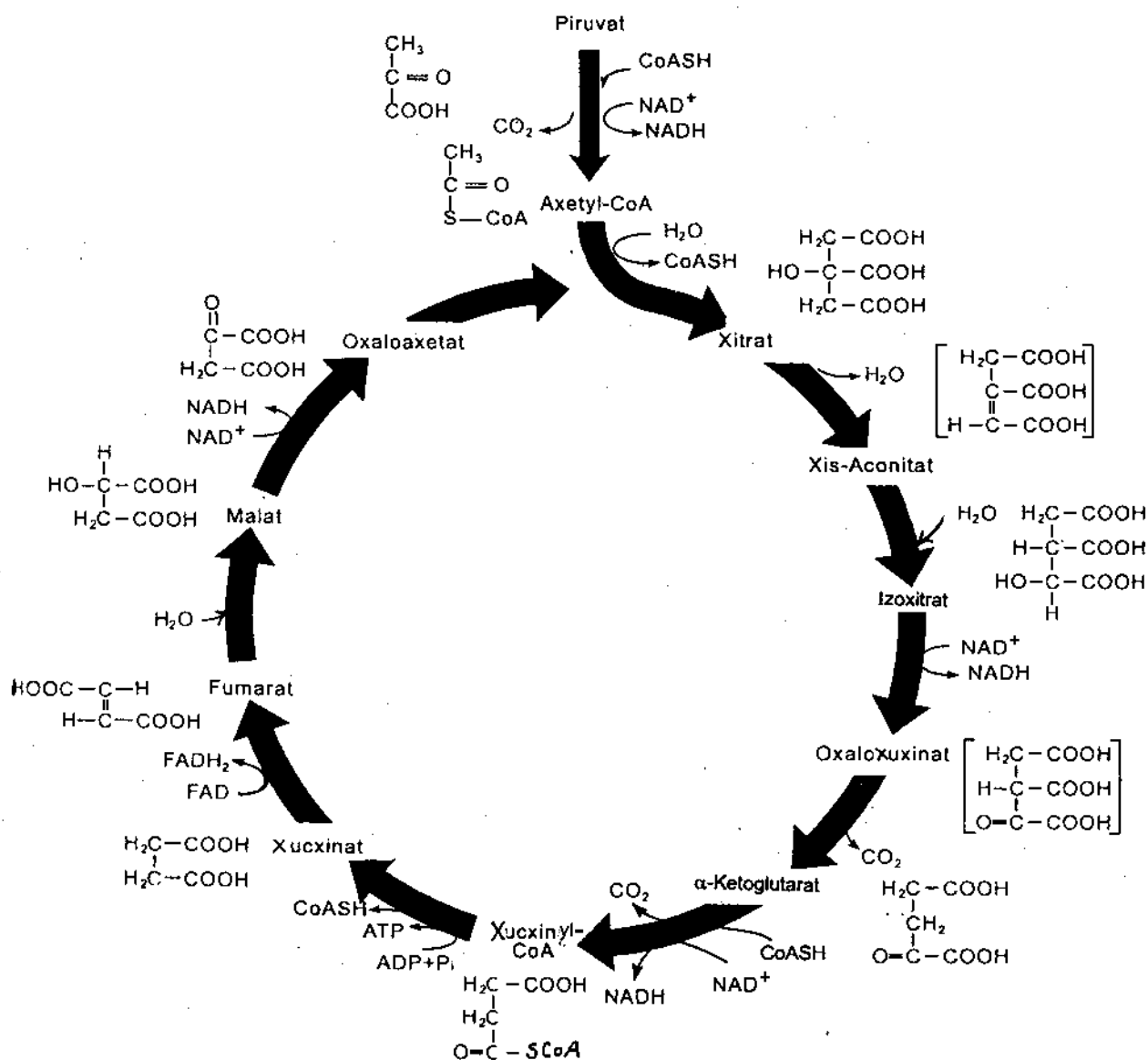
2.5. Chu trình axit tricacboxilic (Tricarboxylic acid cycle)

Chu trình này còn gọi tắt là ATC (hay TAC, theo tiếng Anh) cũng còn được gọi là chu trình Krebs.

Chu trình dùng oxi hóa axetat thành CO_2 và giải phóng H_2 . Trong số 8[H] tách ra thì 6[H] được chuyển đến NAD^+ nhờ sự xúc tác của 3 dehidrogenaza (DH) : α - ketoglutarat - DH, izo - xitrat - DH và malat - DH, còn 2[H] được chuyển đến FAD nhờ xuxinat - DH. Các DH sẽ chuyển hidro vào chuỗi hô hấp. Ngoài chức năng oxi hóa tận cùng, ATC còn cung cấp cho tế bào 3 tiền chất : oxalaxetat (dùng tổng hợp aspactat), α - ketoglutarat (dùng tổng hợp glutamat) và xuxinyl - CoA (dùng tổng hợp nhân hem cần cho cấu trúc của catalaza, xitocrom, clorophin, vitamin B12).

Về năng lượng, chu trình cung cấp 1ATP ở mức độ photphoryl hóa cơ chất (xuxinyl \sim CoA + ADP + Pi \rightarrow xuxinat + ATP).

Trong điều kiện kỵ khí ATC không có chức năng sinh năng lượng nhưng vẫn phải cung cấp cho tế bào 3 tiền chất trên. Tế bào phải sử dụng phần lớn piruvat để lên men thu năng lượng, còn phần nhỏ chuyển thành axetyl \sim CoA nhờ piruvat : Fd - oxidoreductaza (phản ứng 2 ở trên) ATC vẫn phải hoạt động nhưng được "cải biến" theo dạng "vành móng ngựa" : bên phải là oxi hóa đến α - keto - glutarat, bên trái là khử đến xuxinyl \sim CoA (α - KGDH và SDH bị kiểm chế trong điều kiện kỵ khí) ; NADH_2 tạo thành nhờ phản ứng oxi hóa α - ketoglutarat được dùng để khử AOA thành malat ; fumarat reductaza được cảm ứng thay cho SDH.



Chu trình axit tricarboxylic (ATC)

2.6. Chuỗi hô hấp (respiratory chain) và quá trình photophoryl hóa oxi hóa (oxidative phosphorylation)

Trái với vi khuẩn kỵ khí, vi khuẩn hiếu khí có thể tổng hợp ATP mạnh mẽ hơn nhiều nhờ có chuỗi hô hấp và ATP - sintaza (yếu tố $F_0 - F_1$). Hai hệ thống này nằm ở màng : màng tế bào hoặc màng trong ti thể. H^+ và e (electron) tách ra từ cơ chất tham gia vào chuỗi hô hấp ; các e được chuyển đến O_2 . Năng lượng thoát ra được chuyển thành ATP, phần nhỏ giải phóng ở dạng nhiệt. Các thành phần của chuỗi nằm trong lớp lipid kép gồm nhiều enzym vận chuyển e và hidro, các coenzim và nhóm thêm, các dehydrogenaza và hệ thống vận chuyển. Các thành phần quan trọng nhất tham gia vào oxi hóa hidro là :

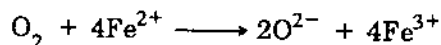
- Flavoprotein là các enzym chứa nhóm thêm là FMN hoặc FAD, vận chuyển hidro.

- Protein Fe-S, vận chuyển e chứa nguyên tử Fe : vừa liên kết với S của xistein vừa liên kết với S của H_2S . Xistein là một phần của chuỗi polipeptit ; có thể coi trung tâm Fe - S là nhóm thêm của chuỗi polipeptit. Trung tâm $[2Fe - 2S]$ chỉ vận chuyển 1e. Do đó protein Fe-S thuộc typ $[2Fe - 2S]$ chứa 2 nguyên tử, S và nguyên tử Fe. Fe gặp ở màng tế bào thì tới 80% nằm trong protein Fe-S và 20% trong xitocrom.

Các protein Fe - S cũng tham gia vào sự cố định nito, khử sunphit, khử nitrit, quang hợp, giải phóng và hoạt hóa H_2 . Chúng có Mr thấp và thế oxi hóa khử rất âm ; Eo nằm trong phạm vi - 0,2 đến 0,6 V. Ngoài protein với trung tâm $[2Fe - 2S]$ lục lập, vi khuẩn hiếu khí còn có protein với trung tâm $[4Fe - 4S]$ (*Clostridium*, *Chromatium*) còn có các protein với trung tâm $[4Fe - 4S]$ (*Clostridium*, *Azotobacter*). Một số protein Fe - S quen thuộc : ferredoxin, putidaredoxin, rubredoxin, hoặc adrenodoxin.

- Quinon : ở màng trong ti thể và ở vi khuẩn G^- là ubiquinon (CoQ), ở vi khuẩn G^+ là naphthoquinon và ở lục lập là plastoquinon. Quinon, đặc biệt là ubiquinon có đặc tính ưa lipid, do đó lắp vào lớp lipid kép của màng, vận chuyển hidro hoặc e. So với các thành phần khác của chuỗi thì hàm lượng của quinon dư thừa tới 10 - 14 lần và là dự trữ hidro chuyển vào chuỗi hô hấp qua các coenzim và nhóm thêm khác nhau rồi chuyển tiếp hidro đến các xitocrom.

- Xitocrom : vận chuyển e, không vận chuyển hidro. Xitocrom nhận e từ quinon ; trong quá trình vận chuyển một số lượng H^+ tương đương với số lượng e bị tách vào môi trường. Xitocrom chứa nhóm thêm là hem. Có một số loại : a, a_3 , b, c, o. Xit.c gặp ở hầu hết cơ thể có chuỗi hô hấp. Xit $a.a_3$ (= xitocrom - oxidaza) chuyển 4e trực tiếp lên oxi :

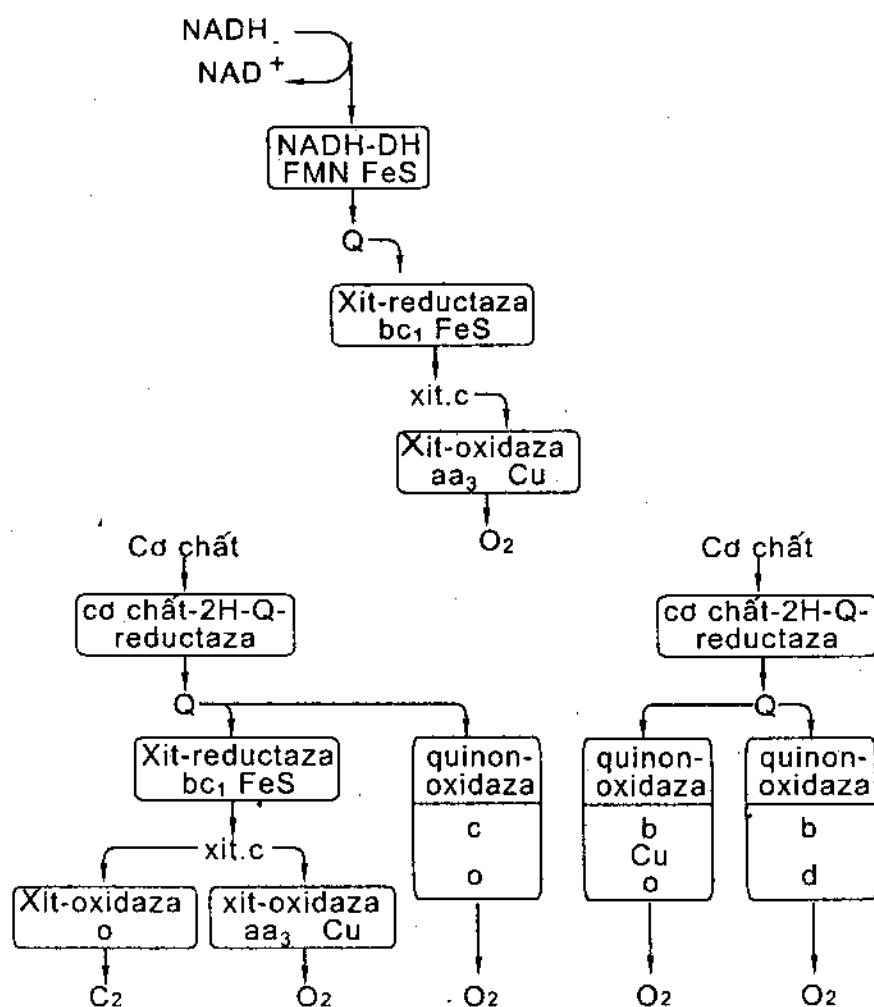


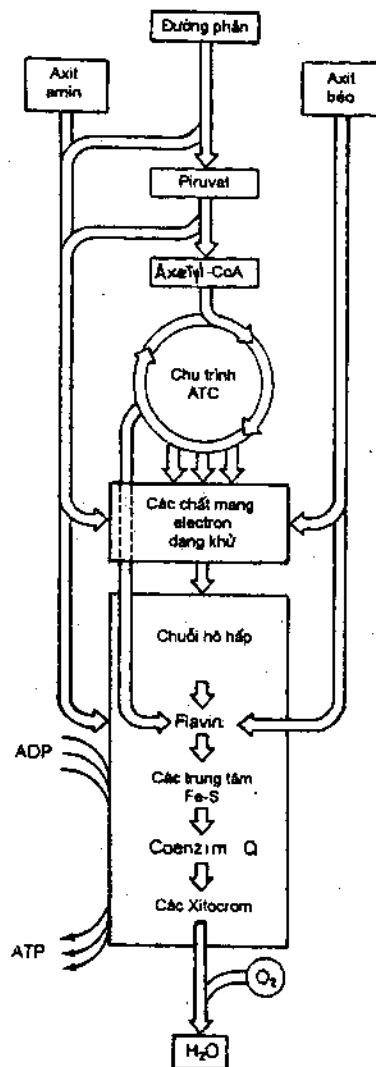
Vi khuẩn cũng chứa xit.o, phản ứng với O_2 .

Đáng chú ý, *Desulfovibrio* là vi khuẩn kỵ khí cũng có xit. c_3 tham gia vào sự khử sunphat dị hóa (hô hấp sunphat), vi khuẩn lactic chịu khí (*Streptococcus lactis* và *Leuconostoc mesenteroides*) cũng như vi khuẩn kỵ khí *Bifidobacterium* tạo thành xitocrom khi sinh trưởng trên môi trường chứa máu. Nhiều vi khuẩn kỵ khí khác cũng tổng hợp xitocrom và ở chúng cũng diễn ra quá trình photophoryl hóa oxi hóa.

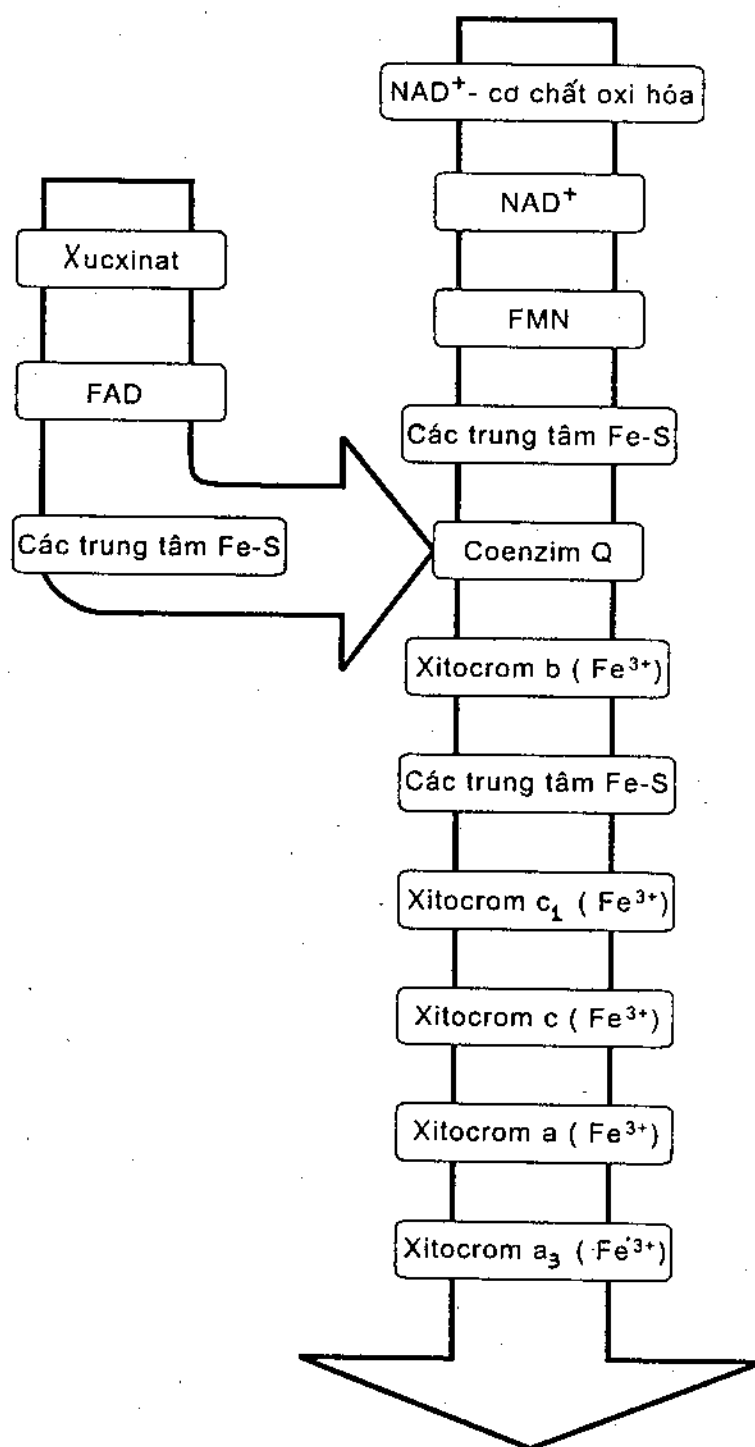
Các thành phần của chuỗi hô hấp được sắp xếp trên cơ sở của thế oxi hóa khử bắt đầu với NAD^+ (thế âm nhất) và kết thúc với xitocrom - oxidaza và O_2 . Từ NADH các e được chuyển qua 3 phức hệ protein : NADH - dehydrogenaza (phức I), xitocrom-

reductaza (phức III) và xitocrom - oxidaza (IV) đến O_2 . Đây là các protein xuyên màng chứa các nhóm thêm như flavin, xitocrom, trung tâm Fe-S. Xit.c là một protein màng ngoại vi. Hệ thống sắp xếp trên gặp ở ti thể và một số vi khuẩn hiếu khí. Hầu hết chuỗi hô hấp chứa phức hợp bc_1 , nhưng một số vi khuẩn có hệ thống vận chuyển e phân nhánh cũng như tính đa dạng của oxidaza tận cùng. Đây là các xitocrom típ. b và được gọi là xit.o, xit.d, có cấu trúc tương tự xit. aa_3 và hoạt động như các bơm proton. Sự phân nhánh diễn ra từ phức bc_1 hay từ dự trữ quinon phụ thuộc vào điều kiện môi trường, trước hết vào áp lực riêng phần của O_2 .

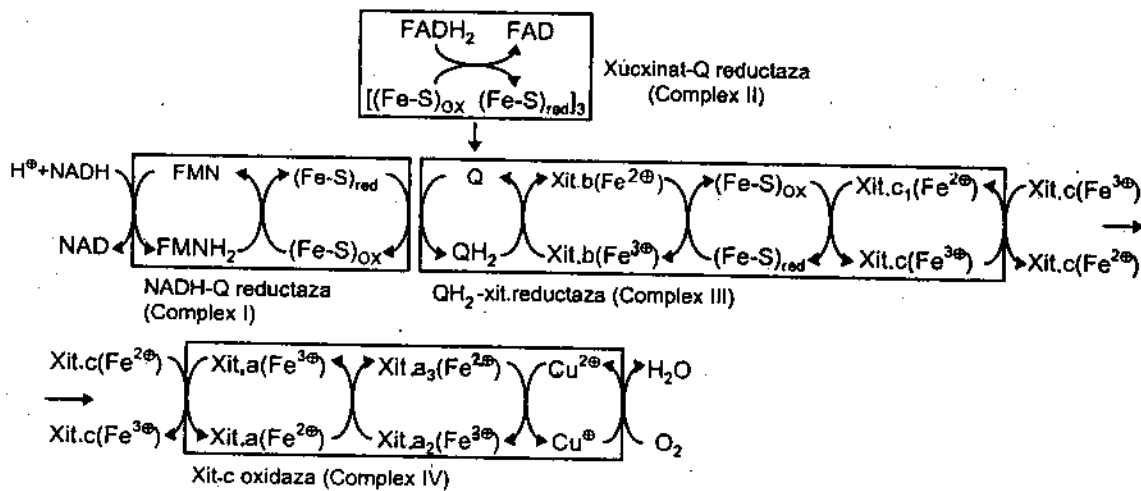




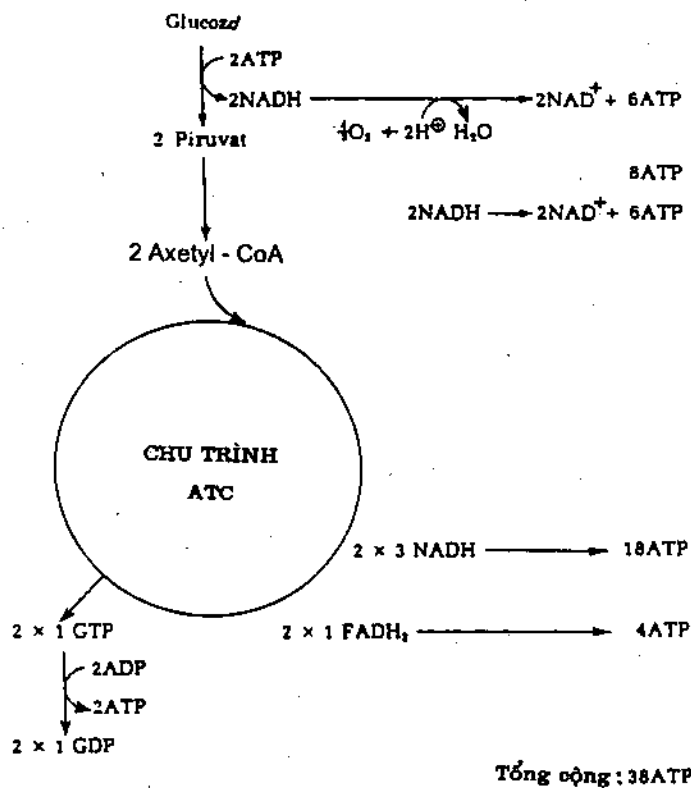
Chuỗi hô hấp trong quá trình oxy hóa sinh học (biological oxidation)



Sơ đồ chuỗi hô hấp



Chuỗi vận chuyển electron trong hô hấp



Sự sản sinh năng lượng từ chu trình ATC và chuỗi hô hấp

Một số chất độc tác dụng lên chuỗi hô hấp :

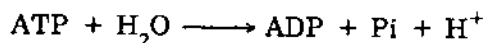
- Amital, rotenon, pierixidin A và độc tố dịch hạch kìm hãm NADH dehydrogenaza. Rotenon gặp trong hạt củ đậu (*Pachishizus erosus*) và cây dây mật (*Derris elliptica*) được sử dụng làm chất trừ sâu.
- Antimixin A kìm hãm giữa xit. b và c.
- Xianit (CN^-) và CO kìm hãm xit.oxidaza

Trong quá trình vận chuyển $2[\text{H}]$ từ NADH_2 đến O_2 có 3 bước chuyển e liên quan đến tạo thành ATP và được biểu thị bằng hệ số P/O (mol ATP/mol nguyên tử oxi). Hệ số P/O = 3 khi $2[\text{H}]$ được chuyển qua NAD^+ và P/O = 2 khi $2[\text{H}]$ từ xucxinat qua FAD đến O_2 .

Do đó 1 mol glucosơ phân giải qua con đường EMP và chu trình ATC và tất cả hidro tách ra đều được chuyển vào chuỗi hô hấp để tạo thành H_2O sẽ cho tổng cộng 38ATP. Sự tính toán trên đúng với ti thể và một số vi khuẩn. Tuy nhiên ở hầu hết vi khuẩn, do chỉ có 2 vị trí photphoryl hóa (P/O = 2) nên sự hô hấp glucosơ hiệu quả, chẳng hạn ở *E.coli*, chỉ cho 26ATP.

Cơ chế photphoryl hóa oxi hóa (tức sự tạo thành ATP trong chuỗi hô hấp) được giải thích theo thuyết hóa thẩm thấu của P.Mitchell (1979). Theo thuyết này, màng tế bào vi khuẩn và màng trong ti thể không thấm các ion kể cả H^+ và OH^- , và kém dẫn điện. Sự sắp xếp các protein của màng (các thành phần vận chuyển e, permeaza, ATP-sintaza...) khiến màng mang tính chất không đối xứng. Sự định hướng không gian của các phân tử enzym dẫn đến trao đổi chất có đặc tính vectơ. Chuỗi hô hấp bao gồm một dãy các chất vận chuyển hidro và e sắp xếp luân phiên trong màng. Do sự oxi hóa cơ chất mà phía trong màng có sự tiêu thụ H^+ và phía ngoài màng giải phóng H^+ . Trong sự oxi hóa NADH_2 6H^+ đã được vận chuyển ra phía ngoài qua 3 nấc. Việc vận chuyển proton do hô hấp làm xuất hiện một gradien điện hóa giữa 2 phía của màng. Thế proton này sẽ là động lực của sự photphoryl hóa nghĩa là sự tạo thành ATP. Quá trình được xúc tác bởi ATP - sintaza, enzym này chuyển năng lượng phát ra từ dòng e thành liên kết este photphat cao năng của ATP ; ATP-sintaza gặp ở các màng tham gia vào sự chuyển hóa năng lượng : màng ti thể, lục lạp và màng tế bào vi khuẩn, các enzym khá lớn (có khối lượng phân tử = 350.10^3). Có lẽ, dòng H^+ từ ngoài đã đi qua rãnh của ATP-sintaza (= yếu tố Fo-F_1) trở vào bên trong ti thể hoặc vi khuẩn, năng lượng thoát ra được dùng cho phản ứng photphoryl hóa (tạo thành ATP).

ATP - sintaza cũng xúc tác thủy phân ATP.

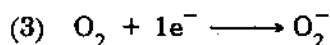
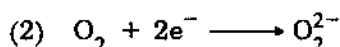
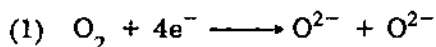


Phản ứng trên cần cho sự tạo thành gradien proton trong điều kiện kỵ khí. ATP xuất hiện ở mức độ photphoryl hóa cơ chất, H^+ tách ra cũng qua rãnh của ATP - sintaza chuyển ngược ra ngoài màng tế bào vi khuẩn. Gradien H^+ không chỉ cần cho sự photphoryl hóa oxi hóa (trong điều kiện có O_2) mà còn cần cho việc vận chuyển chủ động chất dinh dưỡng vào tế bào và sự chuyển động của tiên mao (nếu có).

200
198.19

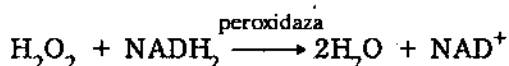
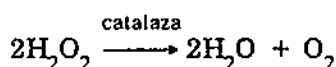
2.7. Tác dụng độc của O₂ lên vi khuẩn hiếu khí và kỵ khí

Trong tế bào có 3 loại hoạt hóa O₂ tùy theo số e được chuyển đồng thời đến O₂.



Phản ứng (1) do xit. -oxidaza xúc tác vận chuyển đồng thời 4e⁻ ; mỗi ion O²⁻ sẽ kết hợp với 2H⁺ tạo thành H₂O.

Phản ứng (2) đặc trưng cho một số enzym chứa flavin (gluco-oxidaza, oxidaza của axit amin, xantin - oxidaza), ion peroxit O₂²⁻ sẽ phản ứng với H⁺ thành H₂O₂. H₂O₂ độc đối với tế bào, chẳng hạn oxi hóa nhóm SH. Catalaza và peroxidaza phân giải H₂O₂, do đó có tác dụng bảo vệ tế bào



Flavoenzim gặp ở nhiều vi khuẩn kỵ khí và hiếu khí vì vậy hầu hết vi khuẩn hiếu khí đều chứa catalaza

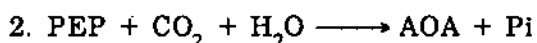
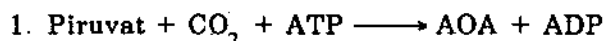
Phản ứng (3) được xúc tác bởi nhiều oxidaza (xantin - oxidaza, aldehyt - oxidaza, NADPH - oxidaza) ; ion supe - oxit O₂⁻ là gốc rất hoạt động. O₂⁻ và sản phẩm phản ứng của O₂⁻ với H₂O₂ (O₂⁻ + H₂O₂ + H⁺ → O₂ + H₂O + OH⁻) là gốc hydroxyl đều rất hoạt động, tạo thành trong tế bào các hợp chất phản ứng mạnh. Superoxit - dismutaza chuyển hóa gốc O₂⁻ nên có chức năng bảo vệ tế bào :



Do đó, enzym này cùng với catalaza chuyển gốc superoxit thành oxi vô hại (ở trạng thái cơ sở).

2.8. Các chu trình bổ sung và sự tạo thành glucozo

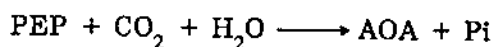
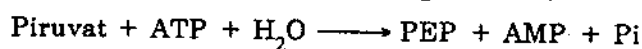
Trong quá trình sinh trưởng khi một hoặc một số chất trung gian của chu trình ATC được dùng cho sinh tổng hợp tế bào phải có các phản ứng bổ sung các chất trên đặc biệt AOA, nếu không chu trình sẽ ngừng hoạt động. Trong trường hợp nguồn C là glucozo, đường này được dùng để tổng hợp tất cả các thành phần của tế bào có chứa glucozo, ribozo, dezoxiribozo và các dẫn xuất khác chứa đường. Và các phản ứng bổ sung bảo đảm trước hết cho hoạt động liên tục của ATC. Hai phản ứng phổ biến bổ sung AOA là :



được xúc tác lần lượt bởi piruvat và PEP - cacboxylaza và gặp ở mô động vật (gan, thận) cũng như ở một số *pseudomonas*.

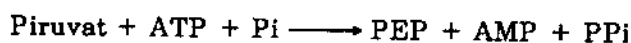
Khi sinh trưởng trên lactat, piruvat và các hợp chất C_3 khác tế bào còn phải tạo thành các chất trung gian cần cho tổng hợp đường. Việc tổng hợp đường từ lactat diễn ra qua các chất trung gian như trong đường phân. Tuy nhiên các phản ứng 1,3 và 10 là không thuận nghịch, phản ứng theo hướng tổng hợp glucozo cần năng lượng và do 3 enzym khác xúc tác.

Ở *E.coli* và các vi khuẩn khác diễn ra phản ứng :

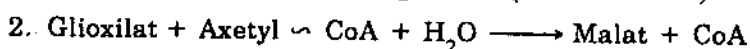
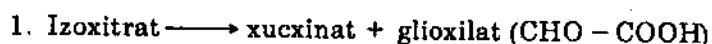


do PEP - sintetaza và PEP - cacboxylaza lần lượt xúc tác. *E.coli* thiếu piruvat - cacboxylaza.

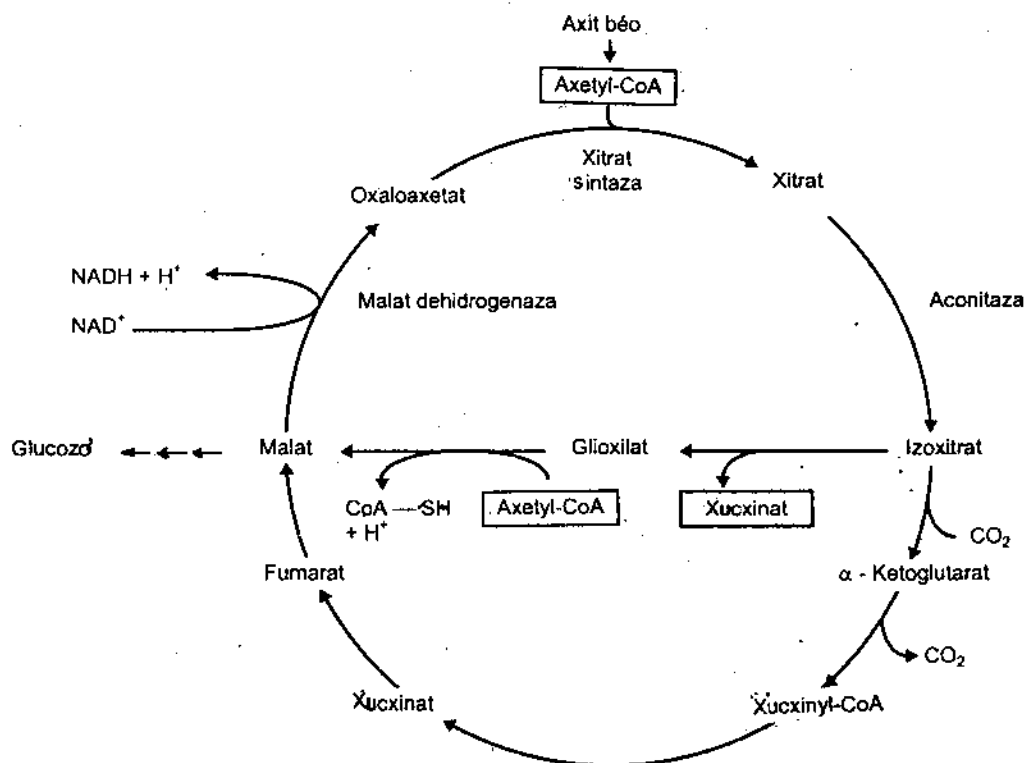
Vi khuẩn *Propionic*, *Acetobacter aceti*, một số vi khuẩn quang dưỡng còn chứa piruvat - ortophotphat - dikinaza xúc tác phản ứng :



Đặc biệt, sinh trưởng của vi sinh vật trên axetat hoặc các hợp chất mà sự phân giải dẫn tới axetat (axit béo, hidrocacbu) diễn ra nhờ chu trình glioxilat (chu trình Krebs - Kornberg) qua 2 phản ứng :



do izoxitrat - liaza và malat - sintaza lần lượt xúc tác Malat được chuyển thành piruvat nhờ malat - enzym, và AOA thành PEP nhờ PEP - cacboxykinaza. Mặt khác AOA vẫn được dùng làm chất nhận axetyl \sim CoA để tổng hợp xitrat (chu trình ATC và glioxilat diễn ra đồng thời-sơ đồ dưới đây) và dùng làm tiền chất cho sinh tổng hợp axit amin.



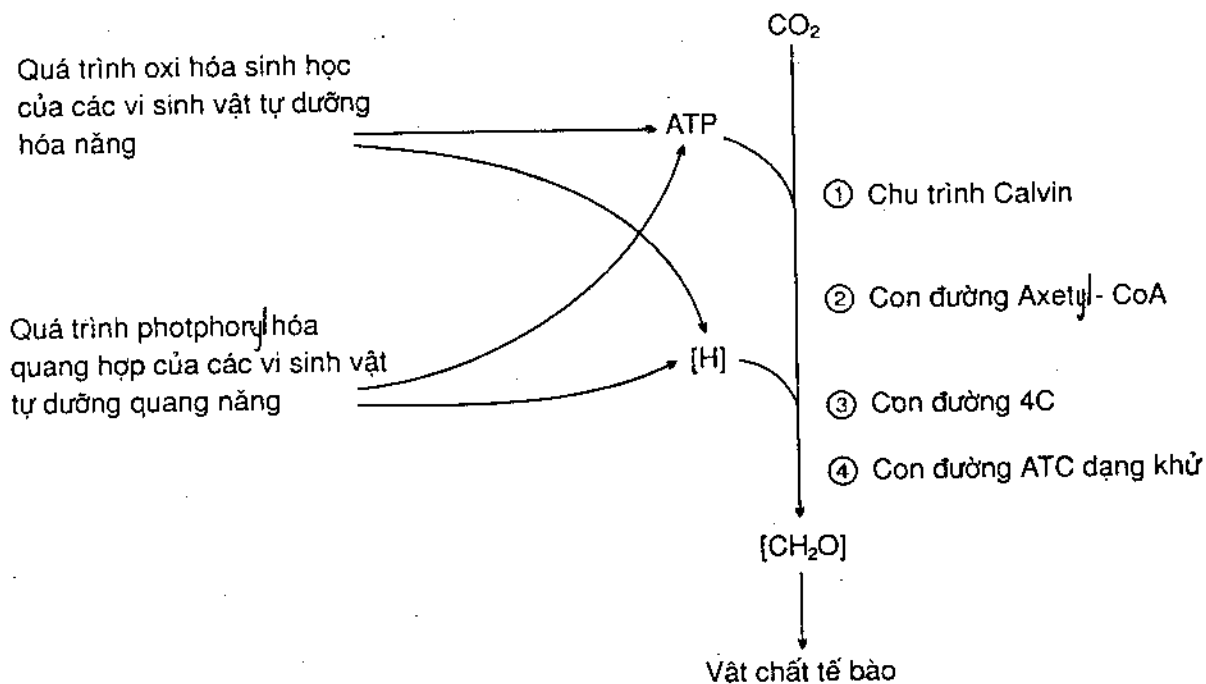
3. SỰ OXI HÓA SINH HỌC, SINH NĂNG LƯỢNG VÀ CỐ ĐỊNH CO_2 Ở CÁC VI SINH VẬT TỰ DƯỠNG

Nguồn năng lượng đầu tiên của vi sinh vật dị dưỡng và vi sinh vật tự dưỡng tuy rất khác nhau nhưng bản chất của quá trình oxi hóa sinh học của chúng là giống nhau, đều bao gồm 3 giai đoạn : mất H, chuyển H và tiếp nhận H, các phản ứng photphoryl hóa xảy ra trong quá trình oxi hóa đã giúp tạo ra ATP, nguồn năng lượng thông dụng cần thiết cho hoạt động sống.

Quá trình oxi hóa sinh học và sinh năng lượng ở vi sinh vật tự dưỡng có rất nhiều loại hình khác nhau, cơ chế khá phức tạp, một số quá trình ở nhiều nhóm vi khuẩn tự dưỡng hóa năng cho đến nay vẫn còn được hiểu biết rất ít. Dù là loại dinh dưỡng hóa năng vô cơ hoặc là loài dinh dưỡng quang năng vô cơ thì trong hoạt động sống của vi sinh vật phản ứng quan trọng nhất là đem CO_2 khử thành chất hữu cơ giản đơn ở dạng $[\text{CH}_2\text{O}]$, sau đó tiếp tục sinh tổng hợp thành các thành phần phức tạp của tế bào. Đó là một quá trình tiêu hao nhiều năng lượng và tiêu hao [H] có năng lực khử.

Trong các vi sinh vật dinh dưỡng hóa năng vô cơ tất cả ATP được sinh ra thông qua quá trình oxi hóa sinh học các chất vô cơ ở trạng thái khử, còn [H] có năng lực khử thì được sinh ra trong quá trình tiêu hao ATP để chuyển H vô cơ ($\text{H}^+ + \text{e}$) trong chuỗi hô hấp.

Trong các vi sinh vật tự dưỡng quang năng thì ATP và [H] được thu nhận từ quá trình photphoryl hóa quang hợp tuần hoàn, quá trình photphoryl hóa quang hợp không tuần hoàn hoặc quá trình photphoryl hóa quang hợp thông qua màng.



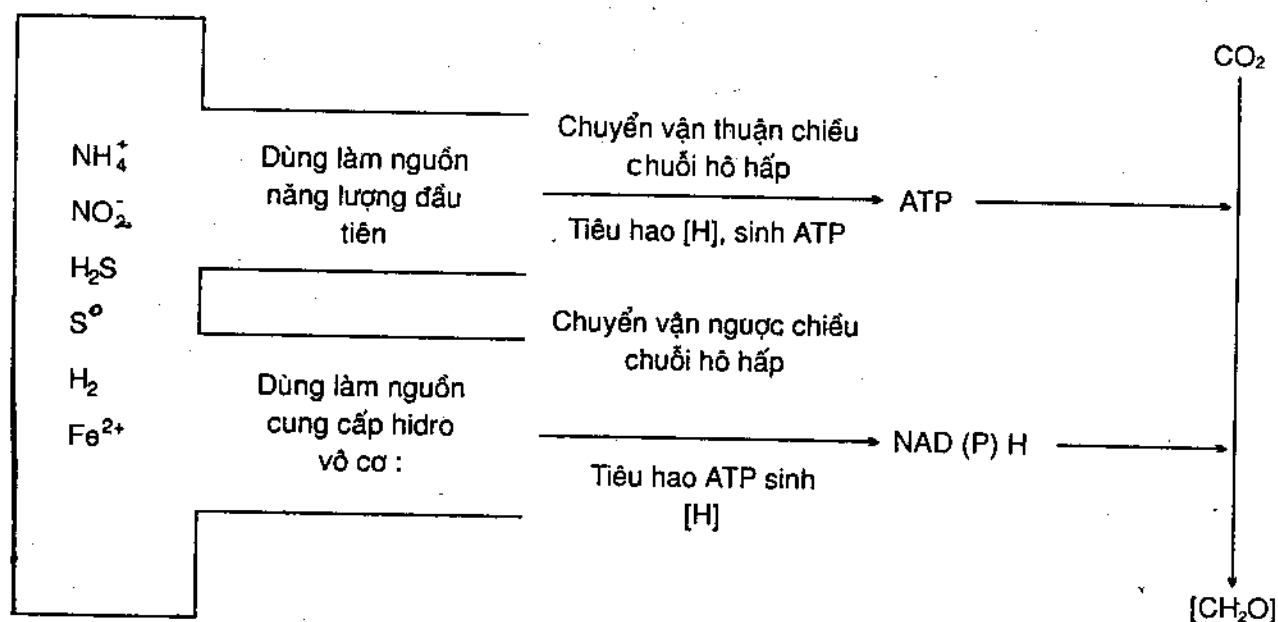
Điều kiện và con đường đồng hóa CO_2 ở 2 loại vi sinh vật tự dưỡng

3.1. Quá trình oxi hóa sinh học, sinh năng lượng

3.1.1. Nhóm tự dưỡng hóa năng

Vi khuẩn tự dưỡng hóa năng để khử được CO_2 cần ATP giàu năng lượng và cần $[\text{H}]$ có năng lực khử thông qua quá trình oxi hóa các cơ chất vô cơ (NH_4^+ , NO_2^- , H_2S , S^0 , H_2 , Fe^{2+}). Con đường sinh năng lượng chủ yếu dựa vào các quá trình oxi phosphoryl hóa của chuỗi hô hấp, do đó tuyệt đại đa số vi khuẩn tự dưỡng hóa năng là vi khuẩn hiếu khí. Chỉ có một số ít vi khuẩn tự dưỡng hóa năng là có đời sống kỵ khí, chúng tiến hành sự hô hấp thiếu oxi, do có thể sử dụng oxi trong nitrat hoặc cacbonat. Ngoài con đường sinh năng lượng thông qua chuỗi hô hấp, một số ít vi khuẩn lưu huỳnh, như các loài *Thiobacillus thioparus*, *T. denitrificans*, *T. ferrooxidans*, lúc sinh trưởng trong điều kiện có các hợp chất lưu huỳnh còn có thể phosphoryl một phần cơ chất để sinh năng lượng.

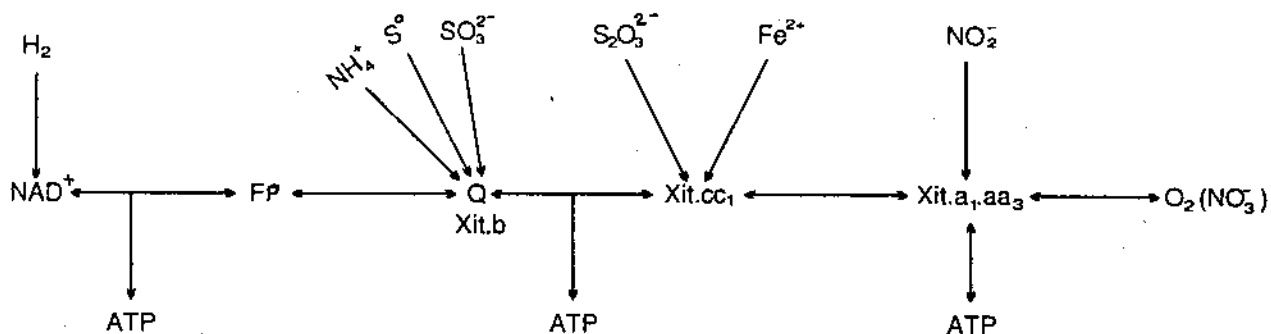
Cần thấy rõ vi sinh vật tự dưỡng hóa năng không những cần tiêu hao ATP lúc khử CO_2 mà còn cần tiêu hao nhiều ATP cả lúc sản sinh $[\text{H}]$ có năng lực khử.



Nguồn ATP và $[\text{H}]$ của vi sinh vật tự dưỡng hóa năng lúc khử CO_2

Chỉ có dựa vào ATP sinh ra mới có thể thông qua phương thức chuỗi hô hấp để đem H^+ vô cơ ($\text{H}^+ + e$) biến thành $[\text{H}]$ có năng lực khử để dùng vào việc khử CO_2 .

Tất cả các chất vô cơ ở trạng thái khử, trừ H_2 , đều có thế oxi hóa khử cao hơn NAD^+/NADH , do đó lúc oxi hóa các cơ chất vô cơ đều cần có vị trí tương ứng để tham gia vào chuỗi hô hấp, và tất nhiên việc tạo thành hiệu suất oxi hóa phosphoryl hóa (P/O) của chuỗi hô hấp ở vi khuẩn tự dưỡng hóa năng là rất thấp.



Vị trí electron tham gia vào chuỗi hô hấp sau khi có chất vô cơ mất hidro (chiều xuôi là chiều có thể sinh ATP, chiều ngược là chiều tiêu hao ATP và sản sinh [H] có năng lực khử)

Do các nguyên nhân hiệu suất sinh năng lượng thấp, tốc độ sinh trưởng và hiệu suất sinh trưởng của vi khuẩn tự dưỡng hóa năng là rất thấp cho nên người ta còn nghiên cứu rất ít về quá trình oxi hóa sinh học và trao đổi năng lượng ở các vi khuẩn này. Nếu so sánh với vi sinh vật dị dưỡng, quá trình trao đổi năng lượng của vi khuẩn tự dưỡng hóa năng chủ yếu có 3 đặc điểm sau đây :

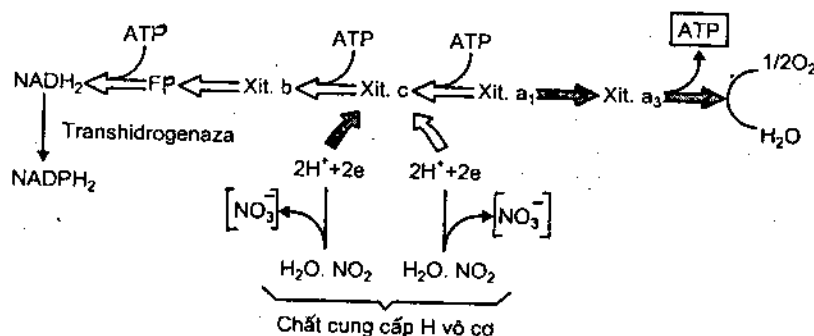
- Quá trình oxi hóa trực tiếp cơ chất có liên hệ với chuỗi hô hấp. Do dehydrogenaza và oxi-reductaza xúc tác, cơ chất vô cơ sẽ mất hidro và mất electron, sau đó tham gia vào chuỗi hô hấp. Điều này khác hẳn với quá trình trao đổi chất phức tạp theo các con đường EMP và ATC để oxi hóa glucôzơ ở các vi sinh vật dị dưỡng.

- Thành phần của chuỗi hô hấp được đa dạng hóa hơn hidro và electron có thể từ nhiều thành phần khác nhau tham gia vào chuỗi hô hấp.

- Hiệu suất sinh năng lượng, tức là tỉ lệ P/O nói chung thấp hơn so với các vi sinh vật dị dưỡng.

Dưới đây nêu lên một số ví dụ về các vi sinh vật tự dưỡng hóa năng :

Vi khuẩn nitrat hóa thuộc chi *Nitrobacter* dùng nitrit làm nguồn năng lượng. Có thể biểu thị chuỗi hô hấp của vi khuẩn nitrat hóa như sau :

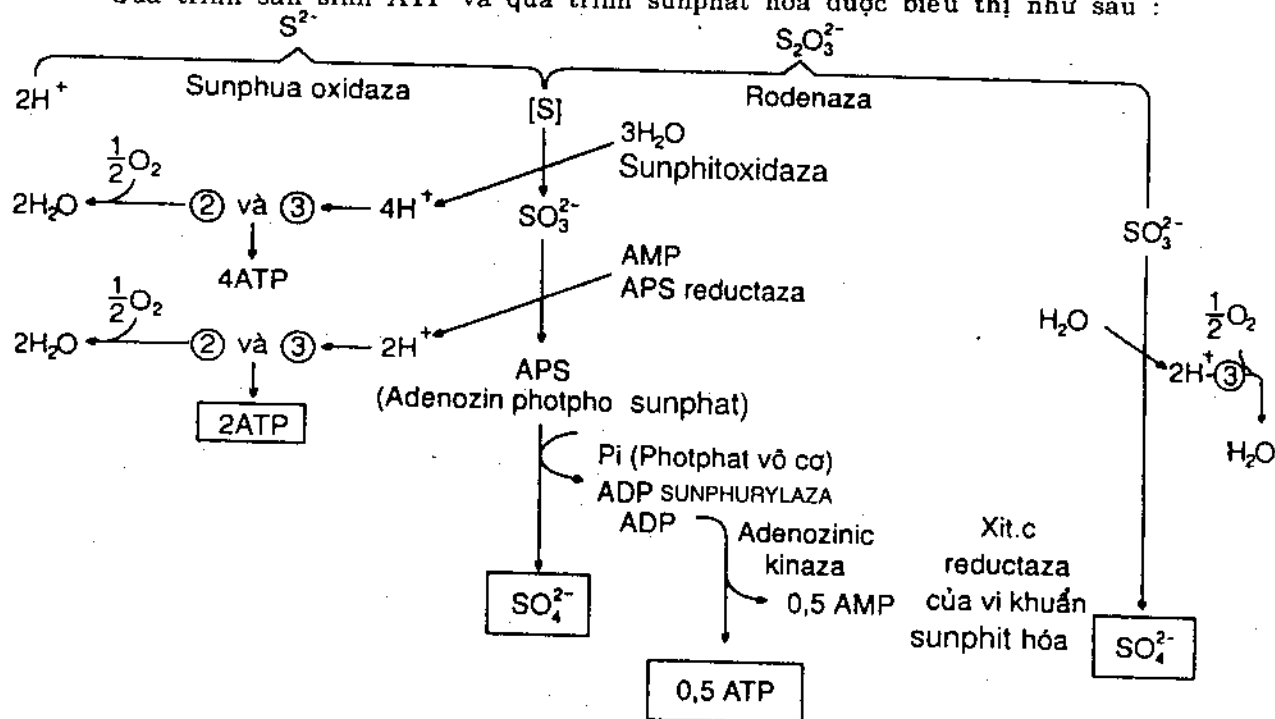


Chuỗi hô hấp của vi khuẩn nitrat hóa

Vi khuẩn lưu huỳnh, trong đó nhiều loài thuộc chi *Thiobacillus*, sử dụng một loại hay nhiều loại hợp chất lưu huỳnh (H_2S , S^0 , $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$, $\text{S}_4\text{O}_6^{2-}$) làm nguồn năng lượng. Chúng chuyển các hợp chất lưu huỳnh, S^0 nguyên tố hoặc các muối sunphit (chứa SO_3^{2-}), sau đó oxi hóa thành sunphat.

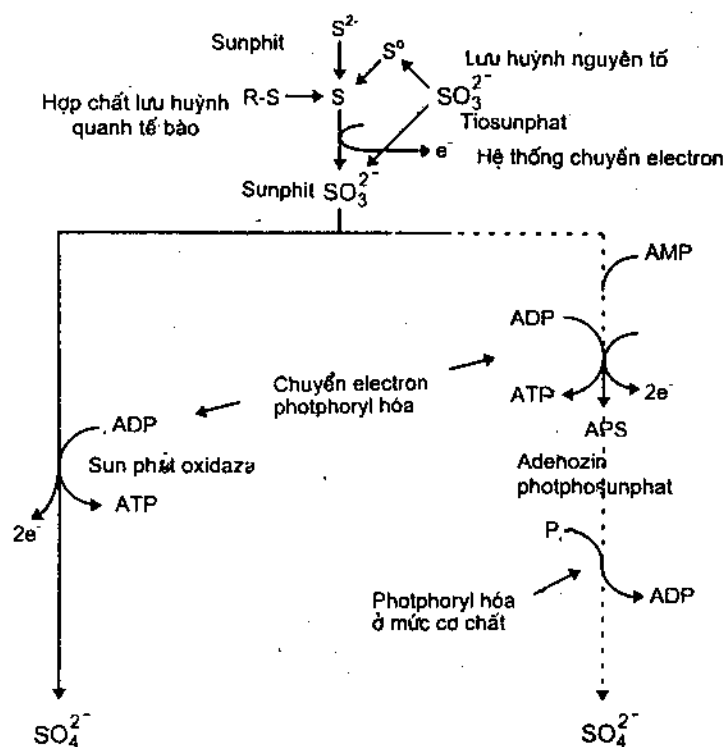
Nhóm vi khuẩn lưu huỳnh	Chất cho electron	pH thích hợp để sinh trưởng
<i>Thiobacillus thioparus</i>	H_2S , sunphit, S^0 , $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$	6 - 8
<i>T. denitrificans</i>	H_2S , S^0 , $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$	6 - 8
<i>T. neapolitanus</i>	S^0 , $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$	6 - 8
<i>T. thiooxidans</i>	S^0	2 - 4
<i>T. ferrooxidans</i>	S^0 , sunphit, Fe^{2+}	2 - 4
<i>T. novellus</i>	$\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$	6 - 8
<i>T. intermedius</i>	$\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$	3 - 7
<i>Beggiatoa</i>	H_2S , $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$	6 - 8
<i>Thiothrix</i>	H_2S	6 - 8
<i>Thiomicrospira</i>	$\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$, H_2S	6 - 8
<i>Thiosphaera</i>	H_2S , $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$, H_2	6 - 8
<i>Thermothrix</i>	H_2S , $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$, SO_3^{2-}	6,5 - 7,5
<i>Sulfolobus</i>	H_2S , S^0	1 - 5
<i>Acidianus</i>	S^0	1 - 5

Quá trình sản sinh ATP và quá trình sunphat hóa được biểu thị như sau :



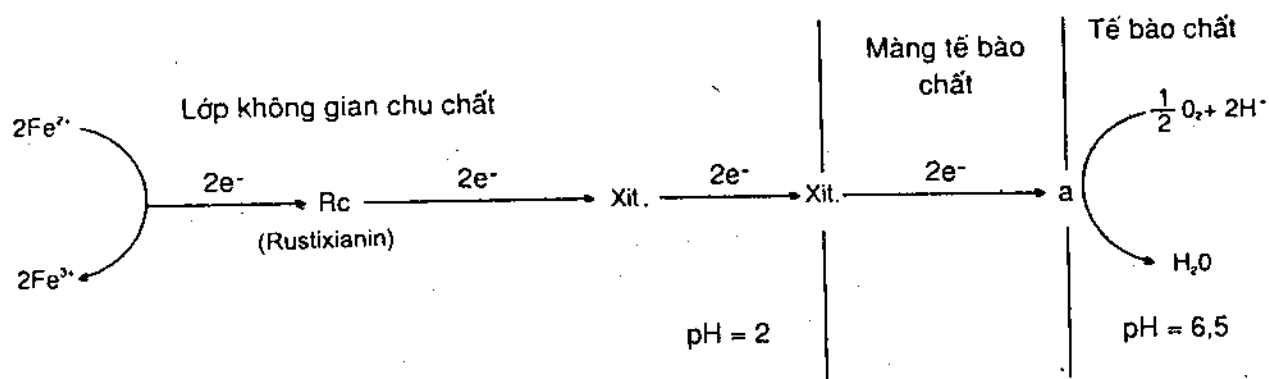
Chú thích : ② và ③ là biểu thị vị trí của ATP sinh ra trên chuỗi chuyển electron

Các bước oxi hóa các hợp chất lưu huỳnh ở vi khuẩn *Thiobacillus* còn có thể biểu thị như sau :



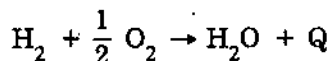
Vi khuẩn oxi hóa sắt trong điều kiện pH thấp có thể sử dụng năng lượng sinh ra do oxi hóa Fe^{2+} để sinh trưởng và phát triển. Đã phát hiện ra chất rustixianin (rusticyanin), một loại protein chứa đồng, trong chuỗi hô hấp của vi khuẩn oxi hóa sắt. Chúng cùng với các enzym oxi hóa vài loại xitocrom C và 1 loại xitocrom a_1 (có chứa 2 hemoglobin a) tạo thành chuỗi chuyển electron.

Quá trình chuyển electron khi vi khuẩn thực hiện việc oxi hóa sắt (Fe^{2+}) có thể biểu thị như sau :

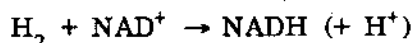


Vi khuẩn oxi hóa hidro còn gọi là vi khuẩn hidro. Đây là nhóm vi khuẩn tự dưỡng hóa năng vô cơ không bắt buộc, nơi khác chúng có thể là vi khuẩn tự dưỡng hóa năng hữu cơ nếu có mặt chất hữu cơ. Đại diện của nhóm vi khuẩn này có thể thuộc G^- (như *Acidovorax facilis*, *Alcaligenes eutrophus*, *A. ruhlandii*, *Aquaspirillum autotrophicum*, *Pseudomonas carboxydovorans*, *Hydrogenophaga flava*, *Seliberia carboxyhydrogena*, *Paracoccus denitrificans*, *Aquifex pyrophilus*, *Hydrogenobacter* spp.), cũng có thể thuộc G^+ (như *Bacillus schlegelii*, *Arthrobacter* sp., *Mycobacterium gordonae*...).

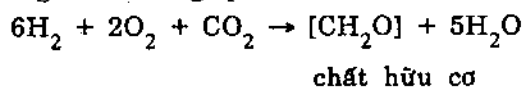
Chúng có thể oxi hóa H_2 thành H_2O và sản sinh ra năng lượng tích lũy vào ATP :



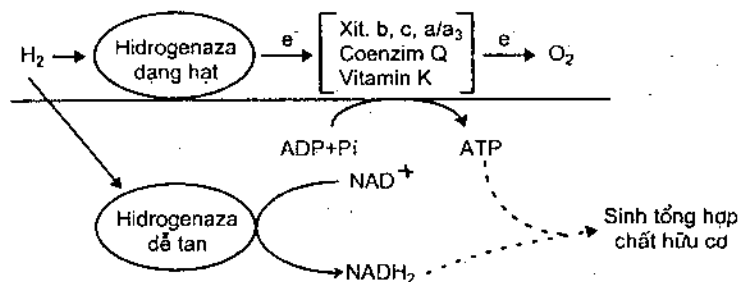
Enzim xúc tác cho quá trình oxi hóa này là hydrogenaza. Enzim này làm hoạt hóa H_2 và khử NAD^+ :



Theo chu trình pentozophotphat ATP và NADH (+ H^+) sẽ sử dụng để khử CO_2 thành chất hữu cơ. Phương trình tổng quát là :

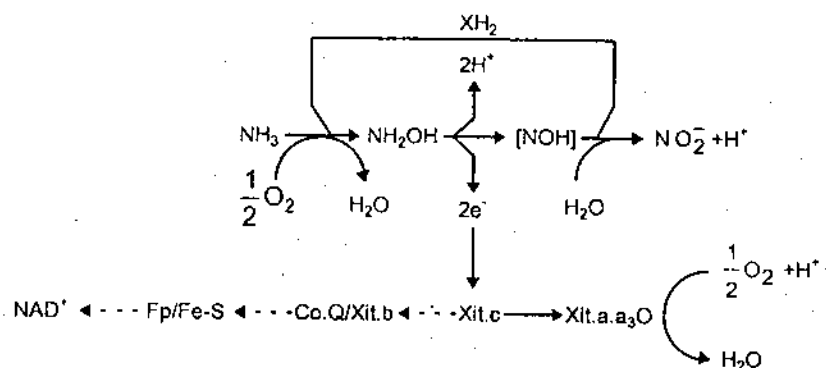


Có 2 loại hydrogenaza tham gia vào quá trình này : hydrogenaza dạng hạt và hydrogenaza dễ tan :



Vi khuẩn oxi hóa amon còn gọi là vi khuẩn nitrit hóa. Chúng là những vi khuẩn hình que (*Nitrosomonas*), hình cầu (*Nitrosococcus*), hình dấu phẩy (*Nitrosovibrio*), hình xoắn (*Nitrospira*), hình đa dạng (*Nitrosolobus*).

Cơ chế của quá trình oxi hóa amon có thể biểu thị như sau :



Chú thích : F_p = Flavoprotein

Fe - S = Protein Fe - S

CoQ = Quinon (Coenzim Q)

Xit. = Xitocrom

3.1.2 - Nhóm tự dưỡng quang năng

Các loại sinh vật có khả năng quang hợp gồm các nhóm sau đây :

Sinh vật dinh dưỡng quang năng

A. Có sản sinh oxi

+ Thuộc nhóm có nhân thật : Tảo, cây xanh

+ Thuộc nhóm nhân nguyên thủy : Vi khuẩn lam

B. Không sản sinh oxi : vi khuẩn quang hợp

Vi khuẩn quang hợp được xếp chung vào bộ Rhodospirillales, chúng bao gồm các nhóm sau đây :

a. Bộ phụ Rhodospirillineae

- Họ Chromatiaceae : chi *Chromatium* và 9 chi khác
- Họ Rhodospirillaceae : các chi *Rhodopseudomonas*, *Rhodospirillum*...

b. Bộ phụ Chlorobineae

- Họ Chlorobiaceae : Chi *Chlorobium* và 4 chi khác
- Họ Chloroflexaceae : Chi *Chloroflexus*

Tất cả các vi khuẩn quang hợp đều có chứa sắc tố quang hợp. Ở thực vật sắc tố quang hợp là clorophin (chlorophyll, viết tắt là chl). Sắc tố quang hợp ở vi khuẩn được gọi là bacterio-clorophin (bacteriochlorophyll, viết tắt là bchl). Clorophin và bacteriochlorophin còn được gọi là chất diệp lục và chất khuẩn lục. Chất diệp lục, chất khuẩn lục và huyết sắc tố có cấu trúc tương tự nhau. Đó là một vòng pocphirin do 4 nhân pirol liên kết với nhau. Lõi của chất diệp lục và chất khuẩn lục là Mg còn lõi của chất huyết sắc là Fe, chất diệp lục a khác với chất khuẩn lục a, b, c, d, e ở 7 gốc R (từ R₁ đến R₇). Có thể thấy rõ sự khác nhau này trong bảng sau đây :

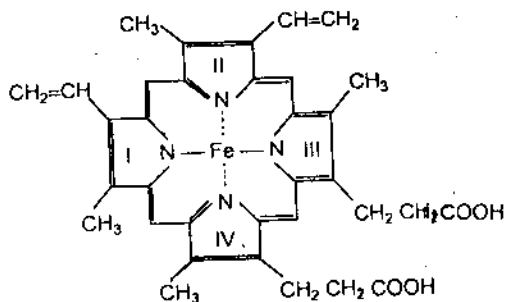
Sự khác nhau giữa chất diệp lục và các chất khuẩn lục :

Sắc tố	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	R ₇
Chất diệp lục a	-CH=CH ₂	-CH ₃	-CH ₂ -CH ₃	-CH ₃	$\begin{array}{c} -C-O-CH_3 \\ \\ O \end{array}$	-C ₃₀ H ₃₉ OH	-H
Chất khuẩn lục a	$\begin{array}{c} -C-CH_3 \\ \\ O \end{array}$	-CH ₃ ^a	-CH ₂ -CH ₃ ^a	-CH ₃	$\begin{array}{c} -C-O-CH_3 \\ \\ O \end{array}$	$\begin{array}{l} -C_{30}H_{39}OH \\ -C_{20}H_{33}OH \end{array}$	-H
Chất khuẩn lục b	$\begin{array}{c} -C-CH_3 \\ \\ O \end{array}$	-CH ₃ ^b	$\begin{array}{c} =C-CH_3^b \\ \\ H \end{array}$	-CH ₃	$\begin{array}{c} -C-O-CH_3 \\ \\ O \end{array}$	-C ₃₀ H ₃₉ OH	-H
Chất khuẩn lục c	$\begin{array}{c} H \\ \\ -C-CH_3 \\ \\ OH \end{array}$	-CH ₃	$\begin{array}{l} -C_4H_9 \\ -CH_2-CH_3 \\ -C_3H_7 \end{array}$	$\begin{array}{l} -C_2H_5 \\ -CH_3 \end{array}$	-H	-C ₁₅ O ₂₅ OH	-CH ₃
Chất khuẩn lục d	$\begin{array}{c} H \\ \\ -C-CH_3 \\ \\ OH \end{array}$	-CH ₃	$\begin{array}{l} -C_2H_5 \\ -C_3H_7 \\ -C_4H_9 \end{array}$	$\begin{array}{l} -C_2H_5 \\ -CH_3 \end{array}$	-H	-C ₁₅ H ₂₅ OH	-H
Chất khuẩn lục e	$\begin{array}{c} H \\ \\ -C-CH_3 \\ \\ OH \end{array}$	$\begin{array}{c} -C-H \\ \\ O \end{array}$	$\begin{array}{l} -C_2H_5 \\ -C_3H_7 \\ -C_4H_9 \end{array}$	-C ₂ H ₅	-H	-C ₁₅ H ₂₅ OH	-CH ₃

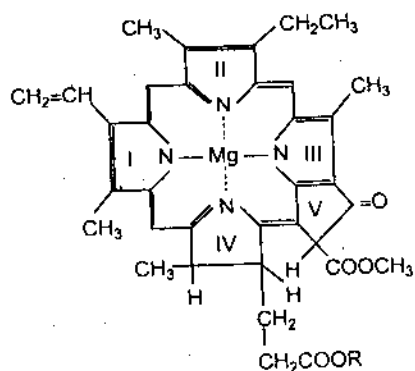
Chú thích : a. Giữa C₃ và C₄ không có nối đôi, không thêm H.

b. Giữa C₃ và C₄ không có nối đôi, C₃ có thêm H.

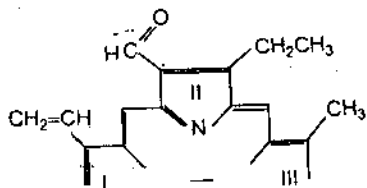
Có thể thấy rõ hơn sự phân biệt của vài loại chrophin, bacterioclorophin, hem... bằng cách quan sát hình sau đây :



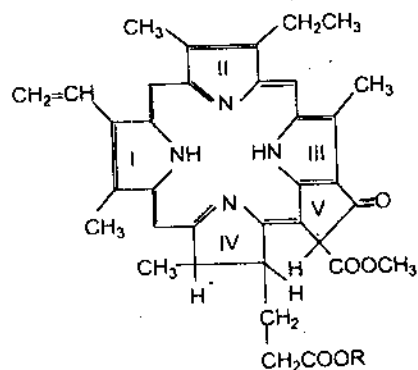
Hem (Protoporphyrin IX)



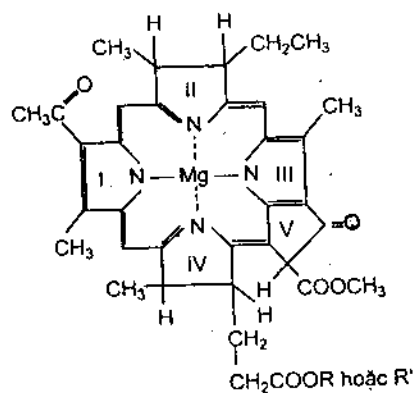
Chlorophyll a



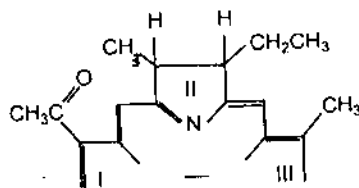
Chlorophyll b



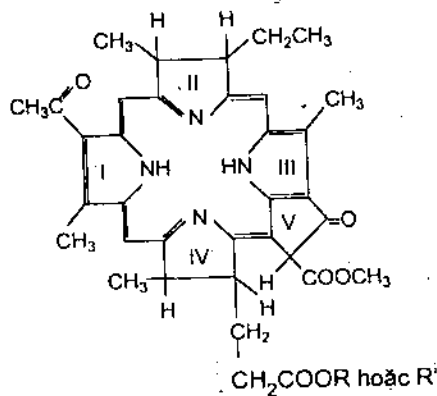
Pheophytin a (Pheophytin a)



Bacterioclorophyll a

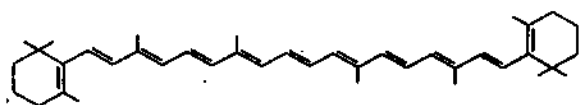


Bacterioclorophyll b

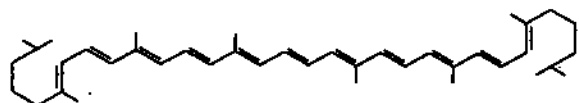


Bacteriopheophytin a (Bacteriopheophytin a)

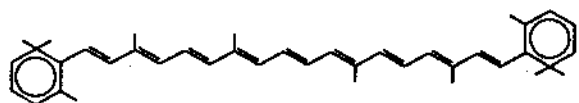
Ngoài các loại clorophin vi khuẩn tự dưỡng quang năng còn có chứa một số các sắc tố thuộc loại carotenoid. Carotenoid ở vi khuẩn không giống với carotenoid ở tảo hoặc ở thực vật. Dưới đây là vài ví dụ :



β - Caroten ở tảo và cây xanh



Carotenoid ở vi khuẩn màu tía



Carotenoid ở vi khuẩn màu lục

Ở vi khuẩn tự dưỡng quang năng có 2 loại photphoryl hóa quang hợp : photphoryl hóa quang hợp tuần hoàn và photphoryl hóa quang hợp không tuần hoàn.

Kiểu tuần hoàn có thể biểu thị như sau :

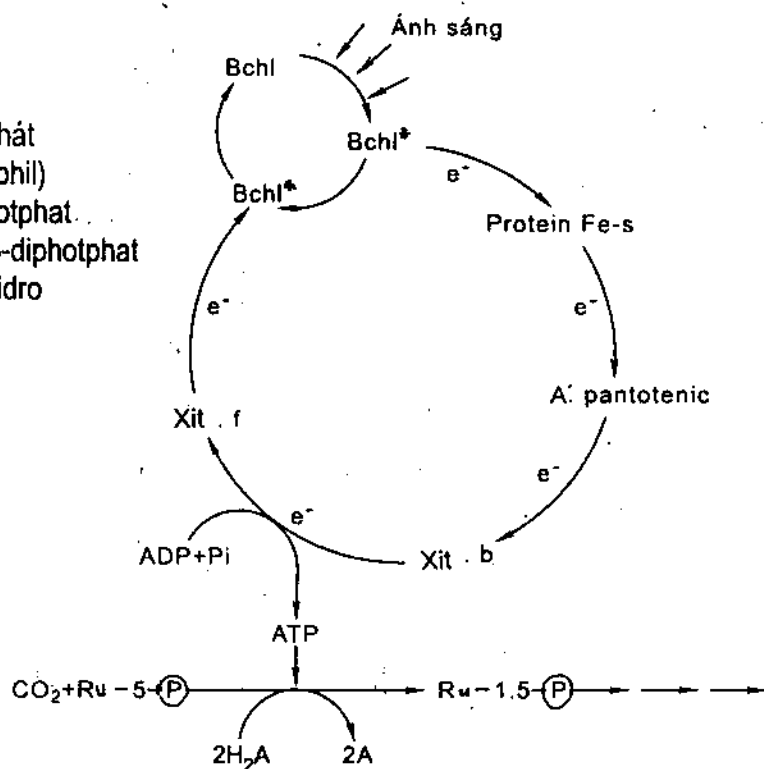
CHÚ THÍCH

Bchl* : trạng thái kích phát của Bchl (bacterioclorophil)

Ru-5-P : Ribulozơ-5-photphat

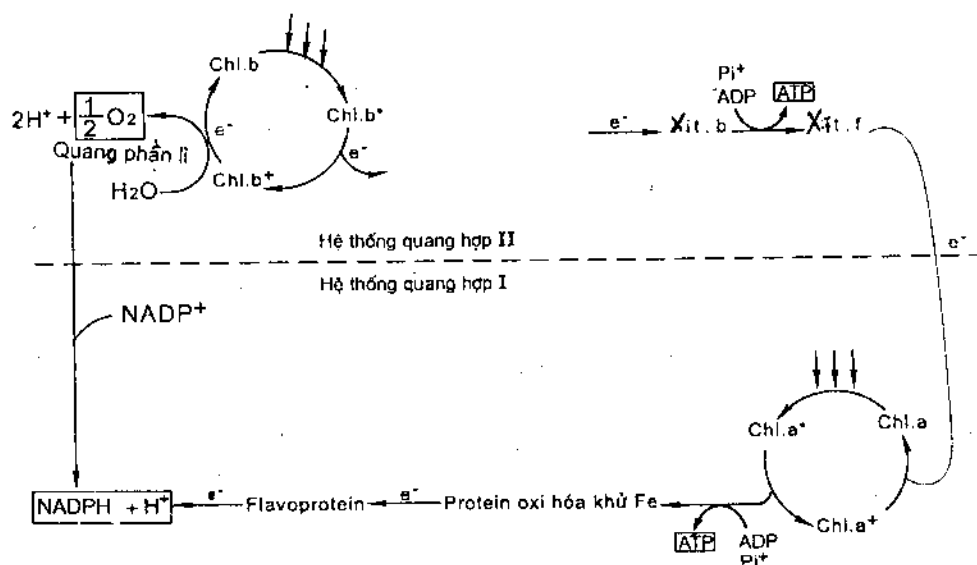
Ru-1,5-P : Ribulozơ-1,5-diphotphat

H₂A : Chất vô cơ cho hidro



Trong điều kiện kỵ khí một số vi khuẩn quang hợp có thể sử dụng năng lượng của ánh sáng để thực hiện phản ứng photophoryl hóa sản sinh ra ATP. Electron từ bacterioclorophin được tách ra dưới tác động của ánh sáng, sau đó tham gia vào chuỗi hô hấp tuần hoàn và quay trở lại Bchl. Trên đường đi đã sản sinh ra ATP. Việc sinh ra ATP được thực hiện riêng rẽ với việc sinh ra [H] có năng lực khử. [H] có năng lực khử được sinh ra từ các chất vô cơ cho hidro (như $H_2S...$). Quá trình quang hợp này không sản sinh ra oxi.

Kiểu không tuần hoàn có thể biểu thị như sau :



Chú thích : Chl. b* và Chl. a* là ở trạng thái kích phát.

Đây là kiểu phản ứng photophoryl hóa quang hợp gặp ở vi khuẩn lam và cũng tương tự như ở tảo và ở cây xanh. Ở đây chuỗi chuyển vận electron là không tuần hoàn vì vậy còn gọi là dòng chảy electron không tuần hoàn. Quang hợp xảy ra trong điều kiện có oxi và có 2 hệ thống quang hợp. Hệ thống quang hợp I có chứa Chl. a (chất diệp lục a) và có thể sử dụng được tia sáng đỏ (bước sóng dài). Hệ thống quang hợp II có chứa Chl. b và có thể sử dụng được tia sáng lam (bước sóng ngắn). Quá trình quang hợp này có sản sinh oxi và xảy ra đồng thời việc sinh ATP (ở hệ thống quang hợp II) và việc sinh [H] có năng lực khử. [H] có năng lực khử (trong $NADPH_2$) là H^+ và e^- , được sinh ra sau sự quang phân li nước (H_2O).

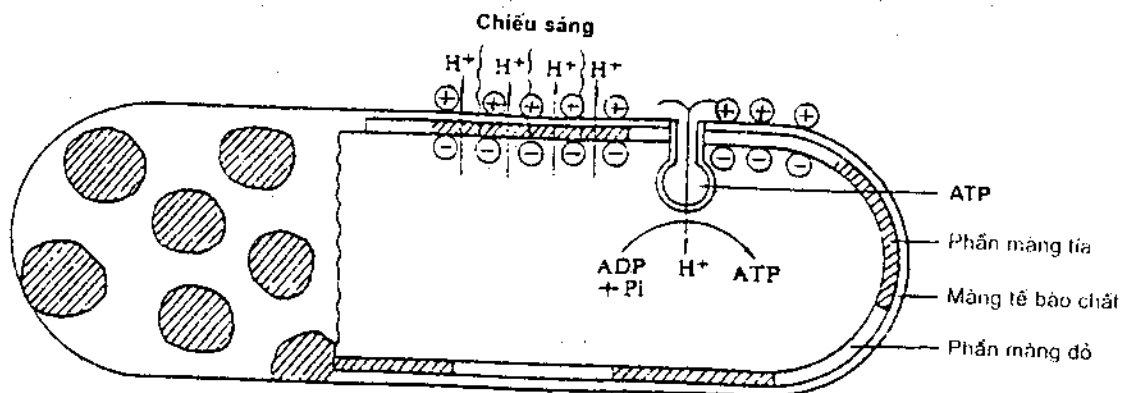
Sau quang phân li nước sản sinh ra $1/2 O_2 + 2H^+ + 2e^-$, electron sẽ liên tiếp đi qua chuỗi chuyển electron (I và II), sau cùng đem electron đến cho $NADP^+$ để sản sinh ra $NADPH + H^+$. Để tạo ra năng lực khử CO_2 , trong quá trình chuyển electron còn phát sinh 2 phản ứng photophoryl hóa để sinh ra ATP. Ở hệ thống I có sinh ra $NADPH_2$ và ATP, còn ở hệ thống II có sinh ra oxi và ATP.

Một số vi khuẩn ưa mặn tự dưỡng quang năng có quá trình quang hợp khá đặc biệt. Đại diện cho nhóm này là các vi khuẩn hay gặp trên các hải sản ướp muối (như vi khuẩn *Halobacterium halobium*, *H. cutirubrum...*)

Màng tế bào chất của chúng phân thành 2 phần : phần màu đỏ và phần màu tía. Phần màu đỏ có chứa xitocrom, flavoprotein... của chuỗi hô hấp dùng để oxy hóa photophoryl hóa. Phần màu tía rất kì lạ. Trên màng hiện lên các vết khoang (đường

kính khoảng $0,5 \mu\text{m}$), phân bố độc lập với nhau, chiếm tới một nửa tổng diện tích của màng tế bào vi khuẩn. Màng này có khả năng thực hiện một quá trình quang hợp độc đáo. Có một loại protein gọi là bacteriorhodopsin, rất giống với rodopsin, loại protein có trong tế bào hình trụ ở trên võng mạc của mắt. Bacteriorhodopsin chiếm tới 75% màng màu tím.

Những vi khuẩn này có thể sinh trưởng được trong tối hoặc ngoài sáng nếu có mặt oxy, khi không có mặt oxy chúng chỉ sinh trưởng được ngoài sáng. Chúng có 2 con đường thu nhận năng lượng : một đường oxy hóa photphoryl hóa khi có oxy và một đường oxy hóa photphoryl khi được chiếu sáng (quang hợp). Tốc độ tạo ra ATP là cao nhất khi được chiếu sáng bằng bước sóng $550 - 600\text{nm}$.



3.2. Quá trình cố định CO_2

Năng lượng thu được từ các quá trình oxy hóa sinh học chủ yếu được các vi sinh vật tự dưỡng dùng để cố định CO_2 . Hiện nay người ta đã biết đến 3 con đường cố định CO_2 khác nhau ở vi sinh vật : chu trình Calvin, con đường axetyl-CoA kị khí và chu trình ATC khử.

3.2.1. Chu trình Calvin :

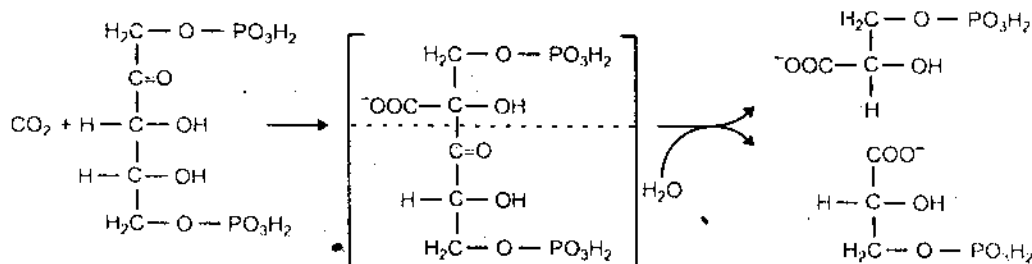
Chu trình này còn được gọi là chu trình Calvin - Bussham, chu trình Ribulose diphosphat, hoặc chu trình pentozo khử. Đây là con đường chủ yếu để cố định CO_2 ở vi khuẩn tự dưỡng hóa năng và tự dưỡng quang năng. Có 2 loại enzyme đặc trưng cho quá trình này, đó là photpho-ribulokinaza và ribulose cacboxylaza.

Có thể chia chu trình Calvin ra thành 3 giai đoạn :

- Phản ứng cacboxyl hóa :

3 phân tử Ru - 1,5 - (P) (ribulose - 1,5 - biphosphate) nhờ ribulose diphosphat cacboxylaza (ribulose biphosphate carboxylase) mà cố định được 3 CO_2 , tạo ra 6 phân tử glixerat - 3 - photphat.

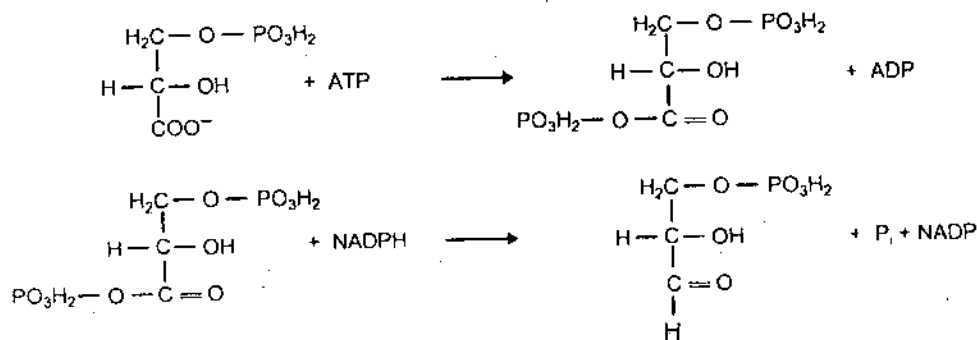
a)



Trong chu kì Calvin phản ứng cơ bản này xảy ra 3 lần :

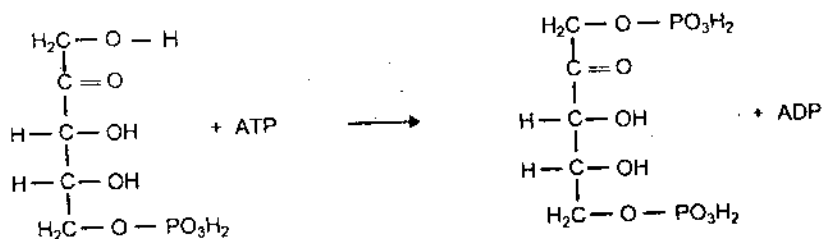
- Phản ứng khử : Sau phản ứng cacboxyl hóa lập tức xảy ra phản ứng nhóm cacboxyl trên glixerat - 3 - photphat thành nhóm aldehyt. Sự chuyển hóa này là thực hiện theo xu hướng của con đường EMP, tức là nhờ photphoglixerat kinaza mà photphoryl hóa thành 1,3 - diphotphoglixerat. Sau đó thông qua tác động của glixeraldehyt 3 photphat dehydrogenaza và NADPH mà khử 1,3 - diphotphoglixerat thành glixeraldehyt - 3 - photphat. Để hình thành 1 phân tử này cần tiêu dùng 6 ATP và 6 NADPH.

b)

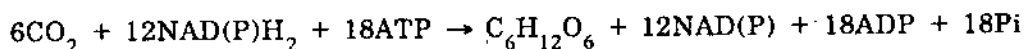


- Tái sinh thể nhận CO_2 : Trong chu trình Calvin ngoài việc hình thành phân tử glucôzơ từ glixeraldehyt - 3 - photphat thông qua con đường EMP, còn có việc hình thành 3 phân tử Ru - 1,5 - P. Sau đó lại tiếp tục tiếp thu các phân tử CO_2 .

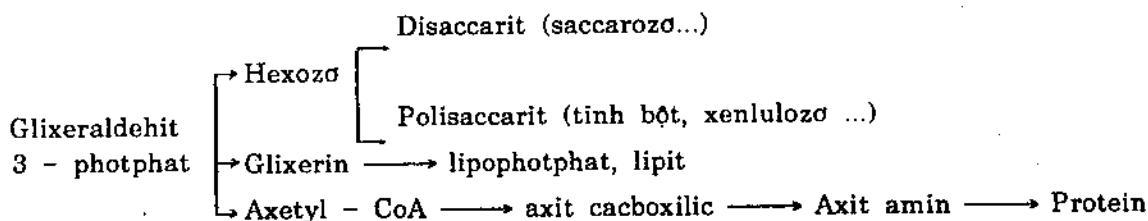
c)



Để sản sinh 1 phân tử glucôzơ thì theo chu trình Calvin có thể có công thức chung như sau :



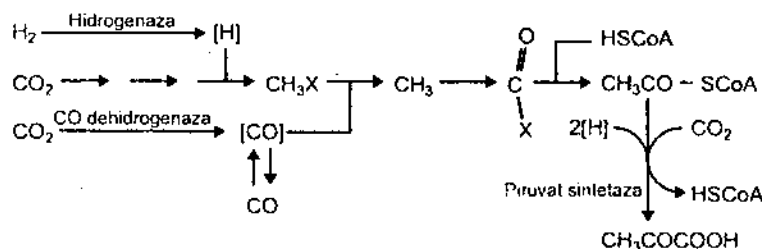
Từ glixeraldehyt - 3 - photphat tiếp tục tổng hợp ra các thành phần cần thiết của tế bào :



3.2.2. Con đường axetyl - CoA kỵ khí (anaerobic acetyl - CoA pathway)

Con đường này còn gọi là con đường axit axetic hoạt tính. Con đường này mới được phát hiện gần đây ở các vi khuẩn metan, khử sunphat...

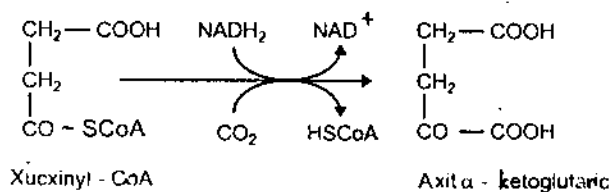
Chẳng hạn kết quả nghiên cứu ở vi khuẩn *Methanobacterium thermoautotrophicum* cho thấy như sau :



Theo con đường này, 1 phân tử CO_2 bị $[\text{H}]$ có năng lực khử thành $\text{CH}_3\text{-X}$, 1 phân tử CO_2 khác bị CO dehydrogenaza khử thành CO. Qua quá trình cacboxyl hóa CH_3X sẽ sinh ra axetyl-X, sau đó thành axetyl-CoA. Dưới sự xúc tác của piruvat sintetaza, axetyl-CoA sẽ tiếp thu 3 phân tử CO_2 để cacboxyl hóa thành axit piruvic. Axit piruvic thông qua các con đường trao đổi chất quen thuộc để tổng hợp ra các chất hữu cơ cần thiết cho tế bào.

3.2.3. Chu trình ATC khử

Con đường này gặp ở một số vi khuẩn quang hợp, chẳng hạn như ở vi khuẩn *Chlorobium thiosulfatophilum*. Ở đây CO_2 sẽ thông qua xuxinyl-CoA mà cacboxyl hóa khử hóa để được cố định lại. Ví dụ :



Khi so sánh 3 con đường cố định CO_2 nói trên người ta nhận thấy con đường cố định CO_2 kỵ khí là có hiệu quả kinh tế cao hơn so với con đường cố định CO_2 hiếu khí. Chẳng hạn, 3 mol CO_2 qua con đường axetyl-CoA kỵ khí để tổng hợp ra được 1 phân tử glixeraldehyt - 3 - photphat chỉ cần tiêu hao có 3 mol ATP, trong khi thông qua con đường ATC khử cần tiêu hao tới 5 mol ATP, còn nếu thông qua chu trình Calvin thì cần tiêu hao tới 9 mol ATP.

4. CÁC QUÁ TRÌNH LÊN MEN

Người ta gọi quá trình phân giải hidrat cacbon trong điều kiện kỵ khí là quá trình lên men. Lên men là quá trình oxi hóa khử cơ chất mà kết quả là một phần cơ chất bị khử còn một phần khác thì lại bị oxi hóa. Oxi phân tử không tham gia vào quá trình oxi hóa này mà ở đây sở dĩ có sự oxi hóa chỉ là do có việc tách hidro ra khỏi cơ chất. Hidro tách ra có thể được thải ra dưới dạng khí hoặc có thể lại được liên kết ngay với các sản phẩm phân giải của chính cơ chất hữu cơ đó. Năng lượng sinh ra trong quá trình lên men sẽ được chi phí một phần cho các phản ứng khử, ngoài ra còn được tích lũy lại một phần trong các liên kết cao năng. Ở đây rõ ràng năng lượng sinh ra trong các quá trình lên men không thể nhiều như trong các quá trình hô hấp hiếu khí.

Trong quá trình lên men NADH sinh ra khi đường phân (chu trình EMP) sẽ không được chuyển đến oxi phân tử thông qua chuỗi chuyển điện tử nối tới ở phần trên. Việc tái tạo NAD⁺ được thực hiện nhờ tác dụng với axit piruvic hoặc các hợp chất sinh ra từ axit piruvic.

Trong tế bào của các vi sinh vật kỵ khí bắt buộc, người ta không thấy có sự có mặt của nhiều loại men hô hấp (xitocrom a, b, c, xitocromoxidaza, peroxidaza, catalaza...). Bảng sau đây cho thấy sự khác nhau về sự tồn tại của các men hô hấp trong một số loài vi khuẩn :

Vi khuẩn	Xitocrom			Xitocrom oxidaza	Feroxidaza	Catalaza
	a	b	c			
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Bacillus subtilis</i>	+	+	+	+	+	+
<i>B. anthracis</i>	+	+	+	+	+	+
<i>B. mesentericus</i>	+	+	+	+	+	+
<i>B. mycoides</i>	-	+	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i>	-	+	-	-	+	+
<i>Salmonella paratyphi</i>	+	+	-	-	+	+
<i>Proteus vulgaris</i>	+	+	-	-	+	+
<i>Shigella dysenteriae</i>	+	+	-	-	+	+
<i>Clostridium perfringens</i>	-	-	+	-	-	-
<i>C. tetani</i>	-	-	-	-	-	-
<i>C. sporogenes</i>	-	-	-	chưa nghiên cứu	chưa nghiên cứu	-
<i>C. botulinum</i>	-	-	-	-	-	-
<i>C. histolyticum</i>	-	-	-	-	-	-

Sản phẩm của một số quá trình lên men thông thường :

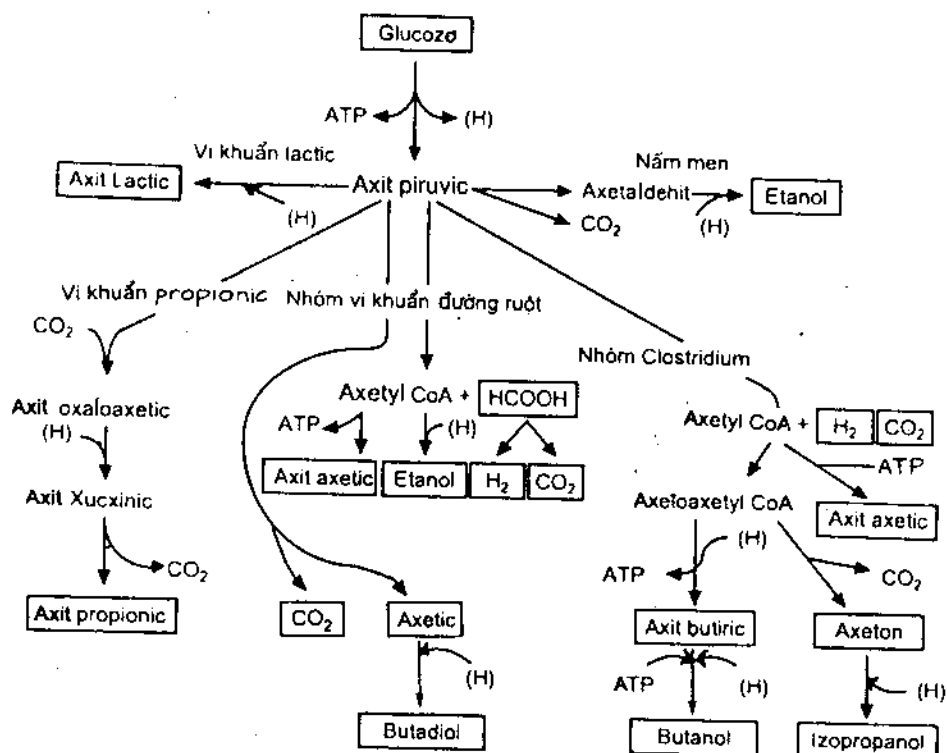
Sản phẩm		Loại lên men					
Tên	Công thức	1	2	3	4	5	6
Khí cacbonic	CO_2	+	+	+	+	+	+
Hydro	H_2	-	-	-	+	+	+
Axit foemic	HCOOH	-	-	-	+	+	+
- axetic	$\text{CH}_3\text{-COOH}$	+	-	+	+	+	+
- lactic	$\text{CH}_3\text{-CHOH-COOH}$	+	-	-	+	-	-
- propionic	$\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-COOH}$	-	-	+	-	-	-
- butiric	$\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-COOH}$	-	-	-	-	-	+
- succinic	$\text{HOOC-CH}_2\text{-CH}_2\text{-COOH}$	-	-	-	+	-	-
Rượu etilic	$\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{OH}$	+	+	-	+	+	+
Rượu izopropilic	$\text{CH}_3\text{-CH(OH)-CH}_3$	-	-	-	-	-	+
Rượu butilic	$\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-OH}$	-	-	-	-	-	+
Axeton	$\text{CH}_3\text{-CO-CH}_3$	-	-	-	-	+	+
Axetyl methyl cabinol	$\text{CH}_3\text{-CO-CHOH-CH}_3$	-	-	-	+	+	+
Butilen glicol	$\text{CH}_2\text{OH-CHOH-CHOH-CH}_2\text{OH}$	-	-	-	+	+	+
Glixerin	$\text{CH}_2\text{OH-CHOH-CH}_2\text{OH}$	-	+	-	+	-	-

Chú thích : 1 - lactic ; 2 - etilic ; 3 - propionic ; 4 - butilen-glicolic ;

5 - axeton-etilic ; 6 - axeton-butilic và butiric

Khác với hô hấp hiếu khí, sản phẩm cuối cùng của các quá trình lên men ngoài CO_2 , còn có cả những hợp chất cacbon chưa được oxi hóa hoàn toàn (như rượu, axit hữu cơ, keton, aldehyt). Việc chuyển hóa từ giai đoạn axit piruvic trở đi ở các vi sinh vật khác nhau là không giống nhau, tùy thuộc vào từng loại lên men và các sản phẩm tích lũy. Người ta thường dùng tên của sản phẩm điển hình được tích lũy trong từng loại lên men để gọi quá trình lên men ấy. Ví dụ khi tích lũy axit axetic là chủ yếu thì gọi là quá trình lên men lactic.

Cơ chế chung của một số quá trình lên men quan trọng có thể trình bày bằng sơ đồ sau đây :



Rõ ràng bên cạnh việc làm đứt các mạch cacbon, trong một số các quá trình lên men còn có sự tổng hợp, tức là quá trình làm dài thêm chuỗi cacbon. Chẳng hạn như vi khuẩn *Clostridium butyricum* có thể tạo thành axit butiric (chứa 4C) từ các hợp chất chứa 3C (glixerin và axit axetic).

Về các kiểu lên men, cơ chế phản ứng và các nhóm vi sinh vật chủ yếu gây ra các quá trình lên men này có thể trình bày tóm tắt trong bảng sau đây :

Các kiểu lên men chủ yếu :

Kiểu lên men	Cơ chế phản ứng	Vi sinh vật
Lên men etilic Lên men homolactic (lên men lactic đồng hình) Lên men heterolactic (lên men lactic dị hình)	Hexozơ → Etanol + CO ₂ Hexozơ → A. lactic Hexozơ → A. lactic Etanol CO ₂	Nấm men <i>Zymomonas</i> <i>Streptococcus</i> Một số <i>Lactobacillus</i> <i>Leuconostoc</i> Một số <i>Lactobacillus</i>
Lên men propionic	Lactat → Propionat Axetat CO ₂	<i>Propionibacterium</i> <i>Clostridium propionicum</i>
Lên men hỗn hợp axit	Hexozơ → Etanol 2,3-butanediol Xuccinat Lactat Axetat Format H ₂ + CO ₂	Vi khuẩn đường ruột : <i>Escherichia</i> <i>Salmonella</i> <i>Shigella</i> <i>Shigella</i> <i>Klebsiella</i> <i>Enterobacter</i> <i>Clostridium butyricum</i>
Lên men butiric	Hexozơ → Butirat Axetat H ₂ + CO ₂	<i>Clostridium butyricum</i>
Lên men butanol	Hexozơ → Butanol Axetat Axeton Etanol H ₂ + CO ₂	<i>Clostridium butyricum</i>
Lên men caproic	Etanol + Axetat + CO ₂ → Caproat + Butirat + H ₂ 4H ₂ + 2CO ₂ → Axetat	<i>Clostridium khuyveri</i> <i>Clostridium acetium</i> <i>Acetobacterium</i>
"Lên men" homoaxetic (lên men axetic đồng hình) "Lên men" metanogenic (lên men sinh metan)	Axetat → CH ₄ + CO ₂ 2C ₂ H ₂ + 3H ₂ O → Etanol + Axetat + H ⁺	<i>Methanothrix</i> <i>Methanosarcina...</i> <i>Pelobacter acetylenicus</i>
Lên men axetilen	4 Glixerol + 2HCO ₃ ⁻ → 7 Axetat + 5H ⁺ + 4H ₂ O	<i>Acetobacterium</i> spp.
Lên men resorxinol	2(C ₆ H ₄ OH) ₂ + 6H ₂ O → 4 Axetat + Butirat + 5H ⁺	<i>Clostridium</i> spp.
Lên men xinamat	2C ₉ H ₇ O ₂ + 2H ₂ O → 3 Axetat + 3H ⁺	<i>Pelobacter massiliensis</i> (<i>Pelobacter acidigallici</i>)
Lên men putresxin	10 C ₄ H ₁₄ N ₂ + 26H ₂ O → 6 Axetat + 7 butirat + 10NH ₄ + 16H ₂ + 13H ⁺	Một số vi khuẩn G ⁺ kị khí chưa định tên
"Lên men" xitrat	Xitrat + 2H ₂ O → Focmat + 2Axetat + HCO ₃ ⁻ + H ⁺	<i>Bacteroides</i> sp.

Lên men glioxilat	$4 \text{ Glioxilat} + 3\text{H}^+ + 3\text{H}_2\text{O} \rightarrow$	Một số vi khuẩn G ⁻ chưa định tên
Lên men xuxinat	$6\text{CO}_2 + 5\text{H}_2 + \text{Glicolat}$	<i>Propionigenium</i>
Lên men oxalat	$\text{xuxinat} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow$	<i>Oxalobacter formigenes</i>
Lên men malonat	$\text{Propinat} + \text{HCO}_3^-$	
	$\text{Oxalat} + \text{H}^+ \rightarrow$	
	$\text{Focmat} + \text{CO}_2$	<i>Malonomonas rubra</i>
	$\text{Malonat} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow$	
	$\text{Axetat} + \text{HCO}_3^-$	<i>Sporomusa malonica</i>

Qua bảng trên ta thấy người ta thường lấy sản phẩm lên men chủ yếu để gọi tên các quá trình lên men thông thường. Với một số quá trình lên men không thông thường người ta lại lấy cơ chất chủ yếu để gọi tên quá trình lên men.

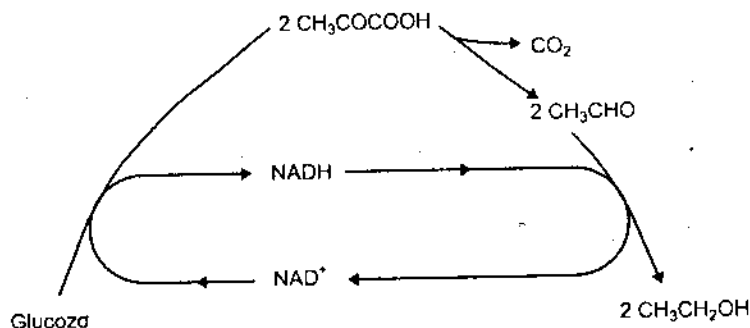
4.1. Quá trình lên men etilic

Rượu etilic là loại sản phẩm lên men đường khá phổ biến của nhiều nhóm vi sinh vật. Song tác nhân lên men rượu chủ yếu là các nấm men, đặc biệt là các nòi *Saccharomyces cerevisiae*. Nhiều loài vi khuẩn kỵ khí và hiếu khí tùy tiện (hiếu khí không bắt buộc) cũng có khả năng tạo thành rượu như là một sản phẩm chủ yếu hoặc sản phẩm phụ của quá trình lên men các hexozơ hay pentozơ.

4.1.1. Lên men etilic nhờ nấm men

Quá trình lên men etilic nhờ nấm men là cơ sở của việc chế tạo các loại rượu, bia, cồn, và glixerin. Quá trình này còn được ứng dụng trong việc làm nở bột mì và chế tạo một số loại nước giải khát.

Trong quá trình này đường sẽ được chuyển hóa thành axit piruvic theo chu trình EMP. Ở giai đoạn chuyển hóa từ glixeraldehyt-3 photphat đến axit 1,3-diphosphoglixeric sẽ có 3 hidro được tách ra để gắn với NAD^+ tạo thành NADH_2 . Hidro này về sau sẽ được sử dụng để khử axetaldehyt (sinh ra từ axit piruvic) tạo thành rượu etilic (Phương trình Neuberg 1).



Trong công nghiệp cồn, bia, rượu, các loại nước uống có rượu người ta thường sử dụng các loài nấm men sau đây :

- *Saccharomyces cerevisiae*
- *S. uvarum* (= *S. carlsbergensis*)
- *Schizosaccharomyces pombe*.
- *Kluyveromyces*

Theo quan điểm hiện nay thì *S. uvarum*, *S. carlsbergensis* chỉ là những đồng danh của *S. cerevisiae* chứ không phải là các loài khác nhau.

Schizosaccharomyces khác với *Saccharomyces* ở chỗ tế bào hình que vì sinh sản bằng phân cắt chứ không phải bằng nảy chồi. *Saccharomyces* có hình thái tế bào rất giống với *Kluyveromyces* nhưng mỗi túi (ascus) của *Saccharomyces* thường chỉ có 1 - 4 bào tử túi (ascospore) trong khi của *Kluyveromyces* có thể có 1 - 60 bào tử túi.

Loài *Saccharomyces cerevisiae* có thể lên men nhiều loại đường nhưng không lên men lactozơ, xenlobiozơ, inulin ; không đồng hóa socbozơ, D-glucosamin, D-ribozơ, D-xilozơ, L-arabinozơ, D-arabinozơ, L-ramnozơ, xenlobiozơ, salixin, arbutin, lactozơ, inulin, eritritol, ribitol, xilitol, L-arabinitol, D-glucitol, D-mannit, galatitol, D-glucono-1,5-lacton, mio-inozitol, 2-keto-D-gluconat, 5-keto-D-gluconat, D-gluconat, D-glucuronat, xitrat, metanol, nitrat, nitrit, etylamin, L-lizin, cadaverin, creatin, creatinin.

Quá trình lên men etilic được ứng dụng từ thời cổ đại để sản xuất rượu, bia và đồ uống có gaz, lên men làm nở bột mỳ... Trên các di vật lưu giữ được từ thời cổ Hi Lạp và trong các Kim Tự Tháp ta có thể thấy các hình vẽ minh họa nghề nấu rượu. Trong số các chữ tượng hình ít ỏi khắc trên mai rùa (giáp cốt văn tự), trên chuông đồng (chung đỉnh văn tự) ta đã thấy có chữ Tầu (rượu). Trong Kinh thánh cũng có đoạn miêu tả cảnh Nôê say túy lúy sau khi thoát khỏi nạn Đại hồng thủy...

Tùy theo nguyên liệu và quy trình lên men, quy trình tinh chế (cất hay không cất, pha hay không pha) mà người ta có thể làm ra rất nhiều loại đồ uống khác nhau có chứa rượu etilic.

Dưới đây là một số ví dụ :

- *Bia (beer)* : sản xuất từ mầm đại mạch, có khi thêm ngô hoặc thóc mầm, gạo. Enzim trong mầm đại mạch (α -amilaza, β -amilaza, proteinaza) ở các nhiệt độ và thời gian thích hợp (30 phút ở 40°C và 30 phút ở 70°C) và pH thích hợp (pH = 5,1 - 5,2) sẽ chuyển hóa tinh bột và protein thành đường, thành axit amin. Còn phải sử dụng thêm hoa bia (hoa houblon, hoppe, hoa của cây *Humulus lupulus*). Hoa bia thêm vào với số lượng 0,3 - 0,5% rồi đun sôi 30 - 60 phút. Hoa bia có vai trò kết tủa protein dư thừa trong bia, làm ức chế sự phát triển của các tạp khuẩn G^+ , làm tăng quá trình tạo bọt, và nhất là tạo ra vị đắng và hương thơm đặc trưng của bia. Sau khi loại bỏ hết bã bia (bã malt, dùng để chăn nuôi) người ta cấy men bia (*S. cerevisiae*, các chủng chuyên dụng) và lên men ở nhiệt độ thấp (3 - 15°C) trong 8 - 12 ngày. Lượng etanol được tạo thành trong khoảng 3,6 - 5,2%. Sau đó chuyển qua giai đoạn lên men phụ ở nhiệt độ xấp xỉ 0°C trước khi được lọc và đóng vào các bom (bia tươi) hoặc đóng chai. Bia tươi là loại dùng ngay không khử trùng còn bia chai là loại được khử trùng ở 55 - 60°C trong 15 - 30 phút.

- *Rượu vang (vin, wine)* : Rượu vang là nước ép nho lên men và thu được không qua quá trình chưng cất. Ngày nay người ta cho phép gọi là rượu vang cả các loại rượu không cất chế từ các loại quả khác hoặc hỗn hợp dịch ép hoặc dịch chiết xuất

(bằng đường) nhiều loại quả khác nhau. Có người còn gọi rượu nếp không qua chưng cất là vang gạo.

Nho được ép thành nước ép nho (must). Đây là một hỗn hợp chứa 85 - 95% dịch nho, 5 - 12% vỏ quả nho và 0 - 4% hạt nho. Cần xử lý bằng các chất sinh SO_2 (như natri metabisunphit, natri bisunphit) để ức chế sự phát triển sau này của vi khuẩn, nấm sợi, nấm men dại. Không được đun sôi nước ép nho. Loại nấm men thường được sử dụng trong sản xuất rượu vang là loại có năng lực chống chịu với nồng độ đường cao, độ CO_2 cao, tạo ra nhiều etanol, kháng SO_2 và tạo hương vị đặc trưng. Người ta thường sử dụng dưới loài *S. cerevisiae* subsp. *ellipsoideus*. Chúng có khả năng tích lũy tới 18 - 20% etanol trong dịch ép nho. Lượng giống được cấy thường 2 - 3%. Các loài nấm men khác thường được nhắc tới trong công nghiệp rượu vang, như *S. beticus*, *S. bayanus*, theo quan điểm hiện nay chỉ là đồng danh của loài *S. cerevisiae*. Rượu vang trắng thường được lên men ở 7 - 18°C còn rượu vang đỏ ở 21 - 27°C. Nồng độ SO_2 thường được sử dụng ban đầu là 200 ppm (phần triệu) còn trong quá trình lên men là 50 - 100 ppm (ức chế được tới 99% các vi sinh vật tạp nhiễm).

Người ta chia rượu vang ra thành rất nhiều loại khác nhau :

- Vang không gas hay còn gọi là vang bản : các loại nổi tiếng là Medoc, Pomerol, Chablis...

- Vang có gas : loại nổi tiếng là Champagne hay ta thường gọi là rượu Sâm banh. Có 3 loại Champagne khác nhau : loại không ngọt, loại ít ngọt, loại ngọt.

- Vang có pha thêm rượu mạnh : loại vang có thêm rượu mạnh (brandy) là loại có thể bảo quản rất lâu. Thuộc về loại này có 3 nhóm vang : Nhóm Sherrg, bao gồm rượu Amontillado (khai vị, ngọt), rượu Fino (không ngọt), rượu Oloroso (khai vị, ngọt, uống với đá), nhóm Port (bảo quản lâu năm trong thùng gỗ), nhóm Madeira (có thể bảo quản tới 200 năm ở nhiệt độ thường).

- Vang thơm : Loại rượu vang nho có pha thêm hương liệu từ cỏ Wermut (rượu Vermouth). Ở Pháp có loại rượu thơm Dubonnet rất nổi tiếng.

4.1.2. Hiệu ứng Pasteur

Hiệu ứng Pasteur là sự ức chế quá trình lên men rượu khi có mặt oxy. Sự chuyển từ lên men sang hô hấp này ngoài việc làm giảm hiệu suất tạo thành rượu và CO_2 còn làm giảm cả sự tiêu thụ đường.

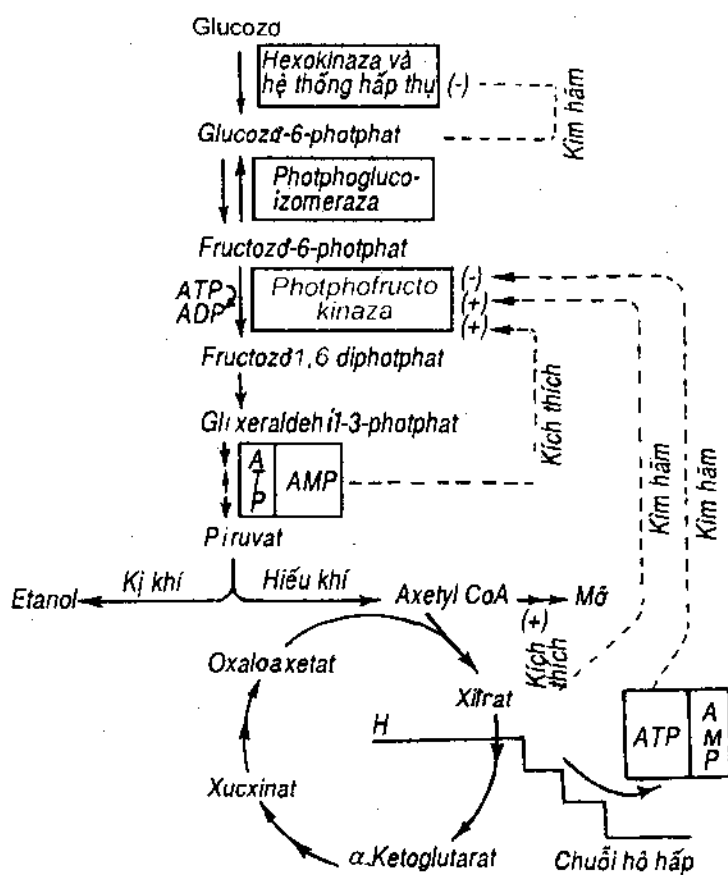
Hiện tượng này được Pasteur phát hiện lần đầu tiên. Nguyên nhân của nó trong những năm qua, gần đây đã được làm sáng tỏ. Giữ vai trò quyết định trong hiệu ứng Pasteur là trạng thái tích lũy năng lượng của tế bào (energy charge, viết tắt là E.C). Trạng thái này được xác định bởi tỉ lệ giữa các adenylat giàu năng lượng và các adenylat nghèo năng lượng. Người ta thường biểu diễn trạng thái năng lượng của tế bào bằng phương trình sau đây :

$$E.C = \frac{ATP + 0,5 ADP}{ATP + ADP + AMP}$$

Để điều chỉnh trạng thái năng lượng này, các enzym dị lập thể giữ vai trò hết sức quan trọng. Dưới điều kiện kỵ khí, lên men rượu chỉ cung cấp rất ít ATP trên một phân tử glucosơ tiêu thụ. Để duy trì sự cung cấp năng lượng cho tế bào, phải dùng một lượng glucosơ cao. Tỉ lệ ATP/AMP là quá nhỏ. Khi có mặt oxy, một sự tạo thành ATP mạnh mẽ xảy ra nhờ sự photphoryl hóa chuỗi hô hấp, trạng thái năng lượng E.C của tế bào nhờ đó tăng lên.

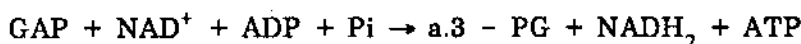
Enzim dị lập thể có tính chất chìa khóa đối với sự sử dụng glucôzơ là photphofructokinaza, enzim đặc hiệu không thuận nghịch đầu tiên của con đường EMP. Nó xúc tác cho sự photphoryl hóa fructôzơ - 6 - photphat thành fructôzơ - 1,6 - diphosphat nhờ ATP. Enzim này bị kìm hãm dị lập thể bởi ATP. Sự kìm hãm "feed-back" này dẫn đến sự tăng nồng độ glucôzơ - 6 - photphat trong tế bào vì phản ứng trước đó được xúc tác bởi một enzim thuận nghịch (photphoglucôizomeraza), glucôzơ - 6 - photphat lại gây nên một sự kìm hãm dị lập thể đối với hexokinaza và cả đối với sự hấp thụ glucôzơ và do đó làm giảm tiêu thụ loại đường này.

Khi ATP kìm hãm dị lập thể enzim photphofructokinaza, AMP sẽ trở nên hoạt động. Một trạng thái năng lượng thấp giống như trong lên men sẽ kích thích sự hấp thụ và phân giải glucôzơ :



Hoạt động photphofructokinaza cũng bị xitrat ức chế. Nhờ chất hiệu ứng âm thứ hai này, tác dụng kìm hãm của ATP được tăng cường, ngược lại các ion amonium lại gây ra tác dụng kích thích đối với hoạt động của photphofructokinaza.

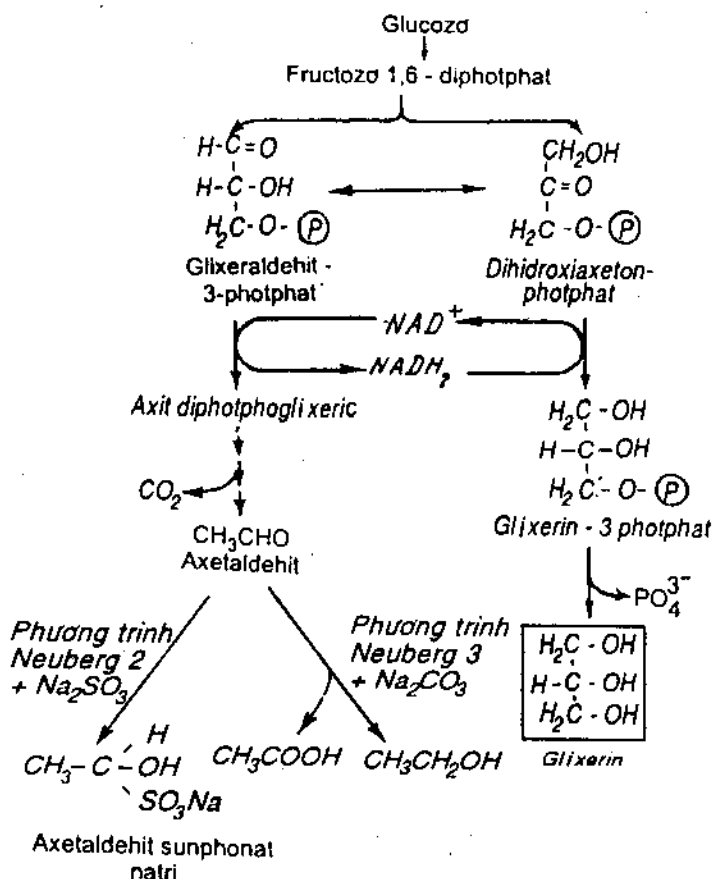
Sự cố mặt của hiệu ứng Pasteur cũng còn có thể giải thích được bằng sự cạnh tranh ADP và photphat vô cơ trong tế bào. Phản ứng loại hidro trong sự phân giải triôzô photphat (glixeraldehyt photphat) yêu cầu ADP và octophotphat :



Dưới điều kiện hiếu khí, ADP và Pi nội bào được huy động cho quá trình photphoryl hóa chuỗi hô hấp, điều này cũng dẫn đến việc giảm hiệu suất tạo thành rượu. Có thể chứng minh điều đó một cách dễ dàng nếu dùng dinitrophenol để ngăn cản sự photphoryl hóa nói trên. Lúc này ADP và Pi (photphat vô cơ) lại được sử dụng cho phản ứng loại hidro của triozophotphat và do đó ngay cả trong điều kiện hiếu khí, sự tiêu thụ glucosa vẫn tăng rõ rệt.

Cũng có thể sử dụng quá trình lên men etilic để sản xuất glixerin. Ngay từ giữa thế kỉ 19, L. Pasteur đã phát hiện thấy khi lên men rượu thường làm sinh ra một lượng nhỏ glixerin. Về sau người ta đã phát hiện thấy trong điều kiện môi trường kiềm (pH khoảng 8,0) lượng glixerin sinh ra sẽ tăng lên rất nhiều và trở thành một trong những sản phẩm chủ yếu. Phương trình chung như sau (phương trình Neuberg 3) :

Lượng glixerin càng sinh ra nhiều hơn nếu quá trình lên men xảy ra với sự có mặt của Na_2SO_3 (Phương trình Neuberg 2). Trong trường hợp này axetaldehit sẽ liên kết với sunphit và do đó sẽ không bị khử để tạo thành etanol. Sản phẩm lên men chỉ là glixerin, CO_2 và axetalsunphonat natri ($\text{CH}_3\text{CHOHSO}_3\text{Na}$) (xem sơ đồ).



4.1.4. Lên men etilic nhờ vi khuẩn

Trong các vi khuẩn lên men rượu, chỉ ở *Sarcira ventriculi* người ta mới tìm thấy con đường tạo thành etanol theo kiểu của nấm men (EMP, piruvatdecarboxylaza). Ở *Zygomonas mobilis*, glucosơ được phân giải theo con đường KDPG. Piruvat được tạo thành, sau đó sẽ được enzym piruvat - decarboxylaza phân giải thành exetaldehit và CO_2 . Bên cạnh một lượng nhỏ axit lactic, còn lại etanol và CO_2 là những sản phẩm duy nhất.

Trong các quá trình lên men của một số vi khuẩn đường ruột và *Clostridium*, etanol được hình thành như một sản phẩm phụ của lên men. Song tiền chất của etanol, tức là axetaldehit, không giải phóng trực tiếp từ piruvat nhờ piruvat-decarboxylaza mà nhờ phản ứng khử axetyl photphat.

Ở các vi khuẩn lactic dị hình (như ở *Leuconostoc mesenteroides*) etanol lại được tạo thành một con đường hoàn toàn khác.

Trong những năm gần đây người ta đặc biệt chú ý đến quá trình lên men etilic nhờ loài vi khuẩn *Zygomonas mobilis*. Đây là loài vi khuẩn hình que, kích thước $1,4 - 2,0 \times 4,0 - 5,0 \mu m$, thường xếp thành đôi, đôi khi xếp thành hình chuỗi ngắn. Để sinh trưởng chúng đòi hỏi phải được cung cấp một loại vitamin duy nhất là axit pantotenic.

Khi lên men 1 phân tử glucosơ chúng có thể làm sinh ra 1,6 phân tử etanol và 1,8 phân tử CO_2 .

Nhiều nước đã nghiên cứu sử dụng vi khuẩn *Zygomonas mobilis* để sản xuất etanol theo phương pháp lên men liên tục hoặc theo phương pháp sử dụng tế bào bất động hóa. Có trường hợp sản lượng etanol đạt tới 178g/l.

4.1.5. Công nghệ sản xuất etanol từ các nguồn cơ chất khác nhau

Etanol không chỉ được sử dụng rộng rãi trong công nghiệp thực phẩm, công nghiệp hóa học, trong y dược học... mà trong tương lai sẽ là nguồn nhiên liệu quan trọng cho nhân loại. Dự báo đến năm 2000 dầu mỏ sẽ chỉ đáp ứng được khoảng 37% nhu cầu về năng lượng trên thế giới.

Etanol có thể được sản xuất từ các nguyên liệu chứa đường (mía, củ cải đường, rỉ đường, nhũ thanh lactoserum, dịch kiềm sunphit - waste sulgate liquors, nước thải công nghiệp thực phẩm...), từ các nguyên liệu chứa tinh bột (đường hóa bằng enzym hay thủy phân bằng axit), từ các nguyên liệu chứa xenlulozơ (thủy phân bằng enzym hay bằng axit).

Từ 1 ha trồng mía ngày nay người ta có thể thu được 63t mía (chứa khoảng 8,32 tấn đường). Nếu dùng toàn bộ nước ép mía để sản xuất etanol có thể thu được 4460 kg etanol (tính theo nồng độ 100%). Nếu dùng để kết tinh đường (khoảng 7 tấn) rồi dùng rỉ đường để sản xuất etanol sẽ thu được 675 kg etanol (tính theo nồng độ 100%).

Khi lên men etilic theo phương pháp gián đoạn chỉ thu được 2g etanol/l nhưng trong các kĩ thuật lên men cải tiến theo hướng hiện đại hóa hiệu suất có thể nâng cao lên rất nhiều.

Hệ thống lên men	Hiệu suất (g EtOH/l/h)
Gián đoạn	2
Liên tục	5
Liên tục, nhiều giai đoạn	12

Gián đoạn, có quay vòng	15
Nổi lên men roto	36
Liên tục, có quay vòng	40
Liên tục, chân không	40
Liên tục, chân không, quay vòng	80

4.2. Quá trình lên men lactic

Lên men lactic là quá trình chuyển hóa kị khí đường với sự tích lũy axit lactic trong môi trường. Người ta đã biết tới hiện tượng này từ lâu và đã ứng dụng rất rộng rãi để chế biến các loại thức ăn chua (làm sữa chua, muối dưa, muối cà), ủ chua thức ăn cho gia súc, hoặc để sản xuất axit lactic và các loại lactat. Axit lactic là nguyên liệu rất cần thiết của công nghiệp thuộc da (làm mềm và làm nở da), công nghiệp dệt (nhuộm, in), công nghiệp tổng hợp chất dẻo, công nghiệp thực phẩm. Lactat canxi là loại dược phẩm nhằm bổ sung canxi dưới dạng dễ hấp thụ cho cơ thể. Lactat sắt dùng để chữa bệnh thiếu máu. Lactat đồng dùng làm dung môi...

Năm 1780 nhà hóa học Thụy Điển Schoele lần đầu tiên đã tách được axit lactic từ sữa bò lên men chua. Năm 1857 Pasteur chứng minh rằng việc làm chua sữa là kết quả hoạt động của một nhóm vi sinh vật đặc biệt gọi là vi khuẩn lactic. Năm 1878 Lister phân lập thành công vi khuẩn lactic đầu tiên và đặt tên là *bacterium lactis* (hiện nay gọi là *Streptococcus lactis*) ; về sau các nhà khoa học liên tiếp phân lập được nhiều loài vi khuẩn lactic khác nhau. Công nghiệp lên men để sản xuất axit lactic có thể nói đã được hình thành từ năm 1881.

Các vi khuẩn lactic được xếp chung vào họ Lactobacteriaceae. Mặc dù nhóm vi khuẩn này không đồng nhất về mặt hình thái (gồm cả các vi khuẩn dạng que ngắn, que dài lẫn các vi khuẩn hình cầu), song về mặt sinh lý chúng lại tương đối đồng nhất. Tất cả đều là những vi khuẩn Gram dương, không tạo thành bào tử (kể cả *Sporolactobacillus inulinus*) và hầu hết không di động. Thu nhận năng lượng nhờ phân giải hidrat cacbon và tiết ra axit lactic. Khác với các vi khuẩn đường ruột là bọn cũng sinh ra axit lactic, các vi khuẩn lactic là bọn lên men bắt buộc, chúng không chứa các xitocrom và men catalaza. Tuy nhiên, chúng có thể sinh trưởng được khi có mặt oxi. Đó là bọn sống từ kị khí tới vi hiếu khí.

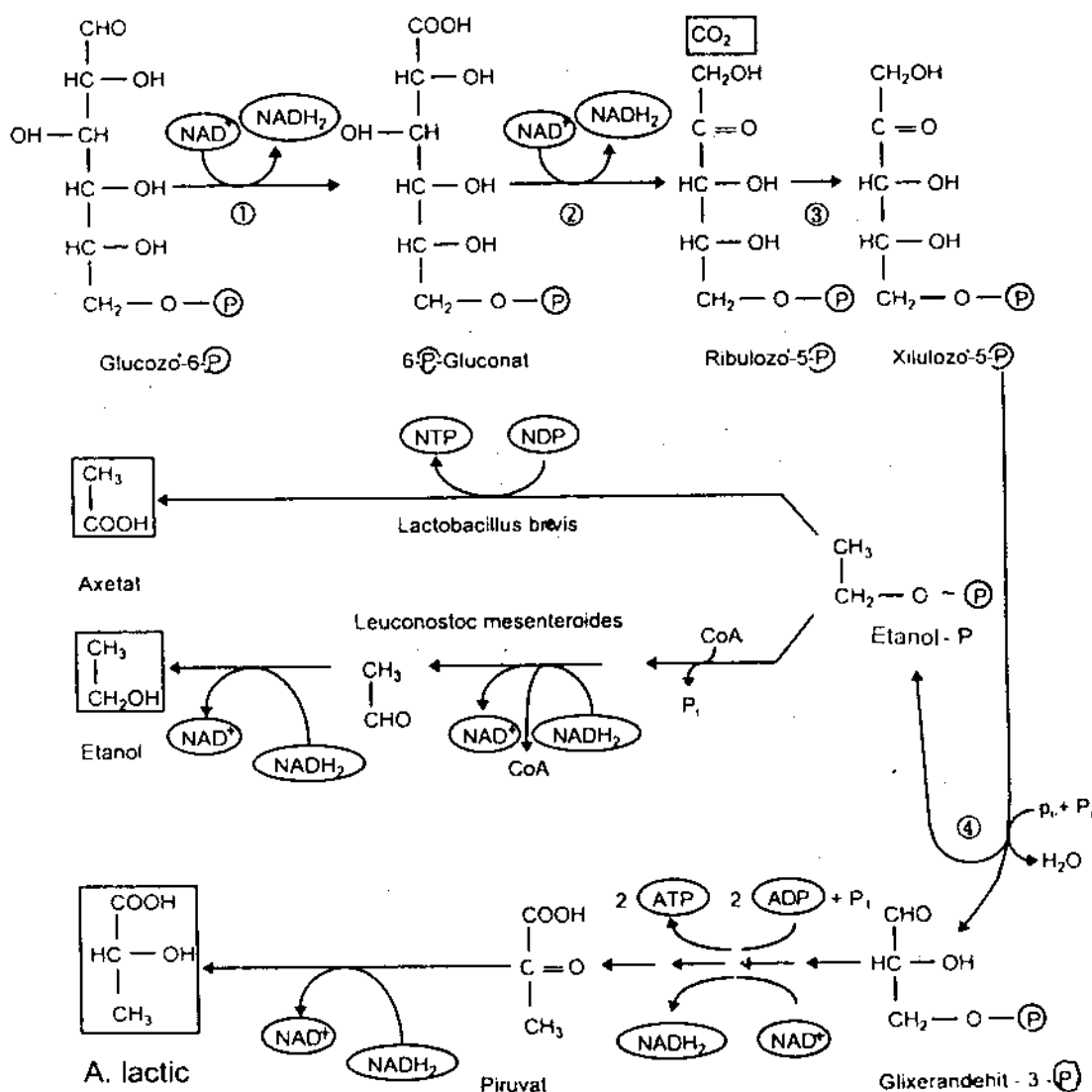
Một đặc điểm quan trọng của các vi khuẩn lactic là có nhu cầu về chất sinh trưởng phức tạp. Không một đại diện nào thuộc nhóm này có thể phát triển trên môi trường muối khoáng thuần khiết chứa glucoso và NH_4^+ . Đa số trong chúng cần hàng loạt vitamin (lactoflavin, tiamin, axit pantotenic, axit nicotinic, axit folic, biotin) và các axit amin. Vì thế người ta thường nuôi cấy chúng trên các môi trường phức tạp chứa một số lượng tương đối lớn cao nấm men, dịch cà chua hoặc thậm chí máu. Điều đáng ngạc nhiên là một số vi khuẩn lactic khi sinh trưởng trên các môi trường chứa máu có thể tạo thành các xitocrom và thậm chí tiến hành cả quá trình photphoryl hóa chuỗi hô hấp. Rõ ràng rằng các vi khuẩn lactic không có khả năng tổng hợp pocphirin, song nếu bổ sung các pocphirin vào môi trường nuôi cấy chúng thì một số vi khuẩn lactic có thể tạo nên các sắc tố hemin tương ứng.

Có hai kiểu lên men lactic. Trong lên men lactic đồng hình thực tế chỉ xuất hiện axit lactic, còn trong lên men lactic dị hình các sản phẩm cuối cùng khá đa dạng : axit lactic, etanol, axit axetic và CO_2 . Chỉ có lên men lactic đồng hình là có ý nghĩa về mặt công nghiệp.

Các vi khuẩn lactic, đồng hình phân giải glucôzơ theo con đường EMP, chúng chứa các enzym cần thiết cho sự phân giải này, kể cả enzym aldolaza. Hidro xuất hiện trong phản ứng loại hidro của triphosphat sẽ được chuyển cho piruvat.

Tùy thuộc vào tính chuyển hóa không gian của enzym xúc tác cho phản ứng này, lactatdehydrogenaza, và tùy thuộc vào sự tồn tại của một enzym lactat - raxemaza mà có thể xuất hiện các axit dạng D (-), L (+) hay DL. Chỉ có một phần nhỏ piruvat được decarboxyl hóa và chuyển hóa thành axit axetic, etanol và CO₂ cũng như thành axeton. Mức độ tạo thành các sản phẩm phụ này rõ ràng là phụ thuộc vào sự có mặt của oxi.

Các vi khuẩn lactic dị hình thiếu các enzym chủ yếu của con đường EMP, đó là aldolaza và trioxophosphatizomeraza. Vì thế giai đoạn đầu của sự phân giải glucôzơ xảy ra theo con đường PP tức là qua glucôzơ - 6 - photphat, 6 - photphogluconat và rubulozơ - 6 - photphat (xem sơ đồ dưới). Chất này nhờ một enzym epimeraza được chuyển thành xilulozơ - 5 photphat và sau đó trong một phản ứng phụ thuộc tiaminpirophotphat được enzym pentozophotphoketolaza phân giải thành glixeraldehitphotphat và axetylphotphat. Sự oxi hóa trioazơ thành axit lactic xảy ra giống như trong sự lên men đồng hình, còn axetyl photphat có thể được chuyển hóa thành etanol hoặc axit axetic.



Quá trình lên men lactic dị hình ở một số loài vi khuẩn

Vi khuẩn lactic bao gồm nhiều loại thuộc các chi rất khác nhau. Dưới đây là khóa phân loại tới chi mới nhất (1998) của các vi khuẩn có khả năng lên men lactic :

I - TẾ BÀO HÌNH QUE

1. Không hình thành bào tử nội sinh

a) Kị khí không bắt buộc

* Catalaza dương tính

- Di động, sinh trưởng ở 35°C *Listeria*

- Không di động, không sinh trưởng ở 35°C *Brochothrix*

* Catalaza âm tính

- Không sinh H₂S, peptidoglican của thành tế bào có các a. amin chính là L-lys, m-DAP hoặc orn.
+ Sinh trưởng ở pH =4,5, từ glucosơ sinh

axit lactic L(+), D(-) và DL- *Lactobacillus*

+ Không sinh trưởng ở pH =4,5, từ glucosơ sinh

a. lactic L(+), a. amin của peptidoglican là L-lys *Carnobacterium*

- Sinh H₂S, a. amin chính của peptidoglican là L - Lys.

b) Kị khí bắt buộc

- Từ glucosơ sinh a. axetic / a. lactic theo tỉ lệ lớn hơn 1 *Bifidobacterium*

- Từ glucosơ chủ yếu chỉ sinh a. lactic *Lactobacillus*

2. Hình thành bào tử nội sinh

- Catalaza âm tính, lên men lactic đồng hình điển hình sinh a. lactic D(-)

..... *Sporolactobacillus*

- Catalaza dương tính, lên men glucosơ sinh a. lactic L(+), D(-) và DL -

..... *Bacillus*

II - TẾ BÀO HÌNH CẦU

1. Kị khí không bắt buộc

a) Sinh trưởng tốt ở điều kiện kị khí, tế bào xếp thành 2, 4, hoặc thành chuỗi

- Tế bào xếp thành 2 hoặc 4, từ glucosơ sinh axit, không sinh khí, sinh a. lactic DL hoặc L(+)

+ Không thể sinh trưởng ở nồng độ NaCl 18% *Pediococcus*

+ Có thể sinh trưởng ở nồng độ NaCl 18%, từ glucosơ chủ yếu sinh a.lactic L(+)

..... *Tetragenococcus*

- Tế bào xếp thành 2 hay thành chuỗi, từ glucosơ sinh axit và sinh khí, sinh a. lactic D(-).

+ Sinh trưởng trong nước ép nho hay rượu vang có pH =3,5 - 3,8, bắt đầu sinh trưởng tốt ở pH=4,8 *Oenococcus*

+ Không sinh trưởng trong điều kiện như (1) *Leuconostoc*

+ Tế bào hình cầu, hình que ngắn, đầu tròn hay nhọn, sinh trưởng được 15°C, không sinh trưởng ở 45°C..... *Weissella*

- Tế bào xếp thành 2 hay thành chuỗi, từ glucôzơ sinh axit nhưng không sinh khí.
 - + Không sinh trưởng ở 10°C nhưng lại sinh trưởng được ở 45°C *Streptococcus*
 - + Không sinh trưởng được ở 10°C hoặc 45°C, không sinh trưởng ở nồng độ 6,5% NaCl, thường tạo khuẩn lạc dạng vệ tinh *Abitotrophia*
 - + Không sinh trưởng được ở 10°C hoặc 45°C, sinh trưởng được ở nồng độ 6,5% NaCl, ở pH=9,6 và ở sữa bò chứa 0,1% xanh metilen *Enterococcus*.
 - + Sinh trưởng được ở 10°C, không sinh trưởng được ở 45°C, không sinh trưởng được ở nồng độ 6,5% NaCl, ở pH=9,6 và ở sữa chứa 0,1% xanh metilen.

. Di động *Vagococcus*

. Không di động *Lactococcus*

- Tế bào xếp thành 2 hay thành đám, từ glucôzơ sinh axit và sinh khí, có thể lên men L - Tactrat *Lactosphaera*

- Tế bào xếp thành 2 hay thành đám, kích thước tế bào không đều, từ glucôzơ sinh axit nhưng không sinh khí *Gemella*

- Tế bào không xếp thành đám, từ glucôzơ sinh axit nhưng không sinh khí, ưa nhiệt, sinh trưởng tốt nhất ở 68°C *Saccharococcus*

- b) Sinh trưởng yếu ở điều kiện kỵ khí, tế bào xếp thành 2 hay thành 4, từ glucôzơ sinh axit nhưng không sinh khí, sinh axit lactic L(+) *Aerococcus*

2. Kị khí bắt buộc :

Tế bào ngoài hình cầu còn có dạng hình que ngắn *Atopobium*

Một số nấm mốc (nhất là các loài thuộc giống *Rhizopus*) cũng có khả năng lên men và làm tích lũy khá nhiều axit lactic.

Ở một số nước, người ta đã sử dụng *Rhizopus oryzae* để sản xuất ra axit lactic. Sản lượng axit lactic có thể đạt đến 62 - 67% so với lượng đường tiêu hao.

Vì khuẩn lactic ứng dụng rất rộng rãi trong công nghiệp chế biến sữa, công nghiệp sản xuất axit lactic, trong việc chế biến rau quả và thức ăn gia súc.

Sữa chua là loại sản phẩm lên men của sữa tươi. Sữa chua có giá trị dinh dưỡng cao và có hương vị thơm ngon nên được nhiều người ưa thích. Ở nhiều nước, sữa chua là món ăn hàng ngày của nhân dân. Vì có hàm lượng axit lactic cao nên protein sữa không bị tiếp tục phân giải, mặt khác vì có các quá trình lên men phụ tạo ra diacetyl, các este và các axit hữu cơ bay hơi, nên sữa chua có hương vị thơm ngon.

Có thể sản xuất sữa chua bằng phương pháp lên men tự nhiên hoặc phương pháp cấy giống thuần khiết.

Trong sữa tươi bao giờ cũng có nhiễm ít nhiều vi khuẩn (từ không khí, từ tay người hoặc từ dụng cụ vắt sữa). Vi khuẩn sẽ mau chóng phát triển. Nhóm vi khuẩn gây thối làm phân giải một ít protein của sữa và vì vậy tạo điều kiện cho nhóm vi khuẩn lactic phát triển. Vi khuẩn lactic sẽ làm tích lũy dần axit lactic và do đó làm ngăn cản sự phát triển của nhóm vi khuẩn gây thối. Khi axit lactic đã được tích lũy khá nhiều rồi thì ngay vi khuẩn lactic cũng không thể tiếp tục phát triển được nữa.

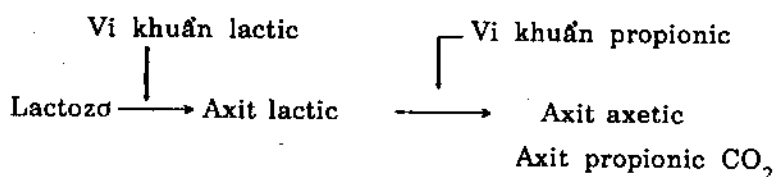
Trong điều kiện sản xuất lớn, người ta thường khử trùng sữa theo phương pháp Pasteur (65°C trong 30 phút hoặc 72 - 75°C trong 10 - 20 giây). Sau đó cấy vào sữa những loại vi khuẩn có khả năng lên men lactic mạnh (*S.lactis*, *S.cremoris*) và những vi khuẩn có khả năng tổng hợp diacetyl để tạo ra vị thơm của sữa chua (*S.diacetilactis*).

Trong những loại sữa chua có phẩm chất tốt, nhóm vi khuẩn sinh chất thơm thường chiếm đến 5 - 10% so với tổng số vi khuẩn và hàm lượng diacetyl thường đạt đến vài mg/l. Kêphia (kefia) là một loại sữa chua có độ chua khá cao (90 - 120°T)^(*) và có mùi rượu (chứa 0,2 - 0,6% rượu etylic). Kêphia thường được chế tạo theo phương pháp lên men tự nhiên nhờ tác dụng của một tập đoàn nhiều loại vi sinh vật khác nhau (nấm men, vi khuẩn lactic). Cho đến nay người ta vẫn chưa xác định được một cách cụ thể thành phần loài của tập đoàn vi sinh vật này.

Ngoài kêphia, còn có thể kể đến nhiều loại sữa chua khác được chế tạo và sử dụng theo tập quán của từng nước, từng vùng khác nhau. Chẳng hạn sữa ngựa chua là một món ăn dân tộc rất được ưa chuộng ở Mông Cổ.

Phomat (Fromage) cũng là một loại sản phẩm có giá trị chế tạo từ sữa. Để làm phomat, người ta phải sử dụng enzym đông kết sữa (pressure) lấy từ dạ dày trâu bò để tách casein của sữa ra, sau đó tiếp tục tiến hành cho lên men với một nồng độ muối loãng. Tùy loại phomat mà quá trình làm chín có thể do những tập đoàn vi sinh vật khác nhau tham gia. Có loại phomat (phomat Hà Lan) được lên men nhờ vi khuẩn lactic (nhóm ưa ấm và nhóm ưa nóng) cùng với vi khuẩn propionic. Có loại phomat được lên men nhờ vi khuẩn lactic (nhóm ưa ấm), vi khuẩn sinh sắc tố đỏ và nấm mốc (*Penicillium candidum*, *P. camemberti*). Có loại phomat (phomat Roquefort) được lên men nhờ vi khuẩn lactic và nấm *Penicillium roqueforti*.

Cơ chế tác dụng của men đông sữa và các nhóm vi sinh vật được trình bày bằng sơ đồ sau đây :



Đặc điểm vi sinh vật học của một số loại phomat nổi tiếng

Tên phomat (1)	Vi sinh vật (2)		Đặc điểm (3)
Parmesan	<i>Streptococcus lactis</i> , <i>S. cremoris</i> <i>S. Thermophilus</i>	<i>Lactobacillus casei</i> <i>L. bulgaricus</i>	
Romano	<i>S. thermophilus</i>	<i>L. bulgaricus</i>	
Cheddar	<i>S. lactis</i> <i>S. cremoris</i> <i>S. durans</i>	<i>L. casei</i>	Rắn
Colby	<i>S. lactis</i> <i>S. cremoris</i> <i>S. durans</i>	<i>L. casei</i>	
Edam	<i>S. lactis</i> <i>S. cremoris</i>		
Gouda	<i>S. lactis</i> <i>S. cremoris</i>		
Gruyere	<i>S. lactis</i> <i>S. thermophilus</i>	<i>L. helveticus</i> <i>Propionibacterium Shermanii</i> hoặc <i>P. freudenreichi</i>	

(*) 1°T hay 1° Tecne là độ chua ứng với 1ml NaOH 0,1N dùng để trung hòa 100ml sữa tương đương với 9mg axit lactic.

1	2			3
Swiss	<i>S. lactis</i>	<i>L. helveticus</i>	<i>P. shermanii</i> hoặc <i>P. freudenreichi</i>	Hơi mềm
Gorgonzola	<i>S. thermophilus</i>			
Monterey	<i>S. lactis</i> <i>S. cremoris</i>	<i>Penicillium</i> <i>roqueforti</i> hoặc <i>P. glaucum</i>		
Roquefort	<i>S. lactis</i> <i>S. cremoris</i>	<i>P. roqueforti</i> hoặc <i>P. glaucum</i>		
Brie	<i>S. lactis</i> <i>S. cremoris</i>	<i>P. camemberti</i> <i>P. candidum</i>	<i>Brevibacterium</i> <i>linens</i>	Mềm
Camembert	<i>S. lactis</i> <i>S. cremoris</i>	<i>P. camemberti</i> <i>P. candidum</i>		
Cottage	<i>S. lactis</i>	<i>Leuconostoc</i> <i>citrovorum</i>		Mềm

Men đông sữa

Vi khuẩn lactic và
một số Micrococcus

Cazein → Paracazein → Pepton → axit amin, NH_3

Nấm mốc và một
số vi khuẩn
lactic

Lipit → Axit béo bay hơi → Axit butiric

Axit capronic

Axit caprilic

Keton

Aldehyt

Rượu

Este

Muối dưa, muối cà cũng là những hình thức lên men lactic tự nhiên rất quen thuộc đối với nhân dân ta. Rau cải trước khi muối dưa thường được phơi chỗ râm cho mất bớt nước, sau đó mới đem muối. Để tạo điều kiện kỵ khí, người ta thường nén dưa bằng một hòn đá và một cái vỉ tre. Áp suất thẩm thấu cao do muối sinh ra sẽ làm rút chất dịch tế bào trong dưa ra. Vi khuẩn lactic và vi khuẩn gây thối lúc đầu có thể cùng phát triển. Sau một thời gian lượng axit lactic được tích lũy sẽ làm ức chế sự phát triển của nhóm vi khuẩn gây thối. Dưa chua dần lên và đến một độ chua nhất định thì sẽ làm ức chế ngay cả hoạt động của nhóm vi khuẩn lactic. Khi đó, trên bề mặt dung dịch có thể thấy xuất hiện những lớp váng trắng. Đó là một loại nấm men (chủ yếu là *Geotrichum candidum*) có khả năng phát triển ngay trong điều kiện pH rất thấp. Những loại nấm men này có khả năng oxy hóa axit lactic thành CO_2 và nước, do đó làm cho dưa giảm dần độ chua. Khi độ chua giảm đến một mức độ nhất định rồi thì vi khuẩn gây thối lại bắt đầu phát triển và dẫn đến việc làm khú dưa. Khi dưa đang lúc ăn ngon trong mỗi ml nước dưa (hoặc nước cà) thường có khoảng 5 - 10mg axit lactic. Bí quyết của việc muối dưa ngon là tạo ra được điều kiện để cho vi khuẩn lactic ngay từ đầu đã lấn át được nhóm vi khuẩn gây thối. Cho đủ muối

44.0
198.14

sẽ làm hạn chế được nhóm vi khuẩn gây thối và rút được dịch tế bào của dưa ra cung cấp cho vi khuẩn lactic phát triển (nếu nhiều muối quá thì dưa sẽ mặn và có thể làm dưa không chua nổi vì đã ức chế luôn cả nhóm vi khuẩn lactic). Có thể thúc đẩy sự phát triển và lên men của nhóm vi khuẩn lactic bằng các biện pháp như : muối dưa bằng nước ấm, thêm một ít đường kính, vắt thêm một ít chanh hoặc thêm một ít khế chua và nhất là biện pháp "cấy giống" bằng một ít nước dưa cũ. Không cần thiết phải nước đun sôi để nguội để muối dưa vì khi dưa đã chua rồi thì hầu như không có loại vi khuẩn gây bệnh nào có thể sống nổi (có bệnh viện còn dùng nước dưa chua để ức chế các loại vi khuẩn gây bệnh đường ruột. Tác dụng ức chế vi khuẩn có thể là do axit lactic và một chất kháng sinh do vi khuẩn lactic sinh ra (thuộc loại polipeptit) gọi là nizin.

Để hạn chế được sự phát triển của váng nấm men nhằm kéo dài được thời gian bảo quản dưa (trong điều kiện sản xuất lớn) có thể lấy một tấm nhựa mỏng (polietilen) làm thành một cái túi lớn đựng nước muối rồi đặt áp sát lên toàn bộ bề mặt của bề muối dưa.

Quá trình lên men lactic còn được ứng dụng để ủ chua thức ăn dùng trong chăn nuôi gia súc. Nhờ ủ chua mà thức ăn có thể giữ được khá lâu ở trạng thái tươi mà vẫn không bị hao hụt về mặt chất lượng dinh dưỡng. Riêng về mặt vitamin thì thức ăn sau khi ủ chua lại giàu vitamin hơn so với trước khi ủ.

Nguyên liệu tươi (rau xanh, thân lá ngô) được nhanh chóng ủ thành đồng hoặc được chắt vào trong các hố đào sâu xuống đất. Các vi sinh vật có sẵn trên nguyên liệu (hoặc được chủ động cấy vào) sẽ phát triển dần lên. Đầu tiên các nhóm vi khuẩn hiếu khí hoạt động mạnh, chúng sử dụng chỗ oxi có trong đồng thức ăn ủ, làm tiêu thụ phần thức ăn dễ tiêu và làm phân giải dần protein của nguyên liệu. Kết quả là tạo ra điều kiện thuận lợi cho nhóm vi khuẩn lactic phát triển và làm tích lũy dần axit lactic.

Thường người ta cho rằng ủ chua là rất tốt trong trường hợp không chế được để cho vi khuẩn lactic phát triển nhanh, tạo ra được pH $\leq 4,2$, trong thành phần axit sinh ra axit lactic chiếm từ 60% trở lên, axit axetic chiếm 40% trở xuống và không tích lũy axit butiric. Ủ chua đạt loại tốt nếu pH đạt từ 4,5 trở xuống, lượng axit lactic chiếm 40 - 60%, lượng axit axetic chiếm 40 - 60% và không sinh ra hoặc chỉ sinh ra dấu vết axit butiric. Ủ chua đạt loại trung bình khi pH đạt khoảng 4,5 ; thành phần axit như loại trên nhưng trong đó có khoảng 0,2% axit butiric. Ủ chua đạt loại xấu khi pH đạt trên 4,7, tích lũy axit lactic và nhiều axit butiric. Còn ủ chua được coi là rất xấu khi pH vượt quá 5,5 và tích lũy rất nhiều axit butiric, cũng như các axit bay hơi khác.

Ở một số nước ngoài ta đã nghiên cứu sử dụng biện pháp cấy giống thuần chủng (thường dùng *L. plantarum*) để nâng cao chất lượng của quá trình ủ chua nguyên liệu dùng làm thức ăn gia súc. Gần đây ở nhiều nước, người ta còn đang thí nghiệm sử dụng cả một số chế phẩm enzym sản xuất ở quy mô công nghiệp (amilaza, xenlulaza...) để cải thiện điều kiện ủ chua thức ăn gia súc.

Trong công nghiệp để sản xuất axit lactic và các loại lactat, người ta thường sử dụng loài vi khuẩn *L. delbruckii* và loài *L. coagulans*. Hai loại vi khuẩn này đều thuộc loại vi khuẩn ưa nhiệt và có khả năng tích lũy khá nhiều axit lactic. Để lên men axit lactic ngoài nguồn thức ăn cacbon (đường, ri đường, dịch thủy phân bột, dịch thủy phân inulin) còn cần sử dụng một số loại thức ăn bổ sung chứa đạm hữu cơ và các loại chất sinh trưởng (như mầm đại mạch, cám, cao ngô...). Không nên cho các chất bổ sung này vào nhiều mặc dù bổ sung càng nhiều vi khuẩn lactic phát triển càng

manh, lên men càng nhanh, bởi vì bổ sung nhiều đường sẽ tiêu hao nhanh và hiệu suất chuyển hóa thành axit lactic giảm, lại dễ tạo điều kiện nhiễm tạp khuẩn. Thường thường quá trình lên men được thực hiện ở 48°C trong 5 - 7 ngày, nồng độ đường trong môi trường là 10 - 15%, lượng CaCO₃ sử dụng là 10%, mầm đại mạch : 0,375%, photphat amon : 0,25%. Để tách axit lactic ra khỏi sản phẩm lactat canxi người ta dùng axit sunphuric. Sản phẩm phụ của quá trình xử lý này là sunphatcanxi sẽ kết tủa lắng xuống.

4.3. Lên men propionic

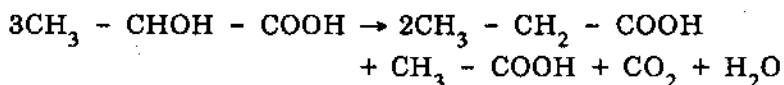
Axit propionic là sản phẩm lên men của một chi vi khuẩn có tên gọi là *Propionibacterium*. Quá trình lên men propionic có vai trò quan trọng trong quá trình chế tạo phomat.

Chi vi khuẩn *Propionibacterium* được phân lập và miêu tả từ cuối thế kỉ thứ 19 (Orla - Jensen, 1898). Đó là loại vi khuẩn kỵ khí không bắt buộc, Gram dương, không di động, không sinh bào tử. Khi nuôi cấy trong môi trường trung tính ở điều kiện kỵ khí chúng có hình cầu, xếp thành từng đôi hay có khi thành từng chuỗi. Khi nuôi cấy thoáng khí chúng có hình que hay hình phân nhánh. Trong tế bào có chứa các hemin (hệ thống xitocrom, catalaza).

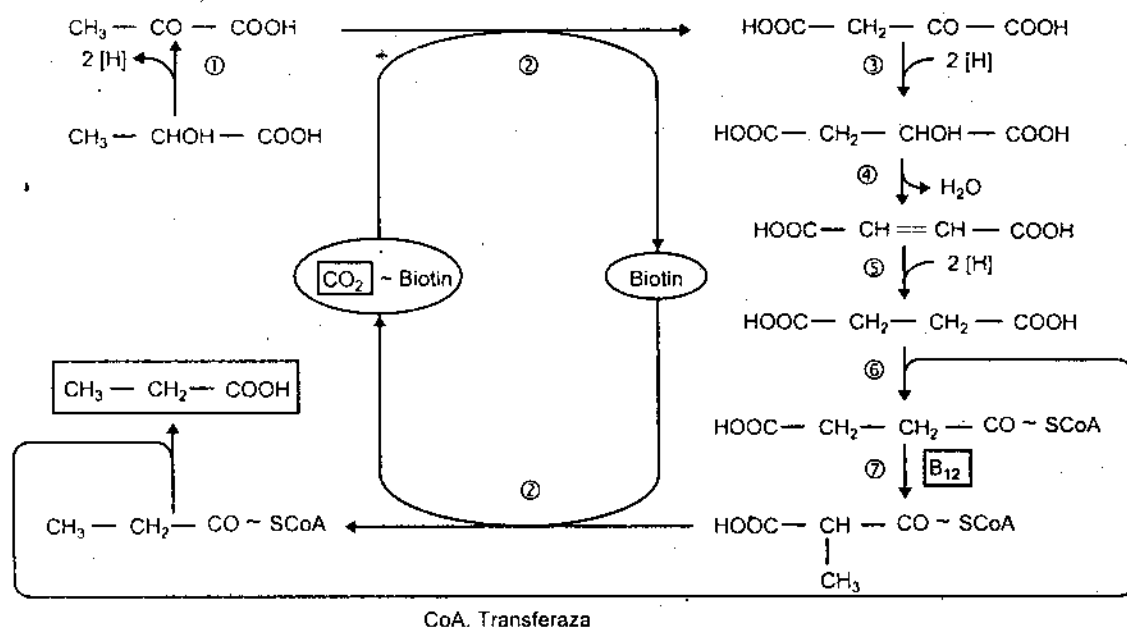
Các vi khuẩn propionic có nhiều trong dạ cỏ và đường ruột của các động vật nhai lại, ở đó chúng tham gia vào sự tạo thành các axit béo. Không thể phân lập vi khuẩn propionic trực tiếp từ sữa, đất hay nước, mà để phân lập các vi khuẩn này người ta phải làm phong phú chúng trên dịch dinh dưỡng lactat (cao nấm men), trên đó đã được cấy một chút phomat. Sở dĩ trong phomat có chứa vi khuẩn này là vì chúng đã được đưa vào đó cùng với men đông sữa lấy từ dạ dày bê trong quá trình chế biến phomat. Có nhiều loài vi khuẩn propionic trong đó nổi tiếng nhất là các loại *P. freudenchii*, *P. shermanii* và *P. acidopropionici* (trước đây gọi là *P. pentocaseum*). Tác nhân gây nên các nốt trứng cá trên da người cũng thuộc về một loài vi khuẩn propionic (*P. acnis*). Ngoài chi *Propionibacterium*, các vi khuẩn thuộc các chi khác như *Veillonella alcalescens* (*Micrococcus lactilyticum*), *Clostridium propionicum*, *Selenomonas*, *Micromonospora* và nhiều loài khác cũng tạo thành axit propionic.

Vi khuẩn propionic thu nhận năng lượng nhờ lên men. Chúng có thể dùng các cơ chất như glucosơ, saccarosơ, lactosơ, các pentosơ, axit lactic, axit malic, glixerin và các hợp chất khác làm cơ chất sinh trưởng và lên men. Các đường hexosơ được chúng phân giải theo con đường EMP.

Sự tạo thành axit propionic từ axit lactic diễn ra theo phương trình tổng quát sau đây :



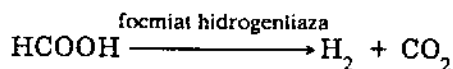
Sự khử axit lactic hoặc piruvat thành axit propionic xảy ra theo một con đường không thông thường (xem sơ đồ dưới). Với sự tham gia của một phức hệ biotin - CO₂ trước hết piruvat được khử CO₂ thành oxalacetat (chuyển cacboxyl hóa), sau đó qua malat và fumarat mà bị khử thành xuxinat. Xuxinat được chuyển thành xuxinyl - CoA theo con đường thông thường với sự tham gia của ATP và Coenzim A và sau đó nhờ men metylmalonyl mutaza với sự tham gia của coenzim B₁₂ mà tạo thành metinmalonyl - CoA. Chất này sau đó mới bị khử CO₂ và propionyl CoA được phân giải thành propionat và CoA. Nhờ men CoA - transferaza, CoA lại được chuyển cho xuxinat. Sự phân giải CO₂ xảy ra trên transcacboxylaza chứa biotin, enzym này sau đó lại tham gia vào phản ứng cacboxyl hóa piruvat.



Một số loài vi khuẩn *Propionibacterium* (như *Propionibacterium shermanii*, *P. freudenreichii*, *P. zae*) đang được chú ý vì có khả năng sản sinh ra khá nhiều vitamin B_{12} . Công nghiệp chế tạo vitamin B_{12} nhờ vi khuẩn *Propionibacterium* đã được hình thành ở rất nhiều nước. Ngoài các chế phẩm vitamin B_{12} tinh khiết dùng trong y học, người ta còn sử dụng nhóm vi khuẩn này để chế tạo ra các sản phẩm thô dùng trong chăn nuôi.

4.4. Lên men focmic

Một số loài vi khuẩn, nhất là các vi khuẩn thuộc họ trực khuẩn đường ruột (*Enterobacteriaceae*) có khả năng lên men đường tạo thành axit focmic (HCOOH) và một số sản phẩm khác. Quá trình lên men này gọi là quá trình lên men focmic. Axit focmic sau khi sinh ra sẽ tích lũy lại trong môi trường hoặc chuyển hóa thành H_2 và CO_2 (nếu môi trường có phản ứng axit) dưới tác dụng của men focmiat hydrogenliaza:



Các chi vi khuẩn đường ruột có khả năng lên men focmic có hình thái rất giống nhau. Đó là những trực khuẩn Gram âm, chu mao, di động mạnh, không sinh bào tử, kỵ khí không bắt buộc, có thể phát triển được cả trên những môi trường đơn giản không chứa đạm hữu cơ.

Người ta thường phân biệt các chi này chủ yếu dựa trên đặc điểm lên men đường glucosơ, lactosơ và dựa trên một số phản ứng sinh hóa khác (như khả năng phân giải protein, phản ứng Voges-Proskauer tức phản ứng kiểm tra khả năng sản sinh axetoin, khả năng đồng hóa xitrat...).

Ba chi *Enterobacter* (*Aerobacter*), *Serratia* và *Klebsiella* rất giống nhau về các đặc điểm sinh hóa trình bày trong bảng. Để phân biệt được 3 chi này, cần xét thêm một số đặc điểm khác nữa. Chẳng hạn *Aerobacter* (*Aerobacter A*) và *Serratia* (*Aerobacter C*) có khả năng di động, còn *Klebsiella* (*Aerobacter B*) không có khả năng di động ; *Aerobacter* có khả năng phân giải gelatin còn *Serratia* và *Klebsiella* không có khả năng này.

Sản phẩm của quá trình lên men focmic bao gồm rất nhiều loại khác nhau : axit focmic, axit axetic, axit xuxinic, axit lactic, etanol, glixerin, axetoin (axetyl metylcacinol) 2, 3 - butadiol, CO₂ và H₂. Tùy từng loại vi khuẩn đường ruột mà các sản phẩm lên men có thể khác nhau rất nhiều. Chẳng hạn khi so sánh các sản phẩm lên men glucozo ở vi khuẩn *Escherichia coli* và *Enterobacter aerogenes* chúng ta thấy như sau :

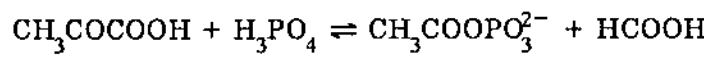
Đặc điểm sinh hóa của một số chi vi khuẩn đường ruột có khả năng lên men focmic

Chi và loài	Lên men glucozo	Lên men lactozo	Phản ứng V.P	Phản ứng đỏ metyl	Đông hóa xitrat	Phân giải ure	Sản sinh H ₂ S	Sản sinh desaminaza phenylalanin
<i>Escherichia</i>	+/+	+/+	-	+	-	-	-	-
<i>Enterobacter</i>	+/+	+/+	+	-	+	-	-	-
<i>Serratia</i>	±/±	±/±	+	-	+	-	-	-
<i>Proteus</i>	+/+	-/-	-	+	±	+	±	+
<i>Salmonella paratyphi</i>	+/+	-/-	-	+	+	-	+	-
<i>S.typhi</i>	+/+	-/-	-	+	+	-	+	-
<i>Shigella</i>	+/+	+/+	-	+	-	-	-	-
<i>Klebsiella</i>	+/+	+/+	+	-	+	-	-	-

Các sản phẩm lên men glucozo ở *E.coli* và *A.aerogenes*

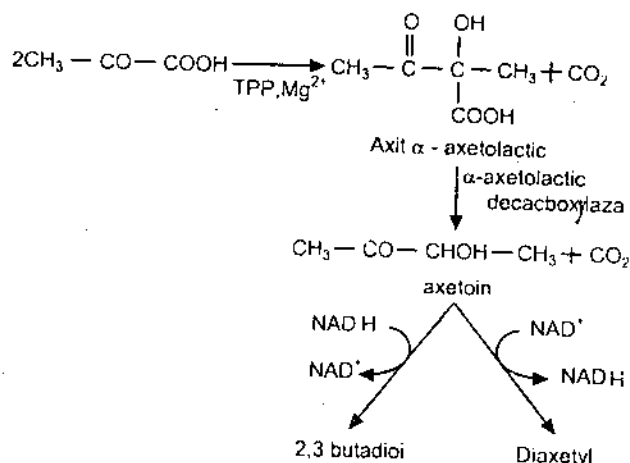
Sản phẩm		Số lượng phân tử sản phẩm từ 100 phân tử glucozo	
		<i>E.coli</i>	<i>A. aerogenes</i>
Butandiol	CH ₃ CHOHCHOHCH ₃	0	66,5
Etanol	CH ₃ CH ₂ OH	42	70
Axit xuxinic	COOHCH ₂ CH ₂ COOH	29	0
Axit lactic	CH ₃ CHOHCOOH	84	3
Axit axetic	CH ₃ COOH	46	0,5
Axit focmic	HCOOH	2	18
Hydrogen	H ₂	43	36
Khi cacbonic	CO ₂	4	172

Cơ chế của quá trình lên men focmic ở vi khuẩn *E.coli* được giải thích như sau :
Axit piruvic sinh ra trong quá trình đường phân một phần được khử thành axit lactic nhờ men lactatdehydrogenaza, còn một phần được chuyển hóa thành axetylphosphat (hay axetyl CoA) và axit focmic theo phản ứng sau đây :

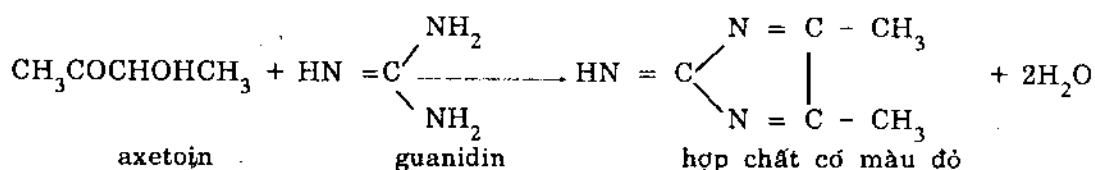


Các cofactor của phản ứng này là TPP (tiaminpyrophosphat) và CoA. CO₂ và H₂ được sinh ra do quá trình phân giải axit focmic. Axetylphosphat một phần tiếp tục

được phân giải thành etanol, còn một phần được phân giải thành axit axetic. Axit xuxinic cũng được sinh ra do sự oxi hóa axetyl CoA theo chu trình ATC. *Enterobacter*, *Serratia* và một số loài trong chi *Bacillus* khi lên men focmic ngoài sự tạo thành một số các sản phẩm nói trên còn có khả năng sản sinh ra axetoin. Chất này sau khi được hình thành sẽ tiếp tục bị khử thành 2.3. butandiol hoặc bị oxi hóa thành diaxetyl (diaxetyl là chất tạo nên mùi vị đặc biệt của bơ) :



Để kiểm tra khả năng tạo thành axetoin, người ta thường sử dụng phản ứng Voges-Proskauer (thường viết tắt là phản ứng V.P.). Nguyên tắc của phản ứng này là trong môi trường kiểm axetoin sẽ bị oxi hóa thành diaxetin. Chất này sẽ kết hợp với nhóm guanidin chứa trong acginin của pepton để tạo thành một hợp chất có màu đỏ (phản ứng dương tính).



Phản ứng với đỏ metyl cũng chủ yếu nhằm kiểm tra khả năng tạo thành axetoin. Vì khuẩn nào có khả năng chuyển hóa axit piruvic thành axetoin thì ít làm thay đổi pH môi trường, đỏ metyl không bị chuyển thành màu đỏ (phản ứng âm tính).

4.5. Lên men butiric và lên men axeton-butanol

Axit butiric, butanol, axeton, izopropanol và một số loại rượu, axit hữu cơ khác là sản phẩm của quá trình lên men hydratcacbon thực hiện bởi một nhóm vi khuẩn kỵ khí sinh bào tử thuộc chi *Clostridium*. Quá trình lên men tạo ra axit butiric và một số sản phẩm khác được gọi là quá trình lên men butiric.

Mặc dù axit butiric đã tìm thấy từ năm 1814 và đã được điều chế từ đường từ năm 1843, nhưng mãi tới năm 1861 L. Pasteur mới tìm thấy bản chất của quá trình lên men butiric. L. Pasteur đã khẳng định quá trình lên men này xảy ra do hoạt động sống của nhóm vi khuẩn kỵ khí sinh bào tử.

11/10/17

Chi *Clostridium* bao gồm các vi khuẩn G^+ , có khả năng di động nhờ các tiên mao mọc khắp quanh cơ thể, tế bào dinh dưỡng hình que nhưng vì bào tử có kích thước lớn hơn chiều ngang của tế bào dinh dưỡng nên khi mang bào tử tế bào sẽ có dạng hình thoi hay hình dùi trống. Đa số các loài *Clostridium* là kỵ khí bắt buộc, chỉ có một số ít loài (như *C. pectinovorum*, *C. histolyticum*...) là kỵ khí không bắt buộc. Ở đa số các loài *Clostridium* người ta thấy hàm lượng flavin đạt tới mức khá cao và không thấy chứa xitocrom, catalaza.

Nhiều loại *Clostridium* có khả năng đồng hóa các polisacarit (tinh bột, amilozơ), và vậy trước đây người ta còn gọi chi này bằng một tên khác - chi *Amylobacter*. Cũng vì chi vi khuẩn này thường chứa các hạt granulozơ trong cơ thể cho nên chúng còn mang một tên nữa - chi *Granulobacter*.

Căn cứ vào đặc điểm của quá trình lên men mà người ta chia chi *Clostridium* thành các nhóm sau đây :

Tên nhóm và tên loài	Cơ chất phân giải	Sản phẩm lên men
1. Lên men butiric : <i>C. butyricum</i> <i>C. lactoacetophilum</i> <i>C. pasteurianum</i> <i>C. pectinovorum</i>	Glucozơ, tinh bột Dextrin Glucozơ hay lactat (glixerin) + axetat Glucozơ, tinh bột Mannit, inulin Pectin, tinh bột Glicogen, dextrin	Axit butiric Axit axetic, CO_2 , H_2 Axit butiric Axit axetic, CO_2 + H_2 Axit butiric, a. axetic, CO_2 , H_2 Axit butiric Axit axetic Axit butiric, a. axetic
2. Sinh butanol : <i>C. butylicum</i> <i>C. acetobutylicum</i>	Glucozơ Glucozơ, glixerin Piruvat	Axit butiric, a. axetic, butanol, Izopropanol, CO_2 , H_2 Axit axetic, butanol
3. Sinh axit propionic : <i>C. propionicum</i>	Alanin, treonin	Axeton, etanol, CO_2 , H_2 Axit axetic Axit propionic, CO_2
4. Sinh axit capronic : <i>C. kluyveri</i>	Etanol + axetat + CO_2	Axit capronic Axit lactic, NH_3 , H_2
5. Phân giải protein : <i>C. botulinum</i> <i>C. histolyticum</i> <i>C. sporogenes</i> <i>C. sticklandii</i>	Protein, axit amin	Axit axetic Axit lactic, NH_3 , H_2
6. Có kiểu trao đổi chất đặc biệt : <i>C. aceticum</i> <i>C. tetanomorphum</i> <i>C. acidurici</i>	CO_2 + H_2 , fructozơ, Glutamat, histidin Axit uric, xantin	Axit axetic Axit butiric Axit axetic, NH_3 CO_2 , H_2 Axit axetic, Axit formic, CO_2 , NH_3

Một số loài *Clostridium* (điển hình nhất là *C. pasteurianum*) có khả năng cố định nitrogen không khí. Chúng có mặt ở hầu hết các mẫu đất (kể cả những đất có độ pH khá thấp) và có ý nghĩa rất tích cực đối với việc làm nâng cao dự trữ đạm của đất.

Diagram illustrating the metabolic pathways of Acetyl-CoA:

Left Pathway (Alcohol and Aldehyde Metabolism):

- Acetaldehyde:** $2\text{CH}_3\text{---CHO}$ is reduced by 4[H] (consuming 2CoA) to form **Ethanol** ($2\text{CH}_3\text{---CH}_2\text{OH}$).
- Butyraldehyde:** $\text{H}_3\text{---CH}_2\text{---CH}_2\text{---CHO}$ is reduced by 2[H] (consuming CoA) to form **Butanol** ($\text{H}_3\text{---CH}_2\text{---CH}_2\text{---CH}_2\text{OH}$).

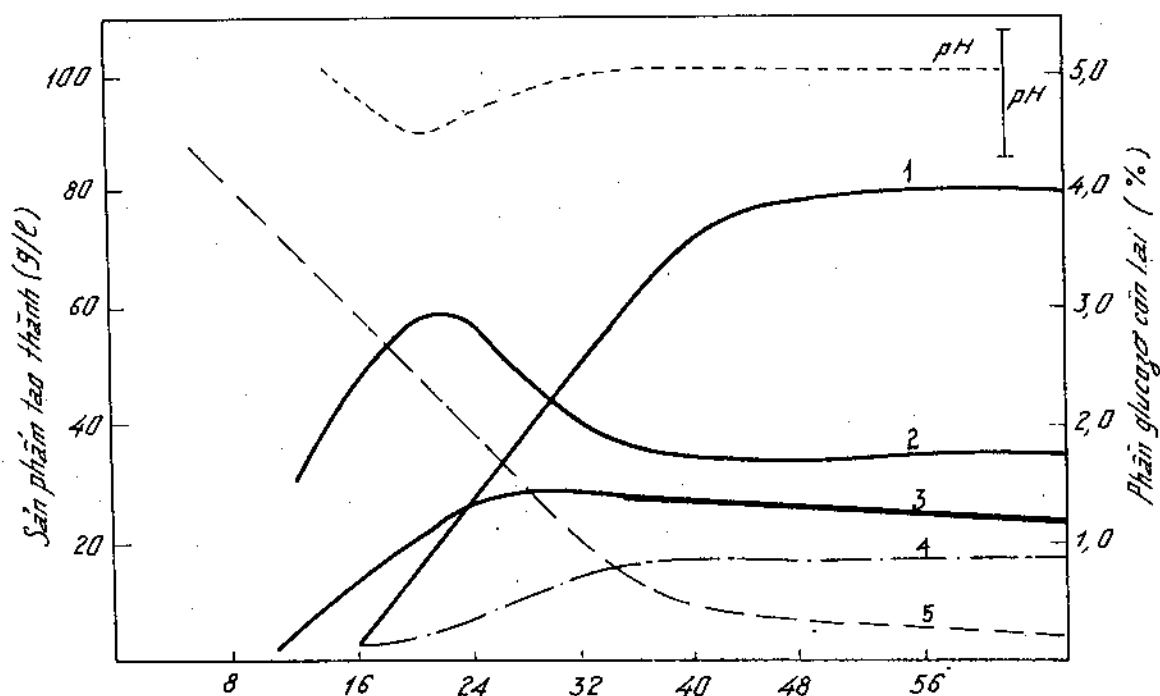
Right Pathway (Fatty Acid Synthesis):

- Acetyl-CoA:** $2\text{CH}_3\text{---CO---SCoA}$ is converted to **Acetoacetyl-CoA** ($\text{CH}_3\text{---CO---CH}_2\text{---CO---SCoA}$) by adding 2Pi and releasing 2CoA .
- Acetoacetyl-CoA:** This intermediate is converted to **Acetoacetyl** ($\text{CH}_3\text{---CO---CH}_2\text{---COOH}$) by releasing 2ADP and forming 2ATP .
- Acetoacetyl:** Decarboxylation (---CO_2) yields **Acetoacetyl** ($\text{CH}_3\text{---CO---CH}_3$).
- Acetoacetyl:** Reduction by 2[H] yields **Isopropanol** ($\text{CH}_3\text{---CHOH---CH}_3$).
- Acetoacetyl:** Alternatively, it is converted to **Butyryl-CoA** ($\text{CH}_3\text{---CH}_2\text{---CH}_2\text{---CO---SCoA}$) by adding 2[H] and releasing CoA .
- Butyryl-CoA:** This can be converted to **Butyraldehyde** ($\text{H}_3\text{---CH}_2\text{---CH}_2\text{---CHO}$) by releasing 2[H] and CoA , or to **Butyrate** ($\text{CH}_3\text{---CH}_2\text{---CH}_2\text{---COOH}$) by adding 2[H] and releasing CoA .

Vi khuẩn *C. acetobutylicum* khi lên men glucôzơ đầu tiên sẽ làm sinh ra axit butiric. Nhưng sau đó cùng với việc axit hóa môi trường sẽ bắt đầu xảy ra việc tổng hợp một số enzym (trong đó có cả enzym axetoaxetatdecaboxilaza). Dưới tác dụng của các enzym này, axeton và butanol sẽ được tích lũy lại trong môi trường. Quá trình lên men này thường được gọi là quá trình lên men axeton-butiric. Đó là cơ sở của ngành công nghiệp lên men nhằm sản xuất ra hai dung môi quan trọng là axeton và butanol.

$$12\text{C}_3\text{H}_{12}\text{O}_6 \rightarrow \underset{\text{butanol}}{\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}} + 4\underset{\text{axeton}}{\text{CH}_3\text{COCH}_3} + \underset{\text{etanol}}{\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}} +$$


Động thái của quá trình lên men axeton-butilic được trình bày trong đồ thị sau đây :



Động thái của quá trình lên men glucôzơ ở *C. acetobutylicum*
 Các đường liền (từ trên xuống dưới)
 1. butanol ; 2. axit butiric ; 3. axit axetic ; 4. axeton ; 5 glucôzơ

Khi lên men trong điều kiện kiềm (ví dụ có mặt CaCO_3) sản phẩm chủ yếu sẽ là axit butiric và axit axetic (tạo thành rất ít butanol và axeton).

Ảnh hưởng của CaCO_3 đối với sản phẩm của quá trình lên men axeton-butiric :

Sản phẩm lên men	Số lượng sản phẩm, mg/50 ml	
	Không có CaCO_3	Có CaCO_3
Axit butiric	32,4	630
Butanol	411,5	45,7
Axit axetic	102,4	230,7
Etanol	44,5	22,4
Axeton	222,3	13,2

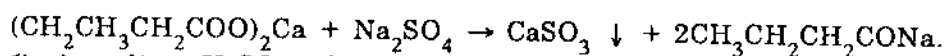
Quá trình lên men butiric và lên men axeton-butiric từ lâu đã được ứng dụng rộng rãi trong công nghiệp. Axit butiric được sử dụng trong công nghiệp sản xuất bánh kẹo, nước giải khát, chất thơm, công nghiệp thuốc da... Axeton là một dung môi quan trọng được sử dụng nhiều trong các ngành sản xuất thuốc nổ, chất dẻo, tinh luyện dầu hỏa, chiết rút dầu thực vật, xử lý phim ảnh, chế tạo chất thơm... Axeton còn được dùng nhiều trong phân tích hóa học và trong nghiên cứu khoa học. Butanol cũng là một dung môi rất phổ biến để hòa tan chất sơn, chất màu, chất béo, nhựa, sáp... Butanol còn là nguyên liệu để tổng hợp butadien dùng trong tổng hợp cao su nhân tạo.

Vi khuẩn thường được dùng để lên men butiric là loài *Clostridium butyricum* (tên cũ là *Granulobacter saccharobutylicus*). Loài vi khuẩn này có hình que, kích thước

khoảng $0,5 \times 4 - 12\mu\text{m}$. Bào tử có hình bầu dục, nằm ở giữa hoặc ở một đầu của tế bào. Bào tử có thể chịu đựng được khá cao đối với những điều kiện bất lợi của ngoại cảnh (trong nước sôi có thể sống được đến 1 - 2 phút).

Vi khuẩn lên men butilic thuộc loại kỵ khí bắt buộc. Chúng có khả năng lên men sinh axit đối với glucosơ, xilozơ, saccarozơ, tinh bột, mannitol, esculin... Nhiệt độ thích hợp để phát triển là $30 - 37^\circ\text{C}$. Trong sản xuất, để lên men butilic người ta thường sử dụng rỉ đường, các nguyên liệu giàu tinh bột (khoai tây ngũ cốc) hoặc bã thải của các nhà máy bột, nhà máy sản xuất axit lactic. Để dùng làm nguồn thức ăn nitơ, người ta thường bổ sung bột đậu, khô đậu hoặc khô lạc.

Quá trình lên men được tiến hành với sự có mặt của CaCO_3 . Axit butilic sinh ra được trung hòa thành muối canxi, sau đó người ta thêm Na_2SO_4 để chuyển thành muối Na của axit butilic :



Cuối cùng dùng H_2SO_4 để tách axit butilic ra.

Vi khuẩn butilic phân bố rất rộng rãi trong tự nhiên. Chúng có thể phát triển và làm ảnh hưởng tới một số quá trình lên men khác (như quá trình sản xuất rượu, bia, men ăn...). Vi khuẩn butilic còn là một trong những nguyên nhân trực tiếp trong việc làm hư hỏng rau quả, thịt cá, đồ hộp (các sản phẩm lên men butilic sẽ có mùi chua ủng).

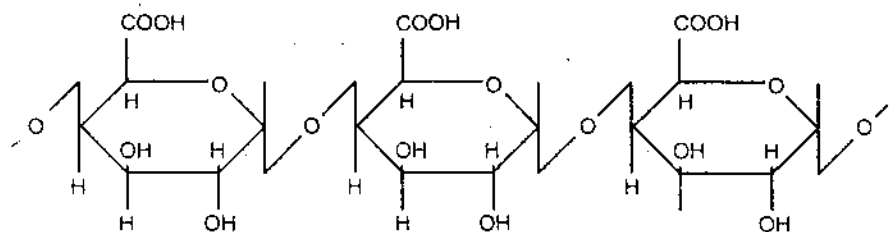
Vi khuẩn thường được dùng để lên men axeton-butilic là loài *C. acetobutylicum* hoặc loài *C. saccharo-acetobutylicum*. Đó là những vi khuẩn hình que kỵ khí, có khả năng di động kích thước khoảng $0,6 - 0,72 \times 2,6 - 4,7\mu\text{m}$. Nhiệt độ thích hợp đối với loài đầu là 38°C còn đối với loài thứ hai là 30°C . Vi khuẩn axeton-butilic phân bố rất rộng rãi trong tự nhiên, nhất là trong bùn ruộng, bùn ao. Chúng có thể lên men sinh axit đối với các đường arabinosơ, xilozơ, ramnosơ, glucosơ, galactosơ, mannitol, fructosơ, lactosơ, rafinosơ, tinh bột, dextrin, inulin, glicogen, mannitol...

Từ năm 1923 người ta bắt đầu triển khai việc lên men sản phẩm axeton và butanol ở quy mô công nghiệp. Để lên men axeton - butilic người ta thường sử dụng môi trường chứa 5 - 6% tinh bột (vì ngô chứa khoảng 65% tinh bột cho nên thường được dùng với nồng độ 8 - 10%). Từ 100kg tinh bột thường có thể thu hoạch được khoảng 37 - 40kg dung môi.

Một số loài *Clostridium* có khả năng lên men butilic chất pectin. Pectin là một trong những thành phần quan trọng của tế bào thực vật. Pectin thường chứa nhiều trong tầng gian bào của các mô thực vật và là thành phần chính trong lớp cùi của một số quả. Tốc độ khoáng hóa xác thực vật trên một mức độ lớn phù hợp vào sự phân giải pectin. Sau quá trình lên men pectin các tế bào thực vật sẽ tách rời khỏi nhau và tiếp tục chịu tác động của các nhóm vi sinh vật khác nhau để hoàn thành việc phân giải thành các hợp chất vô cơ đơn giản.

Pectin được tách ra sơ bộ lần đầu tiên từ năm 1824 (vì có dạng keo nên được gọi là pectin, tiếng Hi Lạp "pektys" có nghĩa là "thịt đông"). Mặc dầu đã được nghiên cứu nhiều nhưng cho đến nay người ta vẫn còn hiểu biết chưa nhiều về bản chất hóa học của loại hợp chất này. Nói chung người ta biết rằng pectin là một polisaccarit cao phân tử, khối lượng phân tử từ hàng chục nghìn đến hàng trăm nghìn. Chúng cấu tạo

bởi các gốc axit α -D-galacturonic, các gốc này liên kết với nhau nhờ những dây nối α -1,4-glucosít :



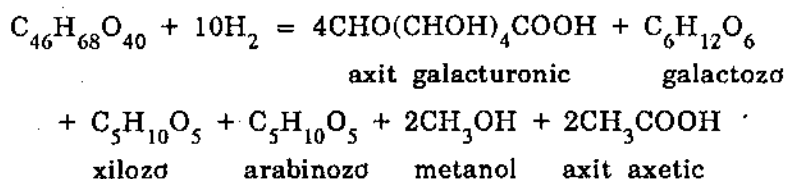
Thuật ngữ "chất pectin" thường được dùng để chỉ chung bốn nhóm sau đây :

- protopectin : một thành phần cấu trúc của màng tế bào, không tan trong nước ;
- pectin : hợp chất cao phân tử tan trong nước của axit galacturonic, có chứa liên kết metyl este.
- axit pectinic : hợp chất cao phân tử tan trong nước của axit galacturonic, hoàn toàn tách khỏi các liên kết metyl este.
- axit pectic : sản phẩm demetoxyl hóa của axit pectinic. Hòa tan kém hơn so với axit pectinic. Có thể tạo thành muối pectat.

Nhiều vi sinh vật có khả năng tham gia vào quá trình phân giải pectin (bao gồm vi khuẩn, nấm mốc và xạ khuẩn). Việc phân giải pectin được tiến hành với sự tham gia của một số enzym như :

- Protopectinaza : phân giải protopectin, tạo thành các pectin hòa tan.
- men pectinmetilesteraza : thủy phân liên kết metyl este của pectin, tạo thành metanol và axit pectinic, rồi thành axit pectic.
- Poligalacturonidaza : phân giải những liên kết giữa các gốc axit galacturonic của pectin hoặc của axit pectinic, tạo thành các chuỗi ngắn hoặc các phân tử axit galacturonic tự do.

Khi thủy phân axit pectinic (có công thức nguyên tử là $C_{46}H_{68}O_{40}$) người ta nhận thấy có khá nhiều loại sản phẩm được tạo thành :

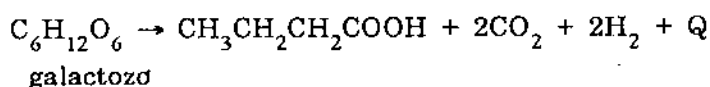
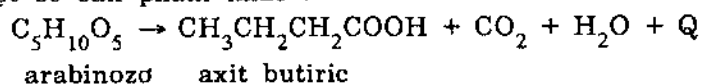


Sự thủy phân pectin, axit pectinic không sinh ra năng lượng, vì vậy một số sản phẩm của quá trình thủy phân này sẽ bị các vi sinh vật này tiếp tục oxi hóa hoặc lên men. Trong điều kiện kỵ khí chúng sẽ bị lên men butiric mạnh mẽ nhờ sự tham gia của một số vi khuẩn thuộc giống *Clostridium* (chủ yếu là sự tham gia của *C. pectinovorum* và *C. felsineum*).

C. pectinovorum là những trực khuẩn tương đối lớn ($0,8 \times 10 - 15\mu m$) bào tử nằm ở một đầu làm cho tế bào có hình dùi trống. Khi lên men pectin sẽ làm sinh ra axit butiric, axit axetic H_2 và CO_2 . Trong những điều kiện nhất định còn có thể làm sinh ra cả axeton và butanol.

C.felsineum là những trực khuẩn có hình dạng tương tự như loài nói trên. Chúng đặc biệt có thể phát triển được ở cả những nhiệt độ khá cao.

Khi lên men các sản phẩm phân giải dở dang của pectin sẽ được chuyển hóa thành axit butiric và một số sản phẩm khác :



Việc lên men butiric các chất pectin từ lâu đã được ứng dụng để ngâm dầy, ngâm gai, ngâm dớ, nhằm tách lấy sợi làm dây thừng, làm bao tải, làm giấy...

Muốn tách lấy sợi ở lớp vỏ các cây dầy, gai, dớ... trước hết cần phân giải chất pectin chứa trong tầng gian bào của tế bào lớp vỏ các cây này, sau đó dùng các biện pháp cơ học (tước hoặc chải) sẽ có thể thu được sợi một cách rất dễ dàng.

Để tiến hành phân giải pectin người ta thường sử dụng hai phương pháp lên men tự nhiên : dầm sương và ngâm nước.

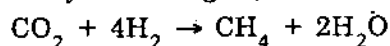
Dầm sương là phương pháp trải cây có sợi lên những bãi cỏ. Nhờ sương và nước mưa mà các cây này luôn luôn ẩm ướt. Vì sinh vật sẽ phát triển và tiến hành phân giải pectin. Quá trình phân giải này chủ yếu dựa vào khu hệ các vi sinh vật hiếu khí. Vì nhiệt độ giữa ngày và đêm chênh nhau nhiều, mặt khác vì độ ẩm của thân cây không đều cho nên phương pháp dầm sương cho hiệu quả chậm, chất lượng của sợi cũng thường kém.

Phương pháp ngâm nước là chủ yếu dựa vào tác dụng của khu hệ vi sinh vật kỵ khí. Người ta lấy các cây có sợi ngâm xuống đầm, ao hoặc ngâm trong các bể xây. Nếu nhiệt độ của nước là vào khoảng 20 - 30°C thì chỉ sau 2 - 3 ngày đã thấy bọt khí sinh ra rất nhiều. Đó là khí CO₂ sinh ra do quá trình phân giải của nhóm vi sinh vật hiếu khí. Bọt này sẽ làm tiêu thụ nhanh chóng phần oxy tan trong nước và tạo điều kiện cho nhóm vi sinh vật kỵ khí phát triển. Các vi sinh vật kỵ khí sẽ tiến hành lên men butiric chất pectin và làm cho sợi có thể được tách ra một cách dễ dàng. Người ta nhận thấy nhiệt độ của nước ngâm có ảnh hưởng rất nhiều đến tốc độ phân giải pectin. Nếu nhiệt độ của nước là 16 - 18°C thì thường phải ngâm đến 10 - 15 ngày. Nếu nhiệt độ là 20 - 25°C thì cần 5 - 7 ngày, còn nếu nhiệt độ là 33 - 35°C thì chỉ cần có 3 - 4 ngày. Nếu bổ sung vào nước ngâm một ít thức ăn nitơ, photpho, canxi hoặc cấy thêm các bình giống vi khuẩn đã được lựa chọn và nuôi cấy nhân tạo vào các bể ngâm thì quá trình phân giải pectin và quá trình làm tách sợi sẽ có thể rút ngắn lại hơn nữa và chất lượng của sợi cũng sẽ được nâng cao hơn.

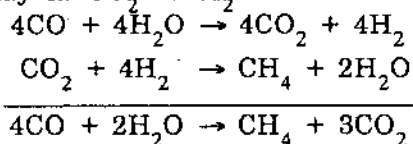
4.6. "Lên men" metan

Vi khuẩn sinh metan cũng là những loại vi khuẩn kỵ khí bắt buộc. Chúng chuyển hóa rượu và axit hữu cơ thành CH₄, CO₂ và có thể còn sinh ra một số axit hữu cơ được oxy hóa triệt để.

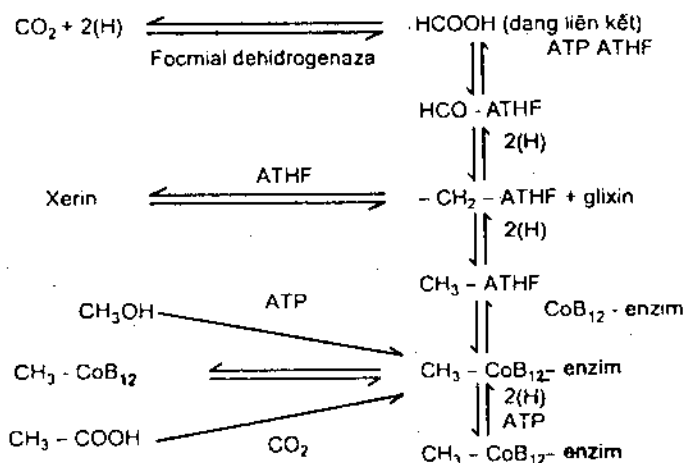
Metan có thể được sinh ra do quá trình khử CO₂ dưới tác dụng của chúng. *Methanobacterium M.O.H.* Đây là chủng vi khuẩn sinh metan của một giống hỗn hợp (trong một thời gian dài người ta cho rằng đây là một loài riêng biệt - *Methanobacterium omelianskii*). Quá trình lên men này rất đơn giản, chất cho hidro ở đây là hidro phân tử :



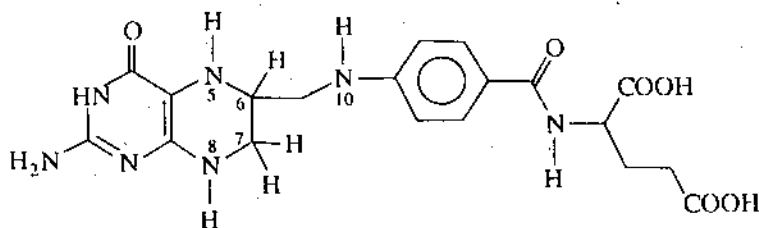
Vi khuẩn này rất giống với loài vi khuẩn *Methanobacterium formicicum*. Chúng đều là các vi khuẩn kỵ khí có khả năng oxy hóa hidro phân tử, chỉ khác nhau ở chỗ một loại có khả năng đồng hóa axit fomic, một loại không. Một loài vi khuẩn khác là *Methanosarcina barkeri* có khả năng chuyển hóa CO thành CH₄. Sản phẩm trung gian của quá trình chuyển hóa này là CO₂ và H₂ :



Vi khuẩn sinh metan được chứng minh là loại vi sinh vật có khả năng sinh tổng hợp mạnh mẽ vitamin B₁₂. Sơ đồ giả thuyết về sự hình thành CH₄ từ CO₂ hoặc axetat ở vi khuẩn sinh metan có thể được trình bày như sau :



Trong sơ đồ nói trên CoB₁₂ là coenzim B₁₂, còn ATHF là axit tetrahydrofolic một chất có công thức như sau :



Ở đây, nguồn cacbon để tạo thành CH₄ có thể là CO₂, fomiciat, metanol nhóm metyl của axetat, nguyên tử β-cacbon của xerin và meticolalamin. Quá trình fomiciat xảy ra với sự tham gia của ATHF. Cacbon sau khi khử thành nhóm metyl sẽ được chuyển tới B₁₂ - coenzim và sau đó với sự tham gia của ATP sẽ tiếp tục được khử thành metan.

Tuy nhiên, theo những tài liệu gần đây thì nhiều điểm trong sơ đồ này còn chưa được làm sáng tỏ. Ví dụ trong dịch nuôi cấy thuần khiết người ta không thấy có sự tham gia của axit tetrahydrofolic và coenzim - B₁₂. Mặt khác lại có thể tìm thấy một coenzim khác, coenzim M, hoạt động như một chất mang nhóm metyl. Coenzim này có cấu trúc HS - CH₂ - CH₂ - SO₃⁻ trong đó nhóm sunphidryl chính là nơi gắn nhóm metyl (theo Fritsche, 1978).

Tùy loài vi khuẩn mà cơ chất (chất cho hiđro) của quá trình lên men không giống nhau. Cơ chất lên men metan ở một số loài vi khuẩn khác nhau :

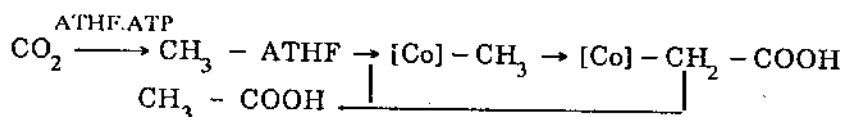
Loại vi khuẩn	Cơ chất	Nguồn carbon của CH ₄
<i>Methanobacterium M.O.H.</i>	H ₂	CO ₂
<i>Methanasarcina barkeri</i>	H ₂ , CO, metanol, axetat	CO ₂ , CO
<i>Methanobacterium formicicum</i>	H ₂ , CO, fomiciat	CO ₂
<i>Methanococcus vannielli</i>	H ₂ , fomiciat	CO ₂
<i>Methanobacterium runinanthum</i>	H ₂ , fomiciat	CO ₂
<i>Methanobacterium suboxydans</i>	Butirat, valerat, capronat	CO ₂
<i>Methanobacterium sohngeni</i>	Axetat, butinat	nhóm - CH ₃
<i>Methanasarcina methanica</i>	Axetat, metanol, butirat	nhóm - CH ₃
<i>Methanococcus mazei</i>	Axetat, butirat	nhóm - CH ₃

4.7. Lên men axetat

Một số *Clostridium* (như *C. aceticum*, *C. thermoaceticum*, *C. aciduri*, *C. cylindrosporum*...) có khả năng chuyển hidro của cơ chất không những đến các chất nhận hidro hữu cơ mà đến cả CO_2 và làm tạo thành axit axetic. Quá trình lên men kị khí này được gọi là quá trình lên men axetat. Khác với quá trình tạo thành giấm, chất nhận hidro khi lên men axetat là CO_2 còn khi tạo thành giấm là oxi phân tử.

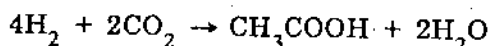
Vi khuẩn ưa nhiệt *C.thermoaceticum* và vi khuẩn ưa ấm *C.aceticum* có khả năng lên men đường chủ yếu theo hướng tạo thành axit axetic.

Cơ chế giả thuyết của quá trình chuyển hóa CO_2 thành axit axetic ở vi khuẩn *C.thermoaceticum* như sau ;

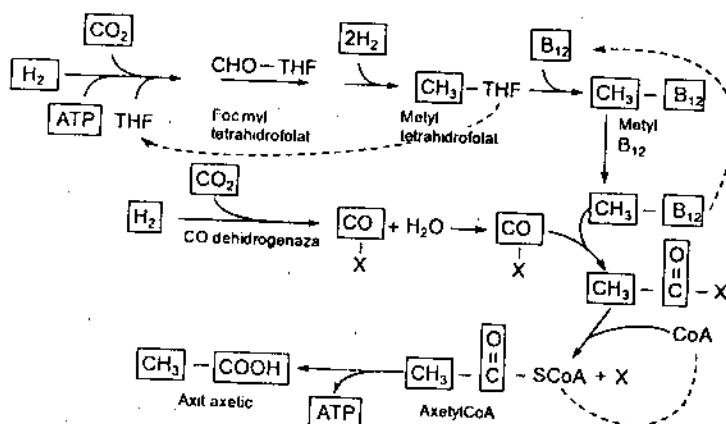


Trong sơ đồ nói trên ta thấy rõ ràng quá trình lên men axetat này có liên quan đến sự tham gia của axit tetrahydrofolic (ATHF) và sự tham gia của vitamin B₁₂ ([Co]). CO₂ được tách ra từ quá trình phân giải, piruvat được cố định lại và trở thành chất nhận hidro.

Vì khuẩn ưa ấm *C.aceti* có khả năng tổng hợp axetat từ CO_2 và hidro phân tử :



Cơ chế của quá trình chuyển hóa CO_2 thành axit axetic



4.8. Lên men xenlulozơ

Xenlulozơ là một trong những thành phần chủ yếu của tổ chức thực vật. Trong xác thực vật (nhất là trong thân và trong rễ) thì thành phần hữu cơ chiếm tỉ lệ cao nhất bao giờ cũng là xenlulozơ. Hàm lượng xenlulozơ trong xác thực vật thường thay đổi trong khoảng 50-80% (tính theo khối lượng khô), trong sợi bông hàm lượng này thường vượt quá 90%. Có người đã tính thấy rằng tổng lượng xenlulozơ trên Trái Đất này là vào khoảng 3500 tỉ tấn. Nếu không có quá trình phân giải xenlulozơ thì số lượng này sẽ tăng lên rất nhanh và chẳng bao lâu tất cả CO_2 trong không khí sẽ bị chuyển hóa hết thành xenlulozơ, sự sống sẽ không tồn tại được nữa.

Xenlulozơ lại là hợp chất rất bền vững. Đó là loại polisaccarit cao phân tử. Chúng cấu tạo bởi rất nhiều gốc β -glucozơ, liên kết với nhau nhờ dây nối β 1,4-glucozit. Mỗi phân tử xenlulozơ thường có chứa từ 1400 đến 10.000 gốc glucozơ. Khối lượng phân tử xenlulozơ thay đổi khác nhau phụ thuộc vào tùy từng loại thực vật và tùy phương pháp xác định (khi xác định bằng phương pháp siêu li tâm người ta nhận thấy khối lượng phân tử của xenlulozơ ở bông là 150.000-500.000 còn ở gai là 1.840.000).

Trong tự nhiên có nhiều loại vi sinh vật có khả năng sinh ra các men làm xúc tác quá trình phân giải xenlulozơ. Những vi sinh vật này được gọi là vi sinh vật phân giải xenlulozơ. Chúng có ý nghĩa rất lớn đối với việc thực hiện vòng tuần hoàn cacbon trong tự nhiên, góp phần rất quan trọng vào việc nâng cao độ phì nhiêu của đất cũng như vào việc tiêu hóa thức ăn ở các loài động vật nhai lại.

Trong điều kiện thoáng khí xenlulozơ có thể bị phân giải dưới tác dụng của nhiều nhóm vi sinh vật hiếu khí (vi khuẩn, nấm vi khuẩn, xạ khuẩn, nấm mốc, nấm mũ...).

Các loài vi sinh vật hiếu khí có khả năng phân giải xenlulozơ mạnh mẽ thường thuộc về các chi sau đây : *Achromobacter*, *Pseudomonas*, *Cellulomonas*, *Vibrio*, *Cellvibrio*, *Bacillus* (Vi khuẩn), *Chondromyces*, *Myxococcus*, *Cytophaga*, *Angiococcus*, *Polyangium*, *Sporocytophaga*, *Sorangium*, *Archangium*, *Promyxobacterium*... (Niêm vi khuẩn), *Micromonospora*, *Proactinomyces*, *Actinomyces*, *Streptomyces*, *Streptosporangium*... (Xạ khuẩn), *Fusarium*, *Chaetomium*, *Aspergillus*, *Penicilium*, *Alternaria*, *Rhizopus*, *Trichoderma*, *Rhizoctonia*, *Botrytis*, *Trichothecium*, *Verticillium*, *Myrothecium* (Vi nấm) và *Meralius*, *Fomes* (Nấm mũ). Những loài đang được chú ý nhiều nhất hiện nay là *Cellulomonas fimi*, *Trichoderma viride*, *Penicilium variable*, *Chaetomium globosum*, *Myrothecium*, *verrucaria*, *Rhizoctonia solani*, *A. fumigatus*, *A. nidulans*, *Botrytis cinerea*, *Micromonospora chalcone*, *Streptomyces cellulosa* v.v... Nhiều nghiên cứu gần đây cho biết các vi sinh vật hiếu khí này ít nhất cũng làm sinh ra 2 loại enzym phân giải xenlulozơ : xenlulazơ C_1 và xenlulazơ C_x . Enzim C_1 tác động sơ bộ vào các phân tử xenlulozơ thiên nhiên và biến chúng thành các chuỗi xenlulozơ mạch thẳng. Sau đó dưới tác dụng của enzym C_x sẽ bị phân hủy thành đường xenlobiozơ (gồm hai phân tử glucozơ). Loại đường này có thể tan trong nước và dưới tác dụng của β -glucozidaza (hay xenlobiaza) rất dễ dàng chuyển hóa thành glucozơ.

Ngoài các vi sinh vật hiếu khí còn có một số vi khuẩn kỵ khí có khả năng tham gia tích cực vào quá trình phân giải xenlulozơ. Người ta gọi quá trình phân giải xenlulozơ kỵ khí là quá trình "lên men xenlulozơ".

C. thermocellum là loài vi khuẩn được nghiên cứu rất nhiều bởi nhà khoa học Nga A.A. Imshenetski. Chúng được phân lập lần đầu từ phân ngựa, lúc còn non có hình que ngắn, khi trưởng thành có hình uốn cong với kích thước khá dài, bào tử sinh ra ở một đầu của tế bào. Loại vi khuẩn này có thể phát triển được trên các môi trường tổng hợp đơn giản chứa nguồn cacbon là xenlulozơ hoặc xenlobiozơ, nguồn nitơ là muối NH_4^+ . Chúng không sử dụng được glucozơ và nhiều loại đường khác, chúng phát triển và lên men mạnh mẽ ở nhiệt độ 60–65°C, giới hạn nhiệt độ cao nhất thường là 70°C còn ở 40–50°C người ta nhận thấy chúng bắt đầu kém phát triển. Sản phẩm của quá trình lên men xenlulozơ ở vi khuẩn này là etanol, axit axetic, axit fomic, axit lactic, H_2 và CO_2 . Có lẽ enzym xenlulaza chỉ giúp chúng chuyển hóa xenlulozơ thành xenlobiozơ. Việc lên men xenlobiozơ được thực hiện nhờ sự xúc tác của nhiều loại men khác.

Vi khuẩn ưa ấm *Comelianskii* được nhà khoa học Nga V.L. Omelianxki phân lập lần đầu tiên năm 1902. Đó là loại vi khuẩn có hình que, kích thước 0,5 – 3 × 4 – 8 μm, có khả năng di động. Bào tử được hình thành ở một đầu do đó làm cho vi khuẩn trở nên có hình dáng giống cái dùi trống. Loại vi khuẩn này phát triển và lên men mạnh mẽ nhất ở nhiệt độ 30 – 40°C. Sản phẩm của quá trình lên men này là etanol, axit axetic, axit lactic, axit fomic, H_2 và CO_2 .

Còn một nhóm vi sinh vật đặc biệt nữa có khả năng phân giải xenlulozơ một cách mạnh mẽ trong điều kiện kỵ khí đủ là nhóm các vi sinh vật sống trong dạ cỏ của trâu bò và các động vật nhai lại khác. Trâu bò sẽ không thể nào tiêu hóa được cỏ rơm rạ nếu không có sự cộng sinh với một khu hệ đông đúc các vi sinh vật bên trong dạ cỏ của chúng. Nhiều nghiên cứu cho biết trong mỗi ml các chất lấy được từ dạ cỏ bò, người ta nhận thấy thường có khoảng 10^9 – 10^{10} tế bào vi khuẩn. Sinh khối vi khuẩn chiếm đến 5–10% so với lượng khô của toàn bộ các chất chứa trong dạ cỏ trâu bò. Ngoài vi khuẩn ra trong mỗi ml các chất lấy từ dạ cỏ còn thấy có khoảng vài triệu cơ thể động vật nguyên sinh (cũng chiếm tới 6–10% khối lượng khô).

Về khu hệ vi khuẩn của dạ cỏ động vật nhai lại có thể kể đến rất nhiều loài, nhưng trong số này những loài có khả năng phân giải xenlulozơ mạnh mẽ nhất là: *Ruminococcus flavefaciens*, *Ruminococcus albus*, *Ruminobacter parvum*, *Bacteroides succinogenes*, *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Clostridium cellobioparum*, *Cillobacterium cellulosolvens*... Còn về các loại động vật nguyên sinh sống trong dạ cỏ mà có ít nhiều khả năng đồng hóa xenlulozơ thì có thể kể đến một số loài trong các chi *Ophryoscolex*, *Isotrich*, *Dasytricha*...

Các cấu khuẩn sống trong dạ cỏ được nghiên cứu nhiều nhất là thuộc về 2 loài: *Ruminococcus flavefaciens* và *R. albus*. *R. flavefaciens* là loại cấu khuẩn Gram dương, thường xếp thành hình chuỗi, có khả năng sinh sắc tố vàng. Sản phẩm cuối cùng khi lên men xenlulozơ và xenlobiozơ là axit xuxinic và axit axetic. Một số chúng còn có thể làm sinh ra một lượng nhỏ axit lactic, axit fomic và etanol. *R. albus* khi lên men xenlulozơ và xenlobiozơ thường làm sinh ra axit axetic, etanol, axit fomic, H_2 và CO_2 . Ngoài xenlulozơ và xenlobiozơ, một số loài *Ruminococcus* còn có thể đồng hóa cả xilan, hemixenlulozơ, lactozơ, mannozơ, fructozơ và glucozơ. *Ruminococcus* có khả năng đồng hóa nitơ của các muối amon. Chúng sẽ phát triển tốt hơn nếu môi trường có chứa axit axetic và axit izovaleric. Về vitamin chúng thuộc loại cần biotin, axit paraaminobenzoic và vitamin B_6 .

Bacteroides succinogenes là loại trực khuẩn G⁻, kỵ khí bắt buộc, không sinh bào tử. Nguồn năng lượng tốt nhất đối với chúng là xenlulozơ và glucozơ. Chúng còn có khả năng đồng hóa cả tinh bột, xenlobiozơ, pectin và một số đường khác. Sản phẩm

cuối cùng của quá trình lên men xenlulozơ là axit xucxinic và một lượng nhỏ axit axetic, axit focmic. Để phát triển tốt, chúng đòi hỏi phải có muối amon và một lượng nhỏ xixtein. Chúng còn cần cả một ít biotin và axit paraaminobenzoic. Để nuôi cấy loại vi khuẩn này, người ta thường dùng môi trường chứa dịch dạ cỏ, xenlulozơ, một số muối vô cơ và bicacbonat.

Butyrivibrio fibrisolvens là loại trực khuẩn uốn cong Gram âm, không sinh bào tử. Ngoài xenlulozơ chúng còn có khả năng đồng hóa cả tinh bột, hemixenlulozơ, xilan, glucôzơ, galactozơ, arabinozơ và nhiều hidrat cacbon khác. Để sinh trưởng tốt, loài vi khuẩn này đòi hỏi phải được cung cấp một số aminoaxit (như histidin, loxin, izoloxin, metionin, lizin và xixtein)... Thiếu các chất này chúng sẽ phát triển rất chậm. Chúng còn cần được cung cấp một số chất như biotin, axit folic và vitamin B₆. Loại vi khuẩn này phân bố khá rộng rãi trong tự nhiên, ngoài sự có mặt trong dạ cỏ, người ta còn thấy chúng có mặt cả trong phân thỏ hoặc phân ngựa.

Cillobacterium cellulosolvens cũng là những trực khuẩn kỵ khí, không sinh bào tử. Chúng thuộc loại Gram dương, có khả năng di động. Ngoài khả năng đồng hóa xenlulozơ, loài vi khuẩn này còn có thể đồng hóa cả glucôzơ, xenlobiozơ, maltozơ, fructozơ, inulin và xalixin. Sản phẩm chủ yếu sinh ra trên môi trường chứa xenlulozơ là axit lactic.

Về trực khuẩn kỵ khí sinh bào tử có khả năng phân giải xenlulozơ trong dạ cỏ cần phải kể đến loài *Clostridium cellobioparum*. Loại vi khuẩn này được phân lập từ năm 1944 (Hungate, 1944). Chúng thuộc loại vi khuẩn Gram âm, có khả năng lên men xenlulozơ và một số hợp chất hidrat cacbon khác. Sản phẩm của quá trình lên men này là axit axetic, axit focmic, axit lactic, etanol, H₂ và CO₂. Gần đây người ta còn phân lập được từ dạ cỏ hai loài *Clostridium* khác (*C. locheadii* và *C. longisporum*). Khi lên men xenlulozơ, xenlobiozơ và một số đường khác các vi khuẩn này sẽ làm sinh ra khá nhiều chất nhầy.

5. CÁC QUÁ TRÌNH OXI HÓA KHÔNG HOÀN TOÀN

Phần lớn các vi sinh vật hiếu khí tiến hành oxi hóa chất dinh dưỡng hữu cơ thành CO₂ và H₂O (hô hấp). Vì cacbon trong CO₂ đạt tới mức oxi hóa cao nên người ta thường gọi quá trình này là quá trình oxi hóa hoàn toàn. Một số vi sinh vật có khả năng oxi hóa cơ chất trong điều kiện hiếu khí nhưng lại làm sinh ra những sản phẩm chưa được oxi hóa hoàn toàn (như ketoaxit, axit axetic, axit gluconic, axit fumaric, axit limonic...). Vì có tích lũy các sản phẩm giống các quá trình lên men kỵ khí cho nên người ta còn gọi các quá trình oxi hóa không hoàn toàn là các quá trình "lên men". Chữ "lên men" ở đây được dùng theo thói quen (ví dụ lên men axetic, lên men limonic...) chứ thực ra những quá trình này không phải là lên men mà là oxi hóa hiếu khí.

Rất nhiều quá trình oxi hóa không hoàn toàn có ý nghĩa quan trọng trong công nghiệp lên men vì chúng làm sản sinh ra nhiều sản phẩm rất có giá trị.

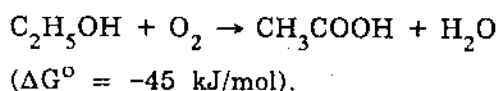
5.1. Quá trình oxi hóa etanol thành axit axetic

Từ thời thượng cổ người ta đã biết chế tạo giấm và chỉ khoảng 2 thế kỉ gần đây người ta mới biết sản xuất ra axit axetic ở dạng đậm đặc. Axit axetic có khoảng 3% trong giấm. Thời xưa người ta để chua rượu vang để tạo thành giấm (tiếng Pháp

vinaigre là giấm, bao gồm *vin* là rượu nho và *aigre* là chua). Giấm được tạo thành từ một dung dịch rượu vang để tĩnh, người ta cho sự biến đổi này là một quá trình lên men cho nên gọi là lên men axetic.

Về thực chất đây là một quá trình oxi hóa được thực hiện bởi một nhóm vi khuẩn gọi là vi khuẩn axetic (thuộc chi *Acetobacter*).

Quá trình oxi hóa này có thể biểu thị như sau :



Hàng năm nhân loại tiêu thụ một lượng giấm tương đương với 160.000 tấn axit axetic tinh khiết (hay 3,2 tỉ lít giấm chứa 5% axit axetic).

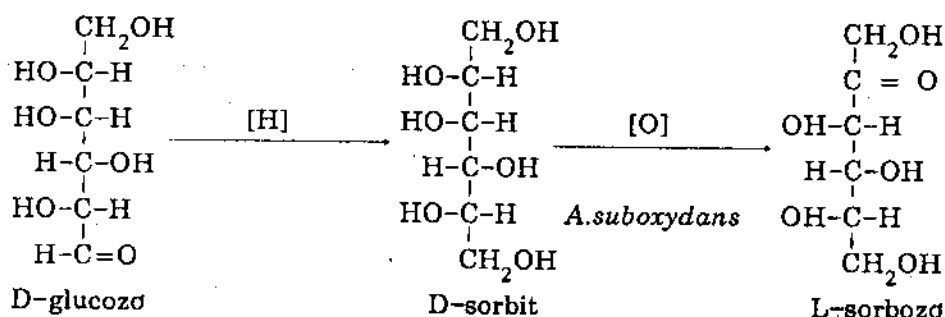
Còn có một khối lượng lớn axit axetic đậm đặc được sản xuất ở quy mô công nghiệp để sử dụng trong các ngành công nghiệp (sản xuất các loại este, các loại axetyl, axetaldehyt, axetat xenlulozơ, tổng hợp indigo, tổng hợp chất diệt cỏ, tổng hợp aspirin và nhiều dược phẩm khác, chế biến mủ cao su thành cao su bán thành phẩm).

Vi khuẩn axetic là những vi khuẩn hình que, hiếu khí, G^- . Chúng thuộc chi *Acetobacter*, thuộc họ *Acetobacteriaceae*. Họ này ngoài chi *Acetobacter* còn có chi *Gluconobacter*. Hai chi này đều có thể sinh trưởng ở pH = 4,5, đều có thể oxi hóa etanol thành axit axetic ở pH = 4,5 nhưng *Acetobacter* có tiên mao kiểu chu mao (peritrichous) còn *Gluconobacter* có tiên mao kiểu cực mao (polar). Ngoài ra khác với *Acetobacter*, chi *Gluconobacter* không có chu trình ATC đầy đủ trong hô hấp hiếu khí (do đó không oxi hóa được axetat).

Hai chi vi khuẩn này rất gần gũi với chi *Pseudomonas*, tuy vậy có thể phân biệt dễ dàng vì *Pseudomonas* không phát triển được ở pH = 4,5 và không oxi hóa được etanol thành axit axetic.

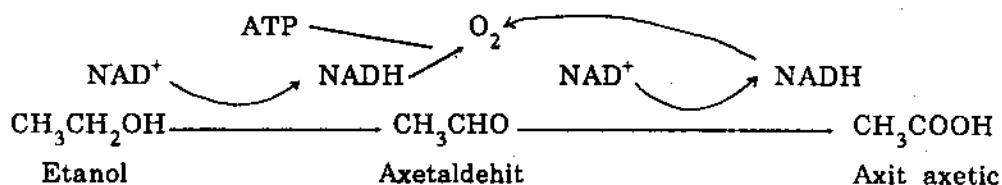
Theo các khóa phân loại hiện nay (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 9th Edition, 1994, 2000) thì *Acetobacter* gồm có 7 loài khác nhau : *Acetobacter aceti*, *A.schutzenbachii*, *A. orleanense*, *A. xylinum*, *A.suboxydans*...

Nói chung *Acetobacter* thường phát triển tốt ở 25-30°C. *A.aceti* có thể tích lũy tới 11,5% axit axetic, *A.orleanense* có thể tích lũy 9,5 % axit axetic. Loài *A.xylinum* có thể tạo váng dày và dai do thành tế bào chứa xenlulozơ và hemixenlulozơ. Nhiều nước ở Đông Nam Á đã nuôi cấy *A.xylinum* trên nước dừa già để tạo ra sản phẩm Nata de Coco, ăn có hương vị của củ nhãn, củ vải. *A. suboxydans* có khả năng oxi hóa rượu sorbit thành sorbozơ :



Khi nuôi cấy *A. suboxydans* trên môi trường chứa 25% sorbit, vi khuẩn này có thể oxi hóa đến 90% D-sorbit thành L-sorbozo. Từ sorbozo người ta sẽ dùng các phương pháp tổng hợp hóa học để sản xuất ra axit ascorbic (vitamin C).

Có thể trình bày tóm tắt quá trình oxi hóa etanol thành axit axetic như sau :



Có 3 phương pháp khác nhau để sản xuất giấm (hay dung dịch axit axetic nồng độ thấp).

1- Phương pháp chậm : Phương pháp này còn gọi là phương pháp chum hồ, phương pháp Orleans hay phương pháp Pháp. Quá trình này được thực hiện ở Pháp bằng cách "lên men" rượu vang trong các thùng gỗ từ năm 1670. Hiện nay ở Việt Nam người ta vẫn sản xuất giấm bằng phương pháp này trong các chum sành. Để giấm tươi vào 1/5 chum, sau cho dịch lên men (dung dịch chứa 2-4% etanol, 1-2% axit axetic) đến khoảng 1/2 chum. Vi khuẩn *Acetobacter* sẽ phát triển trên bề mặt (tạo thành "cái giấm"). Sau 1 tuần lại bổ sung thêm dịch lên men cho đến đầy chum. Quá trình oxi hóa thường kéo dài (khoảng 35 ngày), nồng độ axit axetic thường đạt 3-5%. Giấm được lọc trong và khử trùng Pasteur (Pasteurization).

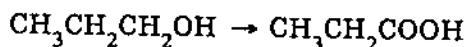
2- Phương pháp nhanh : Phương pháp này còn gọi là phương pháp chảy nhỏ giọt hay phương pháp Đức. Phương pháp này được Schützenbach nêu lên vào năm 1823. Người ta tạo ra bề mặt tiếp xúc lớn giữa vi khuẩn *Acetobacter* với không khí để thúc đẩy nhanh hơn quá trình oxi hóa etanol. Bề mặt lớn được tạo ra bằng cách dùng vỏ bào, lõi ngô... xếp đầy trong một thùng lên men giấm hình trụ hay hình côn ; hình nón cụt, thường làm bằng gỗ với kích thước 2,5-6 × 1,2-3m. Dịch lên men (thường chứa 6% axit axetic và 3% etanol) cho chảy từ từ qua cột. Giấm thu được thường có chứa 8-9% axit axetic. Các thùng lên men giấm này có thể dùng lâu dài (5-30 năm) và ngày nay đã được cải tiến bằng các thiết bị khá lớn (20, 40, 60 m³) do hãng Frings sản xuất. Hiệu suất oxi hóa là 85-90% so với lý thuyết, năng suất oxi hóa là 5l etanol/m³ vỏ bào/ngày. Với phương pháp này thời gian sản xuất giấm rút lại chỉ còn 5-6 ngày. Tuy nhiên vì etanol và axit axetic đều dễ bay hơi nên lượng thất thoát còn tới 2-6%.

3- Phương pháp chìm : Phương pháp này còn gọi là phương pháp bọt khí hay phương pháp dùng acetato. Đây là phương pháp do Ebner và Hromatka nêu lên từ năm 1949. Người ta tạo ra các nổi lên men đặc biệt (gọi là acetato) và cho lên men có thổi khí nhỏ một dịch lên men (chứa 6-12% etanol và 1-3% axit axetic). Quá trình oxi hóa hoàn thành sau 40-96 giờ, sản phẩm chứa 7-13% axit axetic. Ngày nay hầu hết các acetato được sử dụng trên thế giới đều do hãng Frings (CHLB Đức) sản xuất. Các thiết bị đang được bán có thể oxi hóa 75,150, 300,600, 1200 và 1800 lít etanol (tính theo etanol 100%) trong 24 giờ. Kunitatsu và cộng sự (1981) đã cải tiến

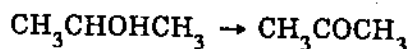
quy trình lên men thành 2 giai đoạn, giai đoạn đầu lên men ở 27-32°C, giai đoạn sau lên men ở 18-24°C. Sản phẩm thu được có nồng độ axit axetic vượt quá 20%.

Ngoài ba phương pháp nói trên còn có những phương pháp cải tiến. Chẳng hạn phương pháp phối hợp giữa phương pháp nhanh và phương pháp chìm (phần trên theo phương pháp nhanh, phần dưới khi dịch lên men chảy qua cột vật liệu xốp rồi, sẽ được thổi khí bổ sung như trong acetato).

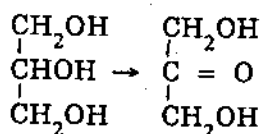
Vi khuẩn axetic có thể oxi hóa propanol thành axit propionic :



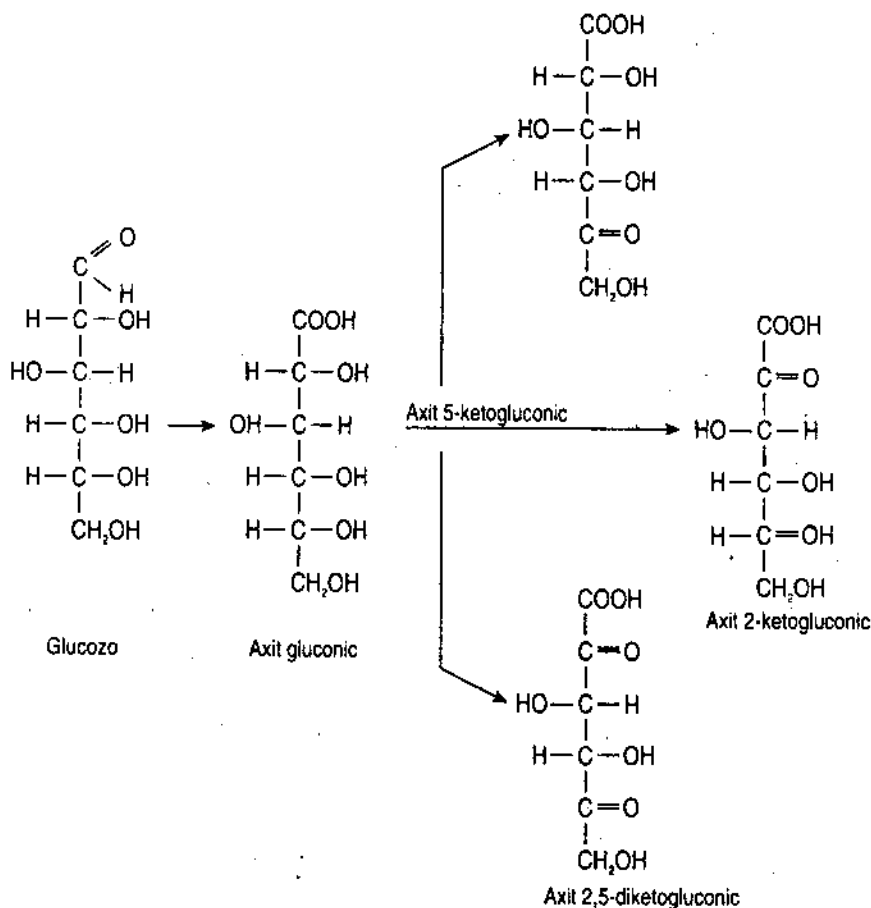
Oxi hóa izopropanol thành axeton :



Vi khuẩn axetic còn có thể oxi hóa glixerin thành dioxi axeton.



Còn một quá trình oxi hóa nữa cũng rất đáng chú ý là quá trình oxi hóa glucozo thành axit gluconic và một số axit khác :



A.suboxydans là loài vi khuẩn có khả năng tích lũy axit gluconic rất mạnh mẽ. Người ta thường sử dụng chúng để chế tạo canxi gluconat (thuốc chữa các bệnh thiếu canxi). Môi trường lên men thường chứa 15% glucôzơ ; 0,2% $MgSO_4$; 0,3% KH_2PO_4 và 0,3% $(NH_4)_2HPO_4$ hay pepton. Quá trình lên men tiến hành ở 25-30°C trong khoảng 1-2 tuần. Sau khi lên men li tâm lấy dịch trong, đun nóng và trung hòa bằng $CaCO_3$.

Để chuyển hóa axit gluconic thành axit 2-ketogluconic và axit 2,5 diketogluconic người ta lại sử dụng một loài vi khuẩn axetic khác là *A.melanogenum*.

5.2. Quá trình oxi hóa saccarôzơ thành axit xitric

Nấm sợi là nhóm vi sinh vật hiếu khí, chúng không có khả năng lên men kị khí nhưng trong nhiều trường hợp chúng có thể làm tích lũy lại trong môi trường những sản phẩm chưa được oxi hóa triệt để, phổ biến nhất là các axit hữu cơ.

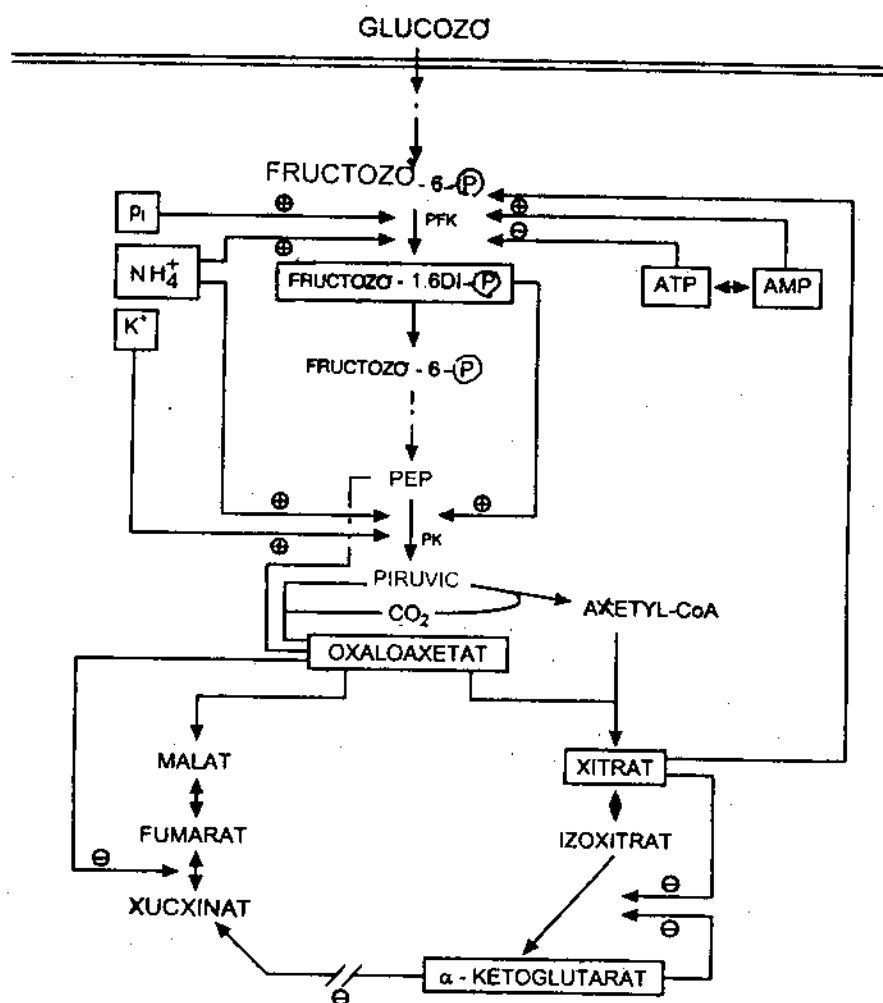
Từ năm 1893 C. Wehmer đã chú ý đến hiện tượng này. Ông cho biết nấm mốc *Aspergillus niger* trên môi trường chứa đường và có mặt $CaCO_3$ sẽ có thể làm tích lũy khá nhiều axit oxalic. Một số loài mốc xanh mà ông gọi là giống *Citromyces* (thực ra vẫn thuộc về giống *Penicillium*) thì lại có khả năng sản sinh axit limonic. Năm 1916 người ta phát hiện thấy nhiều nòi *A. niger* có khả năng tích lũy khá nhiều axit limonic. Năm 1917 Currie chứng minh rằng nếu nâng cao nồng độ đường (lên đến khoảng 15%), giảm nồng độ NH_4NO_3 , đưa pH môi trường tới 3,5 hoặc thấp hơn thì không những có thể nâng cao sản lượng axit limonic mà còn hạn chế được sự sản sinh axit oxalic. Năm 1926 người ta đã nghĩ ra phương pháp sử dụng môi trường axit để huấn luyện nấm *A. niger* và chọn ra được những chủng có thể chuyển hóa được đến 65% đường thành axit limonic (axit xitric).

Axit xitric là một loại axit hữu cơ không độc, được sử dụng rộng rãi trong nền kinh tế quốc dân. Từ năm 1970 tổng sản lượng axit xitric trên thế giới đã là 300.000 tấn, năm 1990 tăng lên đến 550.000 tấn, trong số này có tới 80% thu nhận được từ phương pháp "lên men" (oxi hóa không hoàn toàn nhờ nấm sợi hoặc nấm men). Có khoảng 70% axit xitric được sử dụng trong các ngành công nghiệp thực phẩm (sản xuất nước ngọt, bánh, kẹo, mứt, chống oxi hóa dầu béo, bảo quản thực phẩm...). Natri xitrat được dùng thay thế poliphotphat trong công nghệ sản xuất chất tẩy rửa. Sắt xitrat được dùng trong y học để chữa bệnh thiếu sắt, để bảo quản máu khỏi đông...

Ở nước ta hàng năm phải nhập khoảng 500 - 1000 tấn axit xitric, chủ yếu để dùng trong công nghiệp thực phẩm.

Khi lên men xitric người ta thường dùng rỉ đường đã được xử lí. Điều chỉnh để sao cho nồng độ đường saccarôzơ trong môi trường lên men ở trong khoảng 14 - 22% (W/V). Nguồn nitơ bổ sung là amon sunphat hay amon nitrat. Nồng độ thích hợp là 0,3 - 1,5g NH_4^+ /l. Còn cần bổ sung một lượng nhất định photphat nhưng luôn không chế ở một nồng độ rất thấp. Cần kiểm tra chặt chẽ để loại trừ sự có mặt của một số cation kim loại trong môi trường, đặc biệt là đối với Mn^{2+} , Fe^{2+} và Zn^{2+} . Muốn loại bỏ Mn^{2+} , Fe^{2+} trong rỉ đường người ta phải sử dụng tới kali hexaxianoferrat - $K_4[Fe(CN)_6]$. Việc bổ sung metanol (khoảng 3%) vào môi trường có khả năng làm tăng rõ rệt việc tích lũy axit xitric, trong khi đó lại làm giảm việc tích lũy sinh khối (sợi nấm). Một số tác giả đã đề xuất hiệu quả của việc bổ sung một số hợp chất khác đối với việc tích lũy axit xitric. Có thể kể đến việc bổ sung tinh bột, xetylpipridinium clorit, diizobutylphenoxi - etoxi - etyldimetylbenzylammoni clorit, stearyldimetylbenzylammoni clorit...

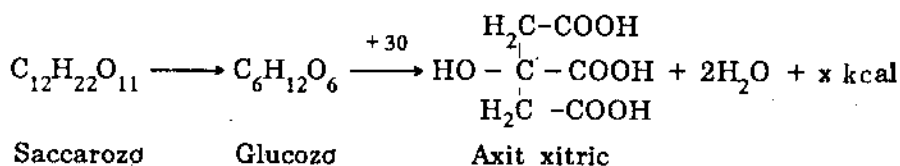
Việc điều chỉnh cơ chế sản sinh axit xitric khi lên men rỉ đường bằng nấm sợi *Aspergillus niger* có thể biểu thị như sau :



Cơ chế điều hòa trao đổi chất để tích lũy axit xitric ở *A.niger*.

Chú thích : + : hoạt hóa ; - : ức chế.

Phương trình chung của sự chuyển hóa đường thành axit xitric có thể biểu thị như sau :



Khi sử dụng nấm sợi *A.niger* để lên men xitric có thể sử dụng phương pháp lên men bề mặt hoặc phương pháp lên men chìm.

Các khay dùng trong lên men bề mặt thường có kích thước từ $2 \times 2,5 \times 0,15\text{m}$ tới $2,5 \times 4 \times 0,15\text{m}$. Độ dày lớp dịch thường là $0,08 - 0,12\text{m}$. Mỗi khay chứa $0,4 - 1,2$ tấn môi trường và được xếp trong các ngăn chống lên nhau xếp ở một tủ vô trùng có thổi khí (vô trùng) lên bề mặt dịch lên men. Trong lên men bề mặt lượng đường thường được khống chế trong khoảng $15 - 20\%$, pH được điều chỉnh bằng H_3PO_4 đến $6,0 - 6,5$, lượng HCF (kali hexaxianoferrat) thường được dùng trong trường hợp rỉ đường mía là $10 - 200 \text{ HCF-ion/lit}$.

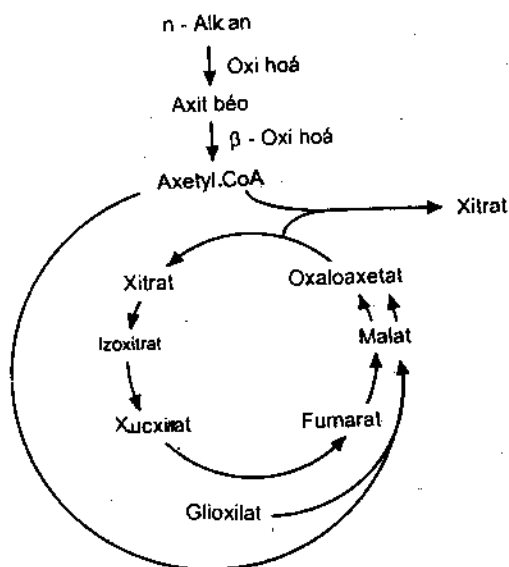
Lượng bào tử được thổi vào bề mặt khay với số lượng khoảng $100 - 150 \text{ mg/m}^2$. Nếu lên men tốt có thể thu được tới $200 - 250\text{g}$ axit xitric/lit.

Khi lên men chìm người ta dùng các nồi lên men $200 - 950\text{m}^3$. Nồng độ đường ban đầu là $15 - 27\%$ (W/V). Khi trùng diệt nguội đến 50°C mới bổ sung chất dinh dưỡng. Độ pH được điều chỉnh bằng NH_3 hay NH_4OH . Số lượng bào tử *A. niger* được cấy vào là $5 - 25$ triệu/lit. Tỷ lệ thổi khí là $0,1 - 0,4 \text{ VVm}$. Nhiệt độ lên men là $28 - 35^\circ\text{C}$. Độ pH thay đổi trong khoảng $2,2 - 2,6$. Nồng độ Fe phải thấp hơn $200 \mu\text{g/l}$ và nồng độ Mn phải thấp hơn $5 \mu\text{g/l}$. Quá trình lên men thường kéo dài $10 - 12$ ngày.

Sau khi kết thúc lên men phải tách hệ sợi nấm rồi kết tủa canxi oxalat bằng nước vôi, sau đó bổ sung tiếp nước vôi để kết tủa canxi xitrat. Xử lý canxi xitrat bằng H_2SO_4 để tách ra canxi sunphat. Tiếp tục tinh chế dung dịch axit xitric bằng than hoạt tính và bằng phương pháp trao đổi ion. Sau khi cho bay hơi để cô đặc lại sẽ tiến hành kết tinh và tách sản phẩm ra, sấy khô và đóng gói.

Trong những năm gần đây người ta có xu thế chuyển đổi cơ chất và chủng loại vi sinh vật trong sản xuất axit xitric. Người ta đã nghiên cứu thành công quy trình lên men chìm với cơ chất là n-alkan (từ công nghiệp dầu mỏ) và với vi sinh vật là nấm men *Saccharomycopsis (Candida) lipolytica*. Gần đây loài nấm men này lại được đổi tên thành *Yarrowia lipolytica*.

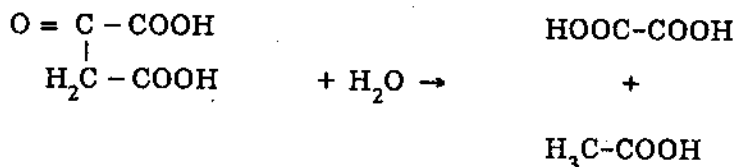
Cơ chế chuyển hóa có thể biểu thị như sau :



Các nhà máy sản xuất axit xitric từ n-alkan và nấm men đã bắt đầu được xây dựng ở Nhật, Đức, Nga...

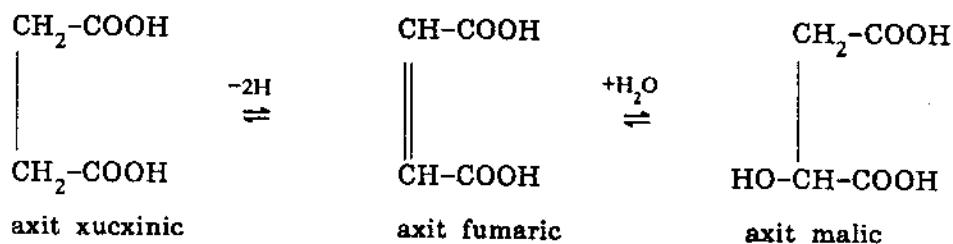
Nhiều loài nấm sợi thuộc các chi *Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor* khi phát triển trên các môi trường có phản ứng kiềm sinh lí (tức là dưới tác động của nấm mốc có thể làm tích lũy nhiều gốc kiềm) có thể dễ dàng tích lũy một lượng đáng kể axit oxalic. Những chủng nấm mốc thường có thể làm sinh ra axit oxalic nhiều nhất là *A. niger*, *A. oryzae*, *P. solitum*...

Axit oxalic thường được sinh ra do kết quả của quá trình thủy phân axit oxalaxetic :

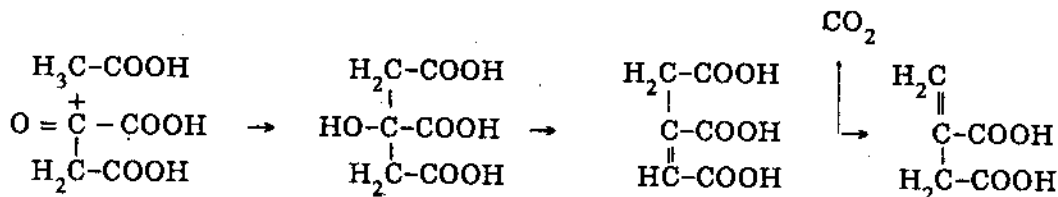


Ngoài hai loại axit hữu cơ nói trên, một số nấm mốc còn có khả năng làm tích lũy lại trong môi trường cả axit fumaric và axit xucxinic. Hiện tượng này được Ehrlich phát hiện thấy ở nấm *Rhizopus nigricans* từ năm 1911. Hiện nay người ta đã biết đến khá nhiều loại nấm mốc có khả năng sản sinh một lượng đáng kể axit fumaric (như *Penicillium griseum*, *Aspergillus fumigatus*, *A. glaucus*, *A. flavus*, *A. wentii* và *Rhizopus delemar*...).

Việc oxi hóa axit xucxinic thành axit fumaric được thực hiện nhờ sự xúc tác của enzym xucxinatdehydrogenaza. Axit fumaric sinh ra cũng có thể tiếp tục liên kết với một phân tử nước để tạo thành axit malic (dưới tác dụng của fumaraza) :



Một số chủng nấm mốc thuộc các loài *A. itaconicus* và *A. terreus* còn sinh ra cả axit itaconic. Quá trình này có thể xảy ra trong trường hợp pH môi trường rất thấp (khoảng 2,0). Axit itaconic được hình thành do sự chuyển hóa từ axit xis-acotinic :



Nhiều loài nấm mốc thuộc họ *Mucoraceae* (như *Rhizopus nodosus*, *R. oryzae*, *R. arrhizus*, *R. nigricans*) và rất nhiều loài trong các giống thuộc lớp *Phycomycetes* có khả năng tích lũy axit lactic trong điều kiện oxi hóa hiếu khí. Thường thường bên cạnh việc sản sinh khá nhiều axit lactic còn có sự tích lũy một lượng nhỏ các axit khác (như axit fumaric, axit xucxinic, axit malic, axit focmic, axit axetic...). Có thể sử

dụng quá trình oxi hóa không hoàn toàn này để sản xuất axit lactic (so với quá trình lên men lactic dùng vi khuẩn sẽ có lợi ở chỗ đỡ phải sử dụng các nguồn thức ăn phức tạp và có thể dùng ure làm nguồn nitơ).

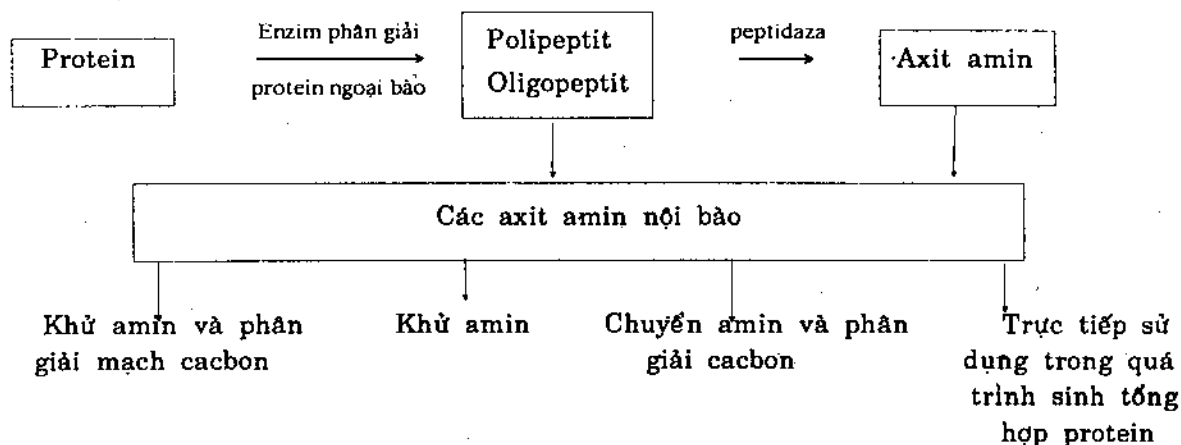
Axit gluconic cũng có thể là sản phẩm oxi hóa không hoàn toàn của nhiều loại nấm mốc thuộc chi *Aspergillus* và *Penicillium*. Hiệu suất chuyển hóa glucozơ thành axit gluconic ở nấm *A.niger* có thể đạt tới 30 - 35%.

6. SỰ PHÂN GIẢI PROTEIN (QUÁ TRÌNH THỐI RỬA)

Khác với lên men, cơ chất của quá trình thối rửa là protein. Protein là một trong những thành phần quan trọng của xác động vật, thực vật và vi sinh vật. Protein thường chứa khoảng 15,0 - 17,6% nitơ (tính theo chất khô). Nếu như tổng lượng cacbon trong cơ thể các sinh vật sống trên mặt đất là vào khoảng 700 tỉ tấn thì tổng lượng nitơ ít ra cũng tới 10 - 25 tỉ tấn. Trong lớp đất sâu 30 cm bao quanh Trái Đất người ta còn thấy thường xuyên có khoảng 3 - 7,5 tỉ tấn nitơ mà phần lớn là tồn tại trong các hợp chất hữu cơ chứa nitơ. Sự phân giải các hợp chất hữu cơ chứa nitơ có ý nghĩa rất lớn đối với nông nghiệp và đối với vòng tuần hoàn vật chất trong tự nhiên. Người ta còn gọi quá trình phân giải này là quá trình amon hóa.

Muốn phân giải protein, cũng giống như đối với các hợp chất cao phân tử khác, đầu tiên vi sinh vật phải tiết ra các enzym phân giải protein ngoại bào và làm chuyển hóa protein thành các hợp chất có phân tử nhỏ hơn (các polipeptit và các oligopeptit). Các chất này hoặc tiếp tục được phân hủy thành axit amin nhờ các peptidaza ngoại bào, hoặc được xâm nhập ngay vào tế bào vi sinh vật sau đó mới chuyển hóa thành axit amin. Một phần các axit amin này được vi sinh vật sử dụng trong quá trình tổng hợp protein của chúng, một phần khác được tiếp tục phân giải theo những con đường khác nhau để sinh NH_3 , CO_2 và nhiều sản phẩm trung gian khác.

Những vi sinh vật không có khả năng sinh ra các enzym phân giải protein ngoại bào rõ ràng là không có khả năng đồng hóa được các loại protein thiên nhiên. Chúng chỉ có thể sử dụng được các sản phẩm thủy phân của protein (polipeptit, oligopeptit, axit amin).



Rất nhiều loài vi sinh vật khác nhau tham gia vào quá trình amon hóa trong tự nhiên. Đáng chú ý nhất là các loại sau đây :

- Vi khuẩn : *Bacillus mycoides*, *B. mesentericus*, *B. subtilis*, *B. cereus*, *B. megaterium*, *B. histoliticus*, *Proteus vulgaris*, *Chromobacterium prodigiosum*, *Pseudomonas fluorescens*, *P. aeruginosa*, *P. putreficans*, *E. coli*, *C. sporogenes*, *C. welchii*.

- Xạ khuẩn và nấm : *Streptomyces griseus*, *S. rimosus*, *S. fradiae*, *Aspergillus oryzae*, *A. flavus*, *A. terricola*, *A. niger*, *A. saitoi*, *A. awamori*, *A. alliaceus*, *Penicillium camemberti*, *Cephalothecium*, spp., *Rhizopus*, spp., *Mucor*, spp., *Gliocladium roseum*...

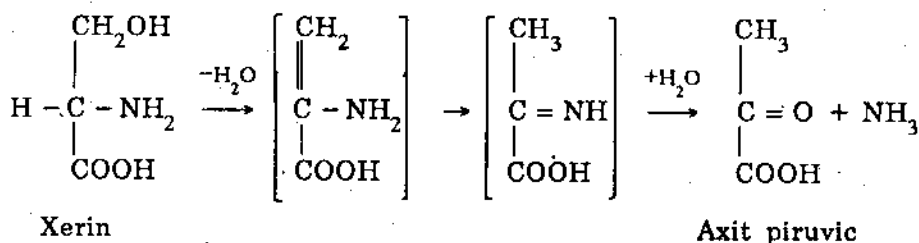
Trong cơ thể vi sinh vật, các axit amin thường được chuyển hóa nhờ quá trình khử amin, và quá trình khử cacboxyl hoặc đồng thời vừa khử amin vừa khử cacboxyl. Có thể thấy rõ cơ chế của các quá trình khử này qua bảng dưới.

Các kiểu phân giải axit amin :

Đặc tính của phản ứng	Sản phẩm phân giải axit amin	
	Không khử cacboxyl	Có khử cacboxyl
Không khử amin Có khử amin 1) Trực tiếp 2) Thủy phân 3) Oxi hóa hiếu khí 4) Oxi hóa kỵ khí 5) Khử	$R-CH(NH_2)-COOH$ $R=CH-COOH + NH_3$ $+ H_2O \rightarrow R-CHOH-COOH + NH_3$ $+ 1/2 O_2 \rightarrow R-CO-COOH + NH_3$ $+ H_2O \rightarrow R-CO-COOH + NH_3 + 2H$ $+ 2H \rightarrow R-CH_2-COOH + NH_3$	$R-CH_2(NH_2) + CO_2$ $+ H_2O \rightarrow R-CH_2OH + CO_2 + NH_3$ $+ O_2 \rightarrow R-COOH + CO_2 + NH_3$ $+ 2H_2O \rightarrow R-COOH + CO_2 + NH_3 + 4H$ $+ 2H \rightarrow R-CH_3 + CO_2 + NH_3$

Các enzym xúc tác quá trình khử amin oxi hóa thường là đặc hiệu đối với các đồng phân L hoặc D của axit amin. Một số các enzym này (các oxidaza hiếu khí) là các flavoprotein và khi đó oxi phân tử đóng vai trò chất nhận hidro. Một số các enzym khác (oxidaza kỵ khí và dehydrogenaza) thực hiện quá trình vận chuyển điện tử và làm sinh ra các dây nối photphat giàu năng lượng nhờ quá trình photphoryl oxi hóa.

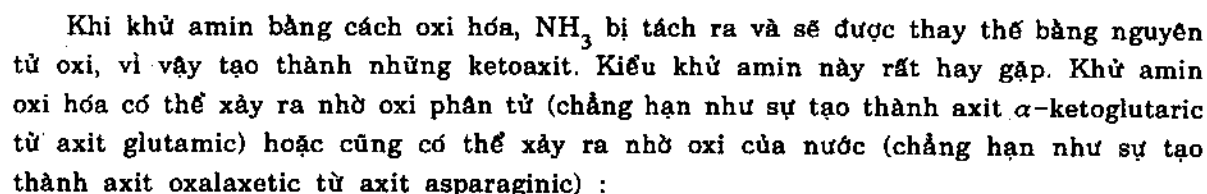
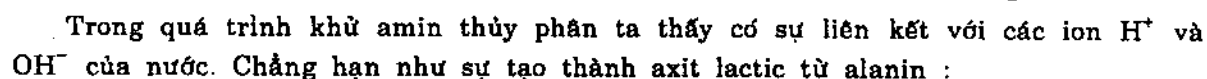
Cũng có trường hợp quá trình khử amin xảy ra trước hết bằng sự khử nước, chẳng hạn như trường hợp đối với xerin.



148.



Trong quá trình khử amin trực tiếp ta thấy có sự tạo thành dây nối đôi. Chẳng hạn như sự tạo thành axit fumaric từ axit asparaginic :

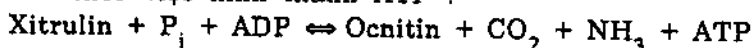


Axit axetic

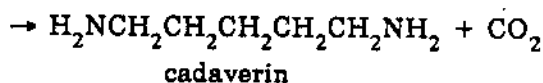
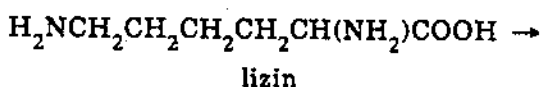
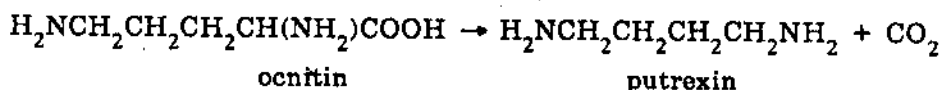
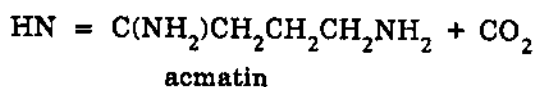
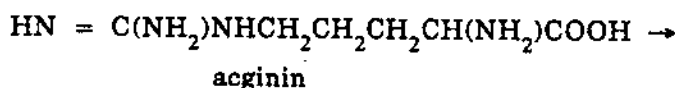
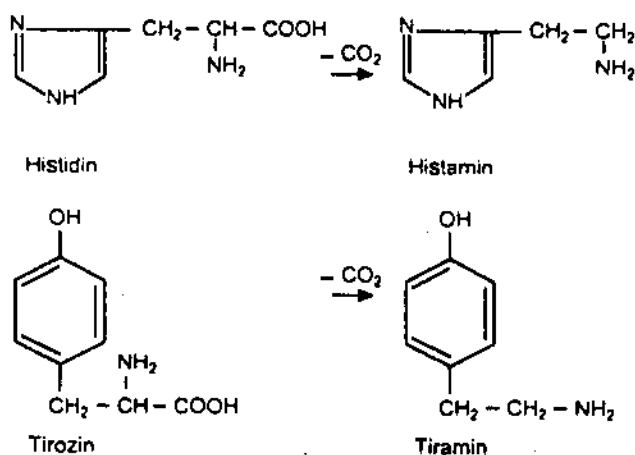


252

Một số vi sinh vật có một cơ chế sinh năng lượng đặc biệt dựa vào quá trình phân giải axit amin. Chẳng hạn như quá trình phân giải acginin thành ocnitin. Tham gia vào quá trình này ít ra có 3 loại enzym khác nhau. Đầu tiên enzym acginindezaminaza xúc tác chuyển hóa acginin thành xitruilin, sau đó xitruilin sẽ tiếp tục được chuyển hóa thành ocnitin kèm theo việc hình thành ATP :



Do khử cacboxyl mà axit amin được chuyển hóa thành amin. Chẳng hạn như sự tạo thành histamin từ histidin, tiramin từ tirozin, acmatin từ acginin, putrexin từ ocnitin, cadaverin từ lizin :



Nhiều loại amin do vi khuẩn sản sinh ra trong cơ thể người và động vật có tính độc. Chẳng hạn, từ lâu người ta biết rằng việc tích lũy histamin trong cơ thể có thể gây ra chứng co giật mạch máu.

Các hợp chất diamín như acmatin, putrexin, cadaverin đều có tính độc. Các loại thức ăn như thịt cá thiu thối không nên ăn vì rất dễ có mặt các loại amin độc này.

Trong quá trình khử cacboxyl phối hợp với khử amin thủy phân người ta thấy có sự tạo thành rượu. Khi lên men etilic thường có sự tích lũy các rượu bậc cao (chủ

yếu là rượu izoamilic và rượu izobutyllic) chính là do nguyên nhân này. Những chất này thường được dùng làm nguyên liệu để chế tạo các este thơm sử dụng trong công nghiệp sản xuất hương liệu. Để tăng sản lượng các chất này người ta có thể bổ sung thêm các nguyên liệu giàu axit amin vào môi trường lên men.

Trong quá trình khử cacboxyl phối hợp với khử amin oxi hóa, người ta thấy có sự xuất hiện các axit hữu cơ bị rút đi một gốc cacbon. Chẳng hạn như sự tạo thành axit axetic từ alanin.

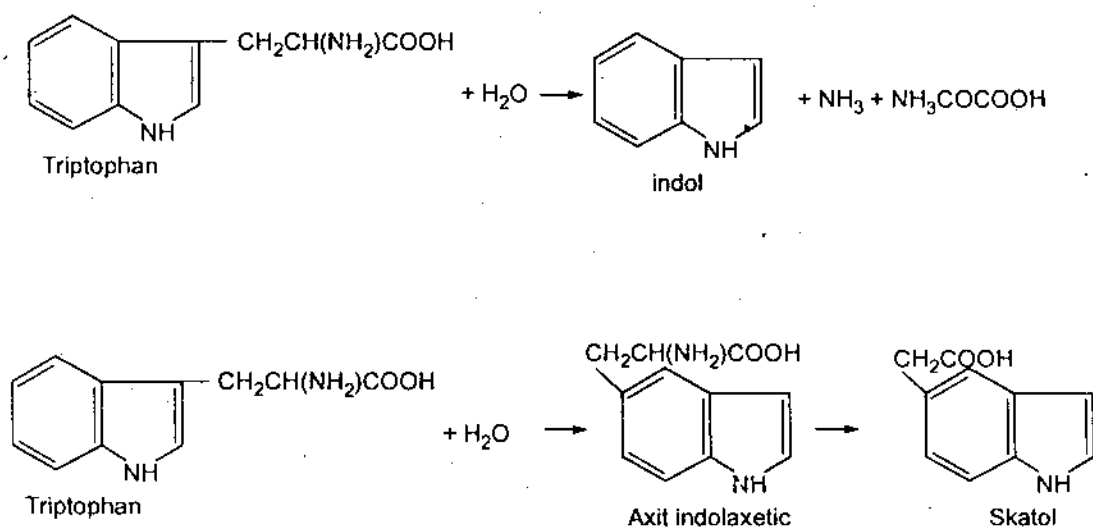
Trong quá trình khử cacboxyl phối hợp với khử amin khử, người ta thấy có sự xuất hiện các chất có nhóm methyl ở đầu. Chẳng hạn như sự tạo thành CH_4 từ glixin, tạo thành mercaptan từ xixtein. Chất mercaptan là một trong những chất có mùi rất thối, nó có công thức là $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{SH}$.

Stickland là người đầu tiên phát hiện ra một loại phương thức khử amin đặc biệt thường thấy ở các loài *Clostridium* kỵ khí. Khi đó có sự tham gia đồng thời của hai axit amin.

Một loại bị khử amin kèm theo quá trình oxi hóa (do mất hidro), còn loại kia bị khử amin kèm theo quá trình khử (do nhận hidro). Phản ứng này về sau được gọi là phản ứng Stickland. Do tác dụng oxi hóa khử tương hỗ giữa 2 axit amin mà chúng ta có thể nhận được một số những axit béo.

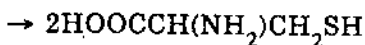
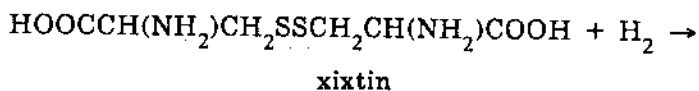
Các axit amin thường đóng vai trò cho hidro trong phản ứng Stickland là alanin, valin, lợxin, izolợxin, xixtein, xerin, phenylalanin, axit asparagin, và axit glutamic. Các axit amin thường đóng vai trò nhận hidro là glixin, acginin, oxiprolin, prolin, ocnitin và triptophan.

Một số vi khuẩn (như *E. coli*, *Proteus*...) có khả năng chuyển hóa triptophan thành 2 chất có mùi hôi là indol và skatol. Skatol chính là chất tạo ra mùi thối nhiều nhất ở phân :

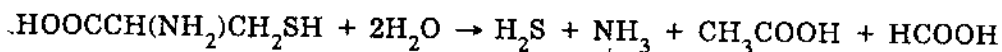


Bản thân indol có mùi hôi nhưng nếu thêm một chút indol vào este của một số hoa (như hoa nhài) thì lại tạo nên một mùi thơm đặc biệt (được sử dụng trong công nghiệp chế tạo nước hoa).

Trong quá trình phân giải các axit amin chứa S (như metionin, xixtein, xixtin) sẽ sản sinh ra H_2S (khí này góp phần làm cho phân hoặc thịt cá thối rửa có mùi hôi).



xixtein



xixtein

Khi quá trình thối rửa xảy ra trong điều kiện thoáng khí thì các quá trình oxi hóa thường được tiến hành đến cùng. Khi đó hầu hết cacbon được chuyển thành CO_2 . Ngược lại khi quá trình thối rửa xảy ra trong điều kiện kỵ khí thì thường có sự tích lũy khá nhiều các sản phẩm trung gian nói trên.

Ngoài khả năng phân giải protein vi sinh vật còn có khả năng phân giải một số hợp chất hữu cơ chứa nitơ khác. Đáng chú ý nhất là khả năng phân giải các bazơ nitơ, ure, axit uric, xianamit canxi và kitin.

Các bazơ nitơ (purin, pirimidin) được sinh ra do quá trình thủy phân axit nucleic. Nhiều vi sinh vật có khả năng làm sinh ra các enzym xúc tác việc phân giải các bazơ nitơ và làm sinh ra các sản phẩm như CO_2 , NH_3 , bazơ focmic, bazơ axetic, bazơ lactic. Các axit hữu cơ này sẽ tiếp tục tham gia vào các quá trình trao đổi sinh năng lượng.

Ure là chất hữu cơ chứa nitơ chủ yếu trong nước tiểu của người và động vật. Người ta tính thấy rằng mỗi năm trung bình mỗi người lớn thải ra khoảng 400 - 450kg nước tiểu. Trong nước tiểu có khoảng 2,2% là ure. Số ure mà nhân loại sinh ra trong một ngày một đêm là 15.000 tấn. Nếu tính số ure do tất cả giới động vật sinh ra trong một ngày, một đêm thì có tới 150.000 tấn. Ure có chứa 47% nitơ nhưng nếu không được vi sinh vật phân giải thành NH_3 thì tất cả nguồn nitơ lớn lao này cũng trở thành vô ích đối với mọi thực vật.

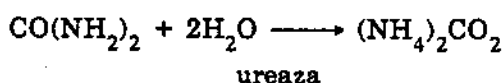
Năm 1862 lần đầu tiên Pasteur phát hiện ra vi khuẩn phân giải ure. Càng về sau người ta càng tìm thấy nhiều loại vi khuẩn tham gia tích cực vào quá trình phân giải này. Những loài đáng chú ý là :

- Cầu khuẩn : *Planosarcina ureae*, *Micrococcus ureae*, *M. ureae liquefaciens*, *Sarcina hansenii*.

- Trực khuẩn : *Bacillus pasteurii* (hay *Urobacillus pasteurii*), *B. miquelii*, *B. psychrotericus*, *B. amylovorum*, *Pseudobacterium ureolyticum*, *Chromobacterium prodigiosum*, *Proteus vulgaris*...

Nhiều loài nấm sợi và xạ khuẩn sống trong đất cũng có khả năng phân giải mạnh ure.

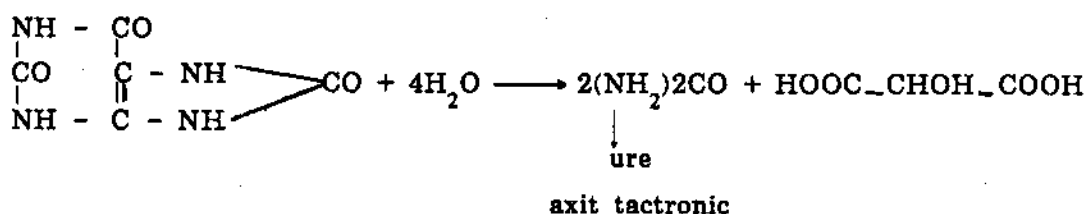
Quá trình phân giải ure xảy ra một cách rất đơn giản với sự xúc tác của ureaza :



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

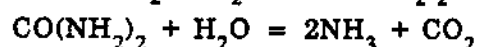
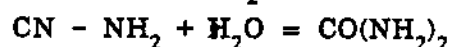
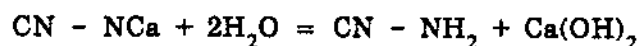


Axit uric cũng là một chất hữu cơ chứa đạm có trong nước tiểu (mỗi lít nước tiểu có khoảng 0,5g axit uric). Vi khuẩn có khả năng phân giải ure thường cũng có thể phân giải luôn cả axit uric. Chúng làm chuyển hóa axit uric thành ure và axit tactronic.



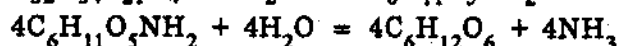
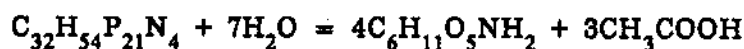
Ure sinh ra sẽ tiếp tục được chuyển hóa theo phản ứng nói trên.

Vi sinh vật phân giải ure còn thường có khả năng phân giải một loại phân đạm hóa học là canxi xianamit (canxi xianamit được chế tạo bằng cách cho luồng khí nitơ đi qua cacbua canxi nóng đỏ). Canxi xianamit là chất thực vật không sử dụng được nếu không được các vi sinh vật sống trong đất tiến hành chuyển hóa. Sự phân giải canxi xianamit thường trải qua các giai đoạn sau đây :



Kitin là một hợp chất rất bền vững. Chúng có mặt trong thành phần của màng tế bào nhiều vi sinh vật, đồng thời cũng là một thành phần quan trọng của vỏ côn trùng và nhiều động vật khác. Kitin rất thường gặp trong đất, vì vậy sự chuyển hóa chúng cũng là vấn đề đáng chú ý.

Vi khuẩn *Bacterium chitinovorum* (hay *Chromobacterium chitinochroma*) có khả năng phân giải kitin rất mạnh mẽ. Sự chuyển hóa kitin được thực hiện nhờ kitinaza, giai đoạn trung gian của sự chuyển hóa này là glucosamin :

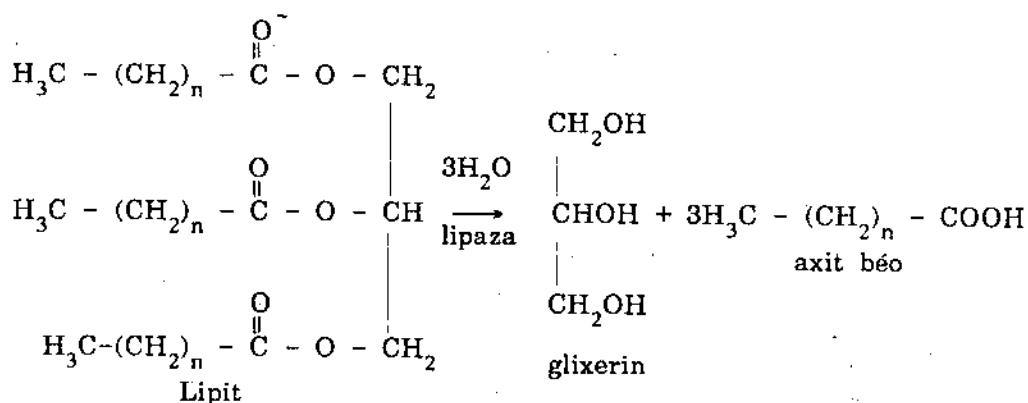


Một số vi khuẩn khác (như *Bacillus chitinophilum*...) và nhiều xạ khuẩn cũng có khả năng phân giải kitin.

7. SỰ PHÂN GIẢI LIPIT VÀ CÁC AXIT BÉO

Lipit (các este phức tạp của glixerin và axit béo) và các chất sáp (các este phức tạp của axit béo và rượu cao phân tử) được nhiều loại vi sinh vật dùng làm nguồn thức ăn cacbon và nguồn năng lượng. So với các cơ chất khác thì đây là loại cơ chất được đồng hóa với tốc độ chậm. Lipit, sáp và các axit béo chứa trong xác động vật, thực vật bị vùi lấp vào đất sau một thời gian sẽ bị phân giải và đồng hóa hết nhờ nhiều nhóm vi sinh vật khác nhau (vi khuẩn, xạ khuẩn nấm mốc). Những chất khử bọt (có bản chất là lipit) thường được sử dụng trong quá trình lên men công nghiệp ngoài tác dụng khử bọt còn có thể được vi sinh vật đồng hóa.

Bước đầu tiên của quá trình đồng hóa lipit và sáp là việc phân giải chúng thành glixerin (hoặc các rượu đơn nguyên tử) và các axit béo. Việc thủy phân này được xúc tác nhờ lipaza nội bào hoặc ngoại bào. Lipaza của vi sinh vật, cũng như của động vật và thực vật, có phổ tác dụng khá rộng. Cũng có những nhóm vi khuẩn có khả năng sinh ra photpholipaza chỉ chuyên xúc tác việc thủy phân photpholipit.

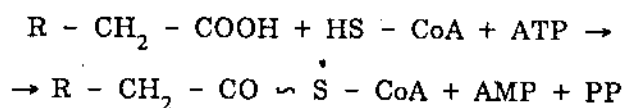


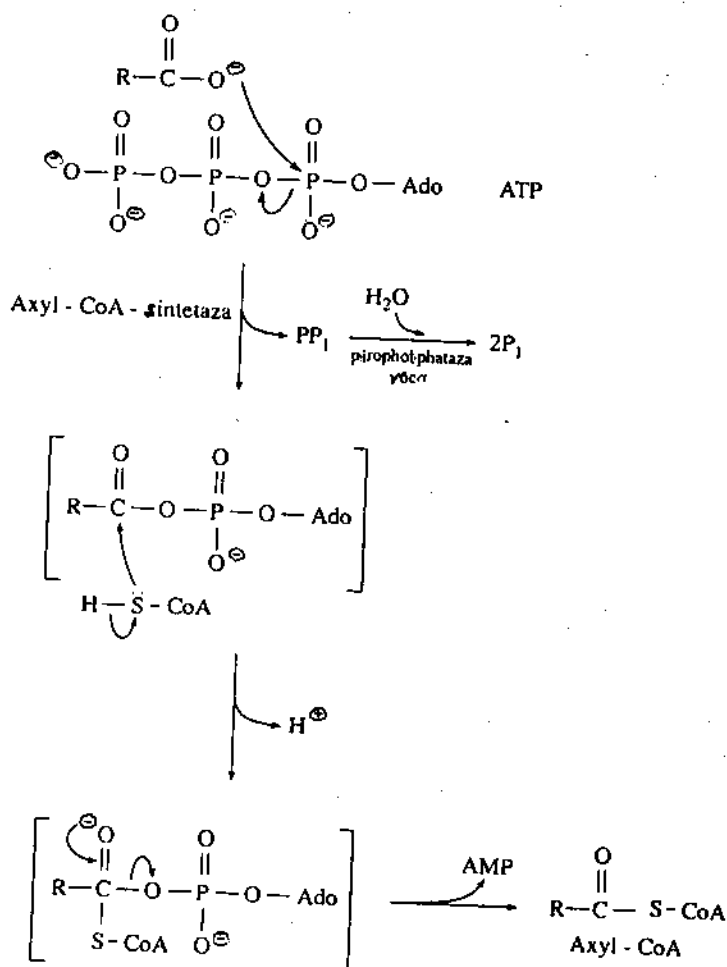
Sau khi được phosphoryl hóa glixerin sẽ được tiếp tục chuyển hóa theo đường Embden - Meyerhof - Parnas và làm tích lũy lại năng lượng trong các dây nối của ATP.

Việc đồng hóa các axit béo được thực hiện nhờ các quá trình oxi hóa. Sơ đồ chung của quá trình này như sau :

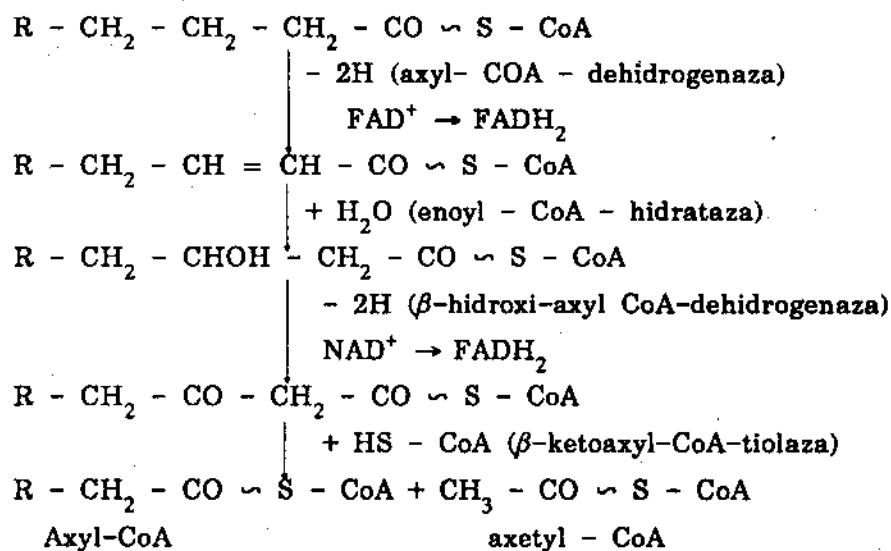
Quá trình oxi hóa bao gồm các bước sau đây :

Axit béo với sự xúc tác của enzym axyl - CoA - xintetaza, CoA và ATP sẽ được hoạt hóa và tạo thành Axyl - CoA chứa liên kết cao năng :

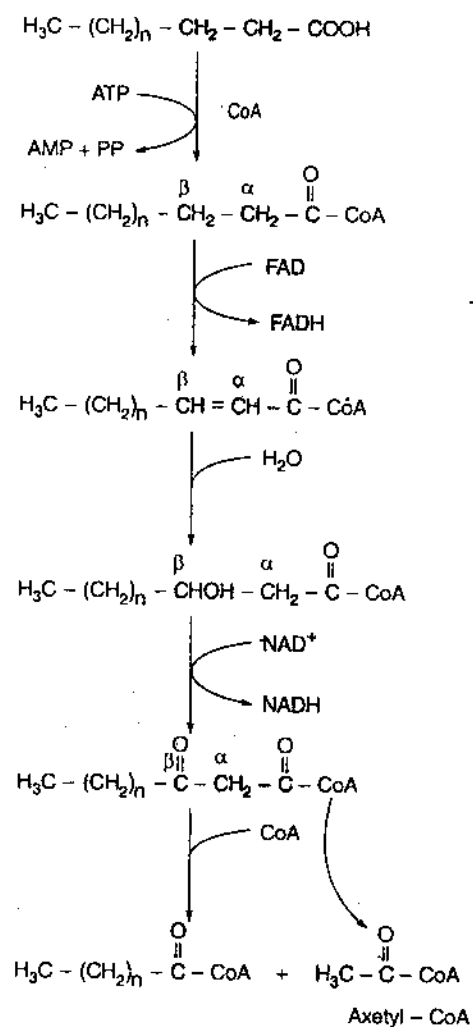




Những sự chuyển hóa tiếp theo được trình bày vắn tắt như sau :

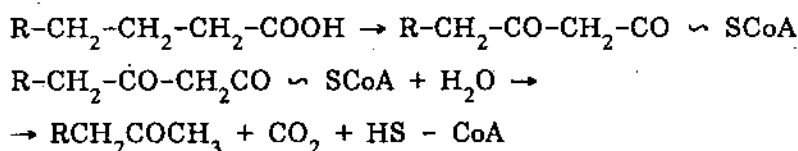


Có thể biểu thị quá trình β -oxi hóa các axit béo bằng hình sau đây :



Như vậy, cứ qua một vòng oxi hóa hoàn toàn chuỗi phân tử của axit béo lại mất đi hai cacbon. Cứ như vậy axit béo tiếp tục có thể chuyển hóa để tách ra những phân tử axetyl - CoA mới. Cuối cùng toàn bộ chuỗi cacbon bị chuyển hóa thành axetyl - CoA. Chất này sẽ tiếp tục được oxi hóa thông qua chu trình Krebs hoặc glioxilic.

Nhiều loại nấm mốc thuộc các chi *Penicillium* và *Aspergillus* có thể oxi hóa axit béo một cách không triệt để và tích lũy trong môi trường những metylketon. Chẳng hạn, việc tích lũy metylundexiketon khi phân giải axit valerianic. Phương trình chung của sự oxi hóa này có thể viết như sau :



Nhiều loại metylketon có mùi khó chịu (mùi của các loại dầu mỡ hoặc thức ăn chứa dầu mỡ bị nhiễm nấm).

8. SỰ PHÂN GIẢI CÁC HỢP CHẤT VÒNG THƠM

Các hidro cacbua thơm và đa vòng đầu tiên thường được chuyển thành các hợp chất thơm. Các hợp chất thơm được chuyển thành các dẫn xuất octo - hoặc para-dioxitphenyl dưới tác dụng của các hệ thống enzym cảm ứng sẽ bị cắt đứt vòng và tạo thành các axit béo. Các axit này về sau sẽ được chuyển hóa thành các sản phẩm trao đổi trung gian.

Sự phân cắt vòng thơm được thực hiện nhờ oxigenaza. Enzim này xúc tác việc gắn oxi phân tử vào cơ chất. Trong quá trình này dioxygenaza xúc tác việc gắn hai nguyên tử hidro vào mỗi phân tử cơ chất, còn monooxygenaza xúc tác việc gắn 1 nguyên tử hidro.

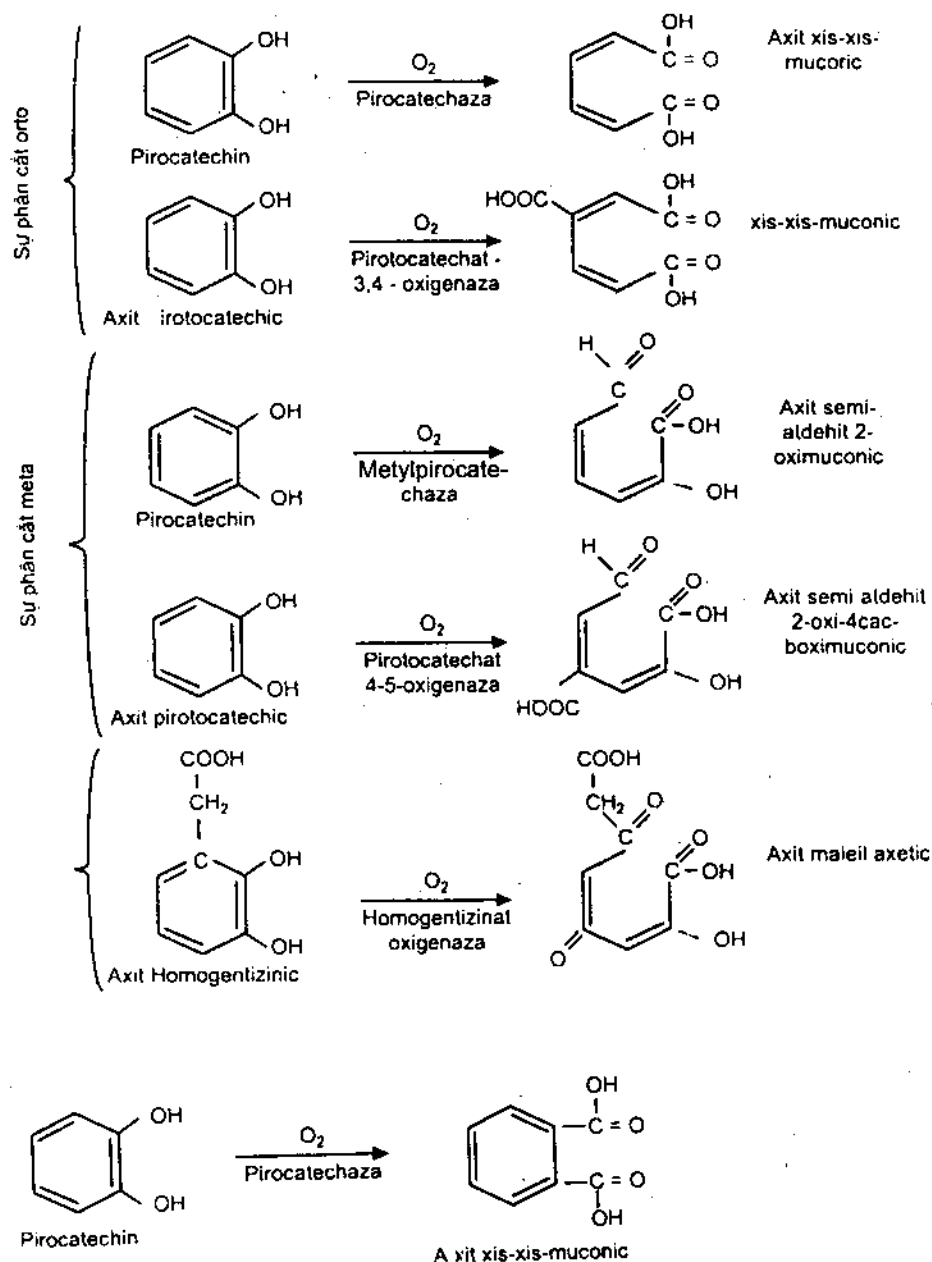
Trước khi vòng bị đứt thấy 1 nguyên tử oxi dưới tác dụng của hidroxylaza sẽ liên kết với hidro cacbua thơm và làm hidroxyl hóa, còn 1 nguyên tử oxi khác thì bị khử thành nước. Khi đó chất cho hidro là piridin nucleotit và đôi khi là ngay bản thân các hợp chất thơm đã hidroxyl hóa.

Các chất thế trong vòng thơm đôi khi bị tách ra trước khi đứt vòng, các chất thế loại clo, nhóm sunpho, nhóm nitro, thường bị thay thế bởi nhóm hidroxyl : các nhánh bên thẳng có thể bị rút ngắn lại hoặc đôi khi vẫn còn giữ lại nguyên vẹn.

Chỗ đứt của vòng thơm thường ở hoặc giữa 2 nhóm hidroxyl lân cận, hoặc giữa nguyên tử cacbon bị hidroxyl hóa và nguyên tử cacbon lân cận không bị hidroxyl hóa.

Dưới đây là ba trường hợp cắt vòng hidrocacbua thơm đặc trưng.

Trong trường hợp thứ nhất pirocatechin bị cắt vòng ở vị trí octo dưới tác dụng của pirocatechaza. Khi đó thoát tiên có sự liên kết giữa oxi phân tử với hai nguyên tử cacbon lân cận và tạo thành một peroxit vòng. Sau đó xảy ra sự chuyển vị nội phân tử với sự cắt đứt liên kết C - C và sinh ra axit xis-xis muconic.



Vì khuẩn thường làm phân giải các hợp chất thơm thể đơn giản (như phenol, axit benzoic, phenylalamin, axit mindalnic) thông qua giai đoạn pirocatechin. Bằng con đường này có thể xảy ra cả sự thể 2 lần ở vị trí orto (axit xalixilic, axit antranilic, naphtalin, phenantren, và antraxen). Có thể xảy ra sự phân cắt các hợp chất thể para (như axit n-oxibenzoic, axit vanilinic) thông qua axit protocatechic.

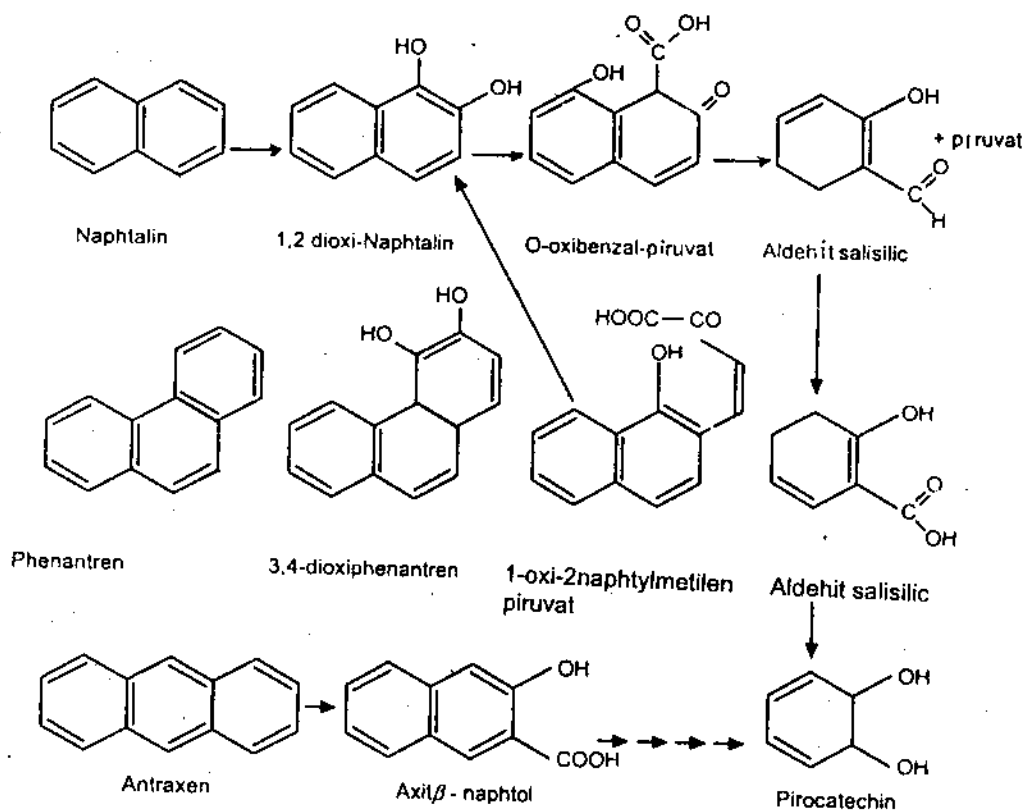
Axit xis-xis-muconic dưới tác dụng của mucolactonaza chuyển hóa thành mucolaton, sau đó nhờ izomeraza tiếp tục chuyển hóa thành β -ketoadipatenollacton và sau cùng chuyển hóa thành axit β -ketoadipinic nhờ hidrolaza. Axit protocatechic dưới tác dụng của protocatechat-3, 4-oxygenaza sẽ bị tách nhóm cacboxyl và chuyển hóa thành enollacton. Axit β -ketoadipinic được sinh ra sẽ bị phân giải thành các dẫn suất của coenzim A như xucxynyl-CoA và axetyl-CoA.

Trường hợp thứ hai cũng thường phổ biến rộng rãi ở vi khuẩn. Đó là sự phân cắt vòng thơm giữa nguyên tử cacbon bị hidroxy hóa và nguyên tử lân cận không bị hidroxy hóa (gọi là sự phân cắt meta).

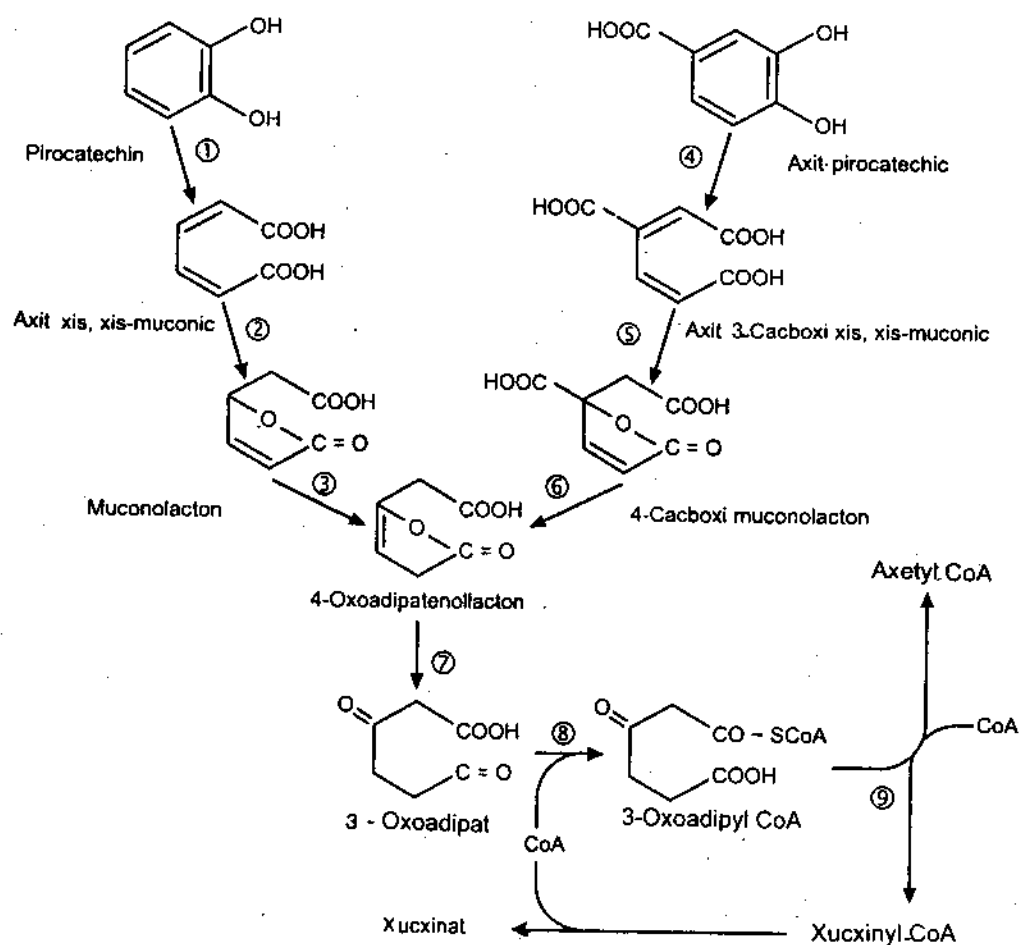
Pirocatechin dưới tác dụng của metylpirocatechaza sẽ chuyển hóa thành axit semialdehit 2-oximuconic. Chất này về sau có thể chuyển hóa thành CO_2 , axit axetic và axit piruvic. Axit protocatechic dưới tác dụng của protocatechat 4, 5-oxygenaza sẽ chuyển hóa thành axit semialdehit 2-oxi-4-cacboxi-muconic. Chất này về sau có thể chuyển hóa thành axit oxaloaxetic và axit piruvic.

Trường hợp thứ ba là trường hợp xảy ra sự cắt vòng ở vị trí giữa nguyên tử cacbon bị hidroxyl hóa và nguyên tử cacbon liên kết với nhóm cacboxyl hoặc một nhóm mạch thẳng nào khác. Axit gentizinic, axit homogentizinic, phenylalanin, tirozin, axit phenylpropionic là những chất bị phân giải theo con đường này. Axit homogentizinic qua giai đoạn axit 4-maleilaxetoaxetic và axit 4-fumaryl axetoaxetic sẽ chuyển hóa thành axit fumaric và axit axetoaxetic. Axit phenyl propanic qua giai đoạn axit 2, 3-oxiphenylpropionic sẽ chuyển hóa thành axit xuxinic và axit 2-keto-4-valerianic :

Như vậy, con đường phân giải các hợp chất thơm là rất đa dạng. Có những vi khuẩn có khả năng phân giải naphtalin, antraxen, và phenantren và thường làm chuyển hóa thành axit xalixilic.

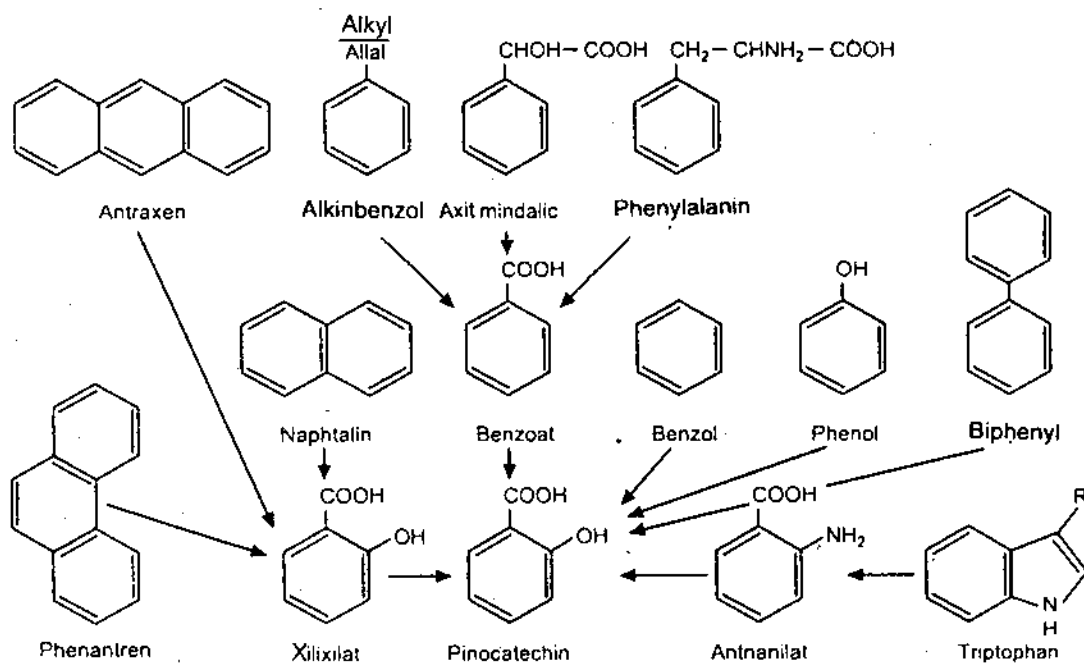


Có thể biểu thị con đường phân giải orto các hợp chất vòng thơm và con đường axit 3-oxoadipinic như sau :

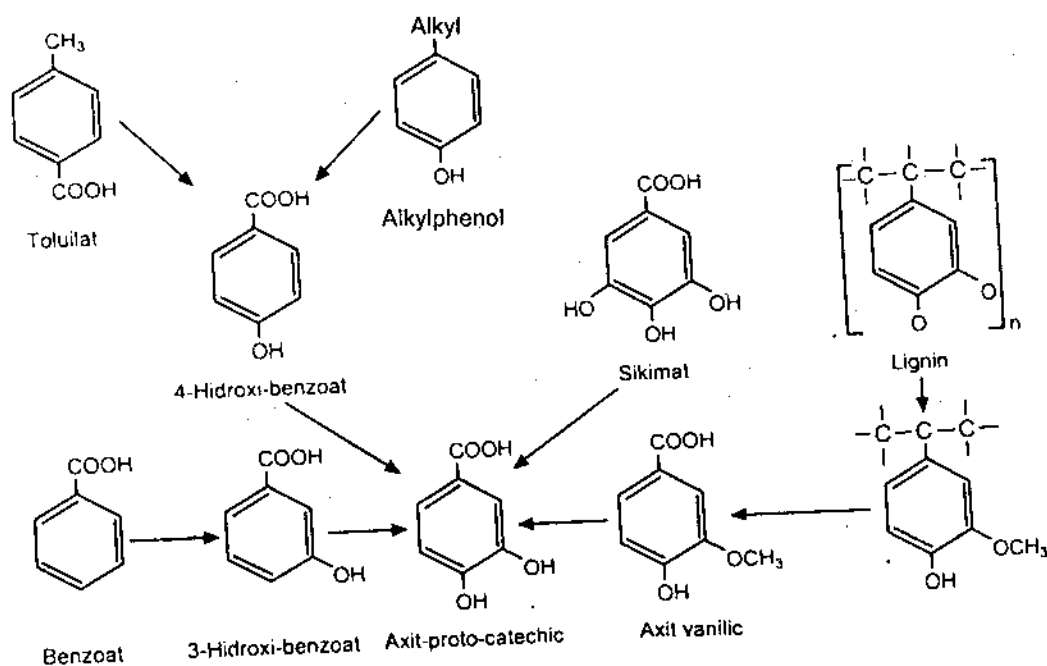


- Chú thích :
1. Pirocatechaza
 2. Muconatxicloizomeraza
 3. Muconolacton - izomeraza
 4. Protocatech - 3, 4 dioxigenaza
 5. 3 - Cacboxymuconat - xicloizomeraza
 6. 4 - Cacboxymuconolacton - decacboxilaza
 7. 4 - Oxadipat - enollactonhidrolaza
 8. 3 - Oxadipat - succinyl - CoA-transferaza
 9. 3 - Oxadipyl - CoA-tiolaza

Trong tự nhiên có những nhóm vi sinh vật có thể phân giải các hợp chất vòng thơm như naphthalin, phenol, antraxen, phenantren... Chúng được chuyển hóa qua nhiều giai đoạn để tạo ra pirocatechin. Chất này lại được các vi sinh vật sinh ra enzym để chuyển hóa thành các hợp chất như đã trình bày ở phần trên.

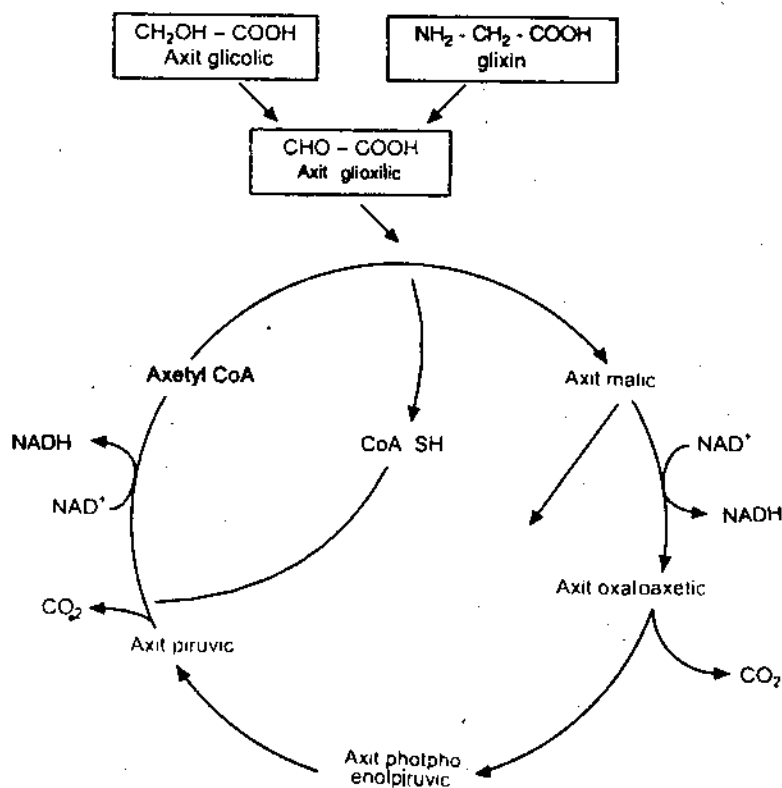


Một số hợp chất vòng thơm khác lại được vi sinh vật chuyển hóa thành axit protocatechic. Axit này được làm đứt vòng và chuyển hóa tiếp cũng nhờ vi sinh vật :



9. SỰ PHÂN GIẢI CÁC HỢP CHẤT 2 CACBON VÀ 1 CACBON

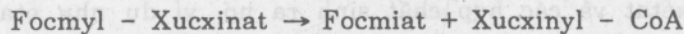
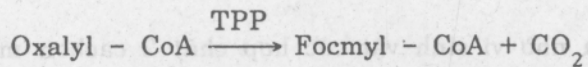
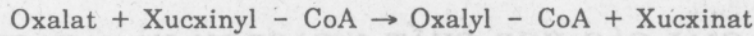
Cơ chế của quá trình oxi hóa nhờ vi sinh vật các hợp chất 2 cacbon mang những tính chất rất đặc biệt. Axetat và các hợp chất sinh ra nó, ví dụ như etanol có thể trực tiếp tham gia vào chu trình Krebs trong dạng (axetyl - CoA) và sau đó có thể được oxi hóa một cách triệt để. Các hợp chất 2 cacbon có mức độ oxi hóa cao hơn axetat (như glicolat và glixin) không trực tiếp tham gia vào chu trình Krebs. Nhiều vi sinh vật có khả năng thoát tiên chuyển hóa các hợp chất này thành glioxilat sau đó chất này mới được oxi hóa hoàn toàn thông qua chu trình Krebs :



Trong chu trình này glioxilat dưới tác dụng của malat sintaza sẽ phản ứng với axetyl-CoA và làm sinh ra axit malic. Axit malic được oxi hóa thành axit oxaloaxetic, sau đó tiếp tục được oxi hóa thành piruvat và CO_2 thông qua giai đoạn photphoenolpiruvat trung gian. Piruvat về sau được chuyển hóa thành axetyl-CoA. NAD^+ dạng khử xuất hiện trong các quá trình oxi hóa này sẽ được oxi hóa bởi oxi phân tử và năng lượng sinh ra sẽ được tích lũy lại trong các phân tử ATP. Vi sinh vật cũng có thể oxi hóa glixin theo cả những con đường khác (H.L. Kornberg, 1966).

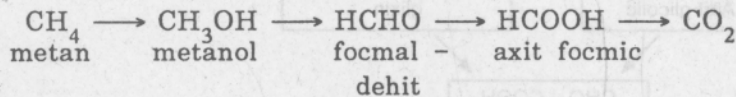
Vi khuẩn phản nitrat hóa *Micrococcus denitrificans* có thể chuyển hóa glioxilat theo một con đường khác gọi là con đường β -oxiaspartat. Glioxilat do vi khuẩn này sinh ra sẽ được chuyển amin và tạo thành glixin. Glixin sẽ ngưng tụ với một phân tử glioxilat khác để tạo thành eritro- β -oxiaspartat. Chất này sẽ bị khử nước sinh ra NH_3 và axit oxaloaxetic (H.L. Kornberg, 1963).

Một số vi sinh vật (như vi khuẩn *Pseudomonas oxalaticus*) có khả năng sử dụng oxalat làm nguồn cacbon duy nhất. Cơ chế của quá trình này có thể tóm tắt như sau :



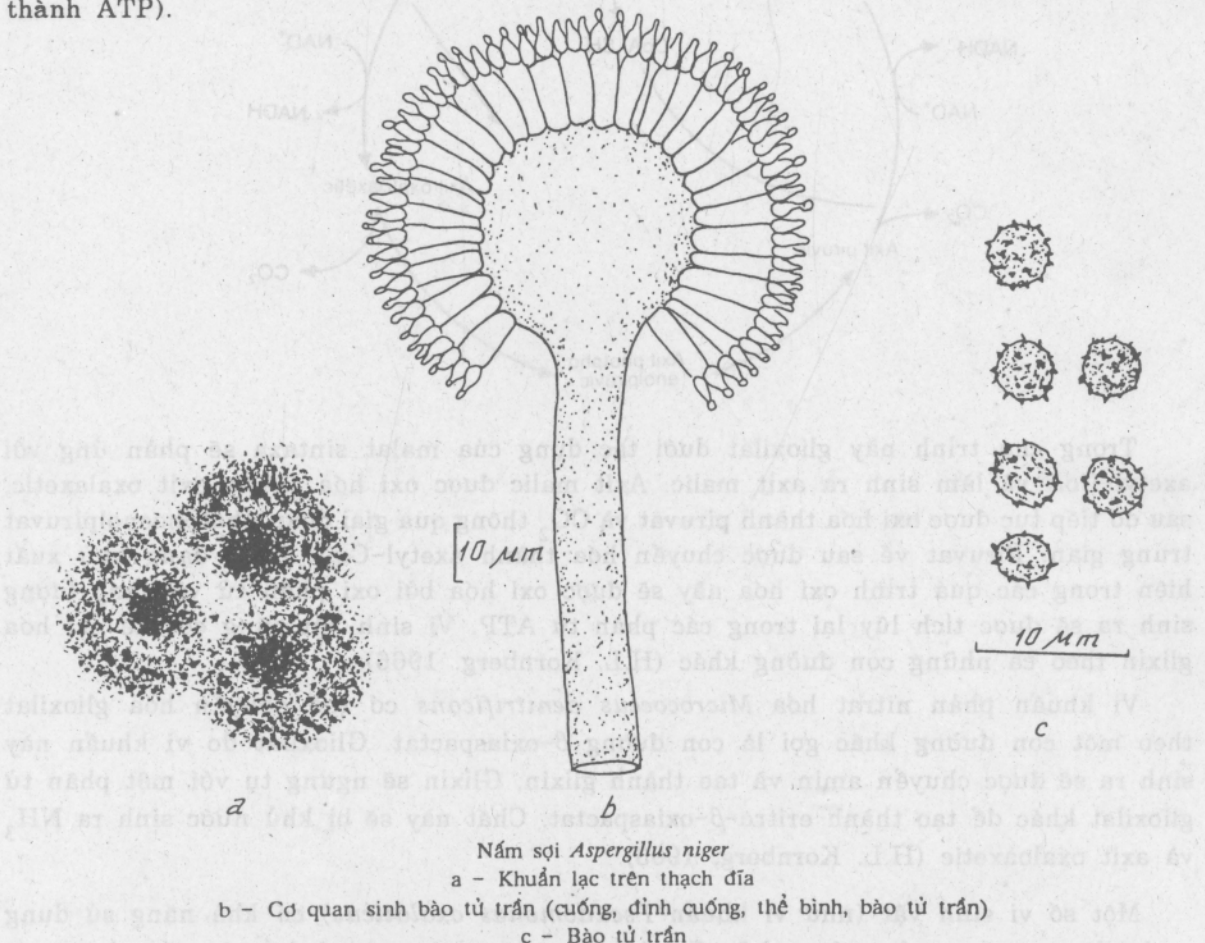
Phản ứng sinh năng lượng chủ yếu đối với chúng là phản ứng oxi hóa focmiat nhờ focmat dehidrogenaza.

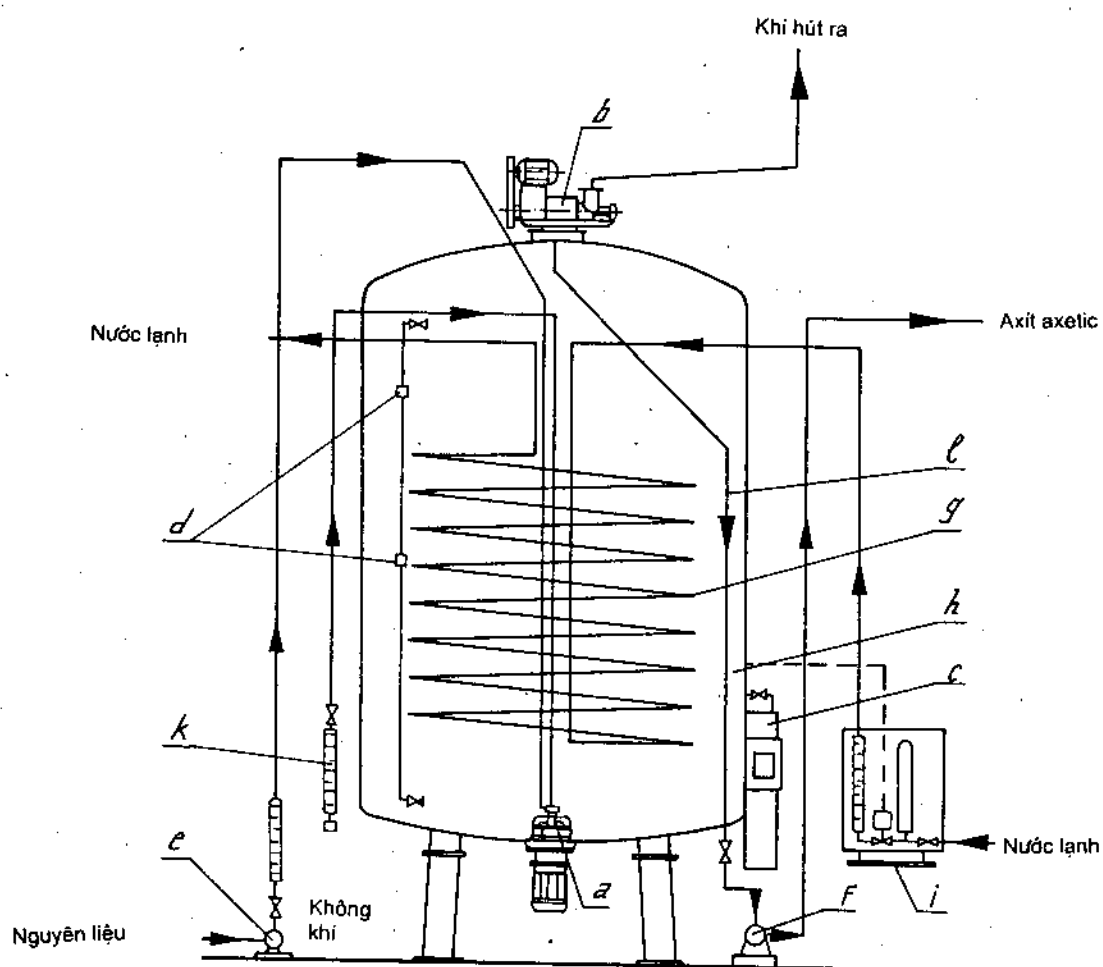
Nhiều vi sinh vật (chẳng hạn như vi khuẩn *Pseudomonas methanica*) có khả năng sử dụng một số hợp chất 1 cacbon làm nguồn thức ăn cacbon và nguồn năng lượng duy nhất. Quá trình oxi hóa các hợp chất 1 cacbon thành CO_2 được tiến hành theo các phản ứng tuần tự như sau :



Một số vi sinh vật có khả năng đồng hóa metylamin. Chất này đầu tiên được chuyển hóa thành metanol sau đó được oxi hóa tiếp tới CO_2 .

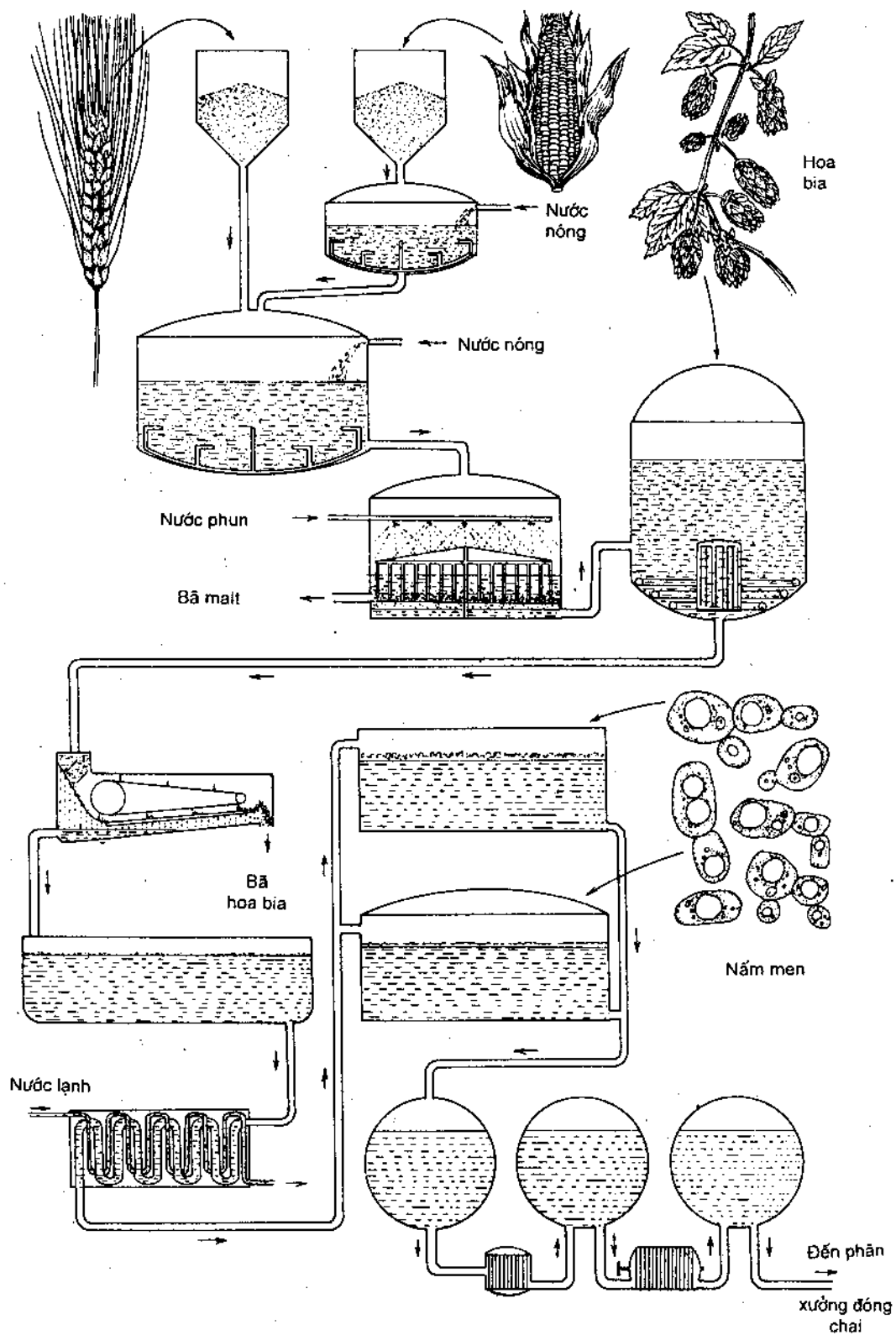
Người ta còn chưa biết rõ các enzym tham gia vào nhiều quá trình oxi hóa các hợp chất 1 cacbon nói trên và cũng chưa hiểu được đầy đủ cơ chế hình thành ATP trong các quá trình oxi hóa này. Tuy nhiên người ta đã biết rõ về quá trình oxi hóa focmiat dưới tác dụng của focmiat dehidrogenaza (sự liên kết với NAD^+ và sự tạo thành ATP).



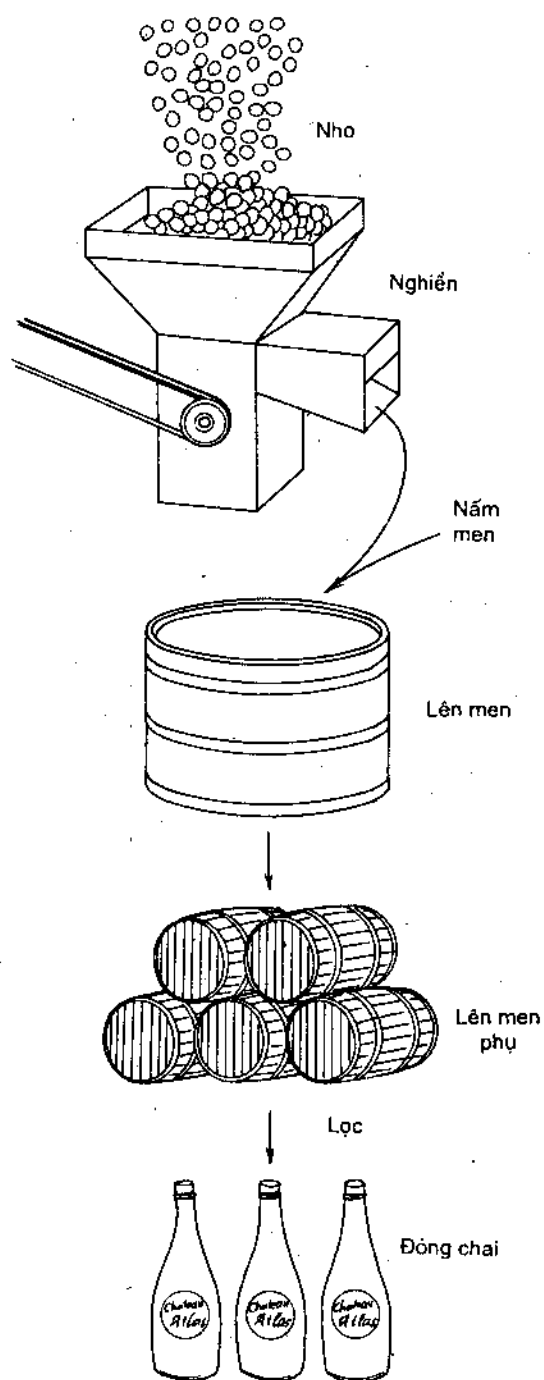


Cấu tạo của Axetato (Acetator) :

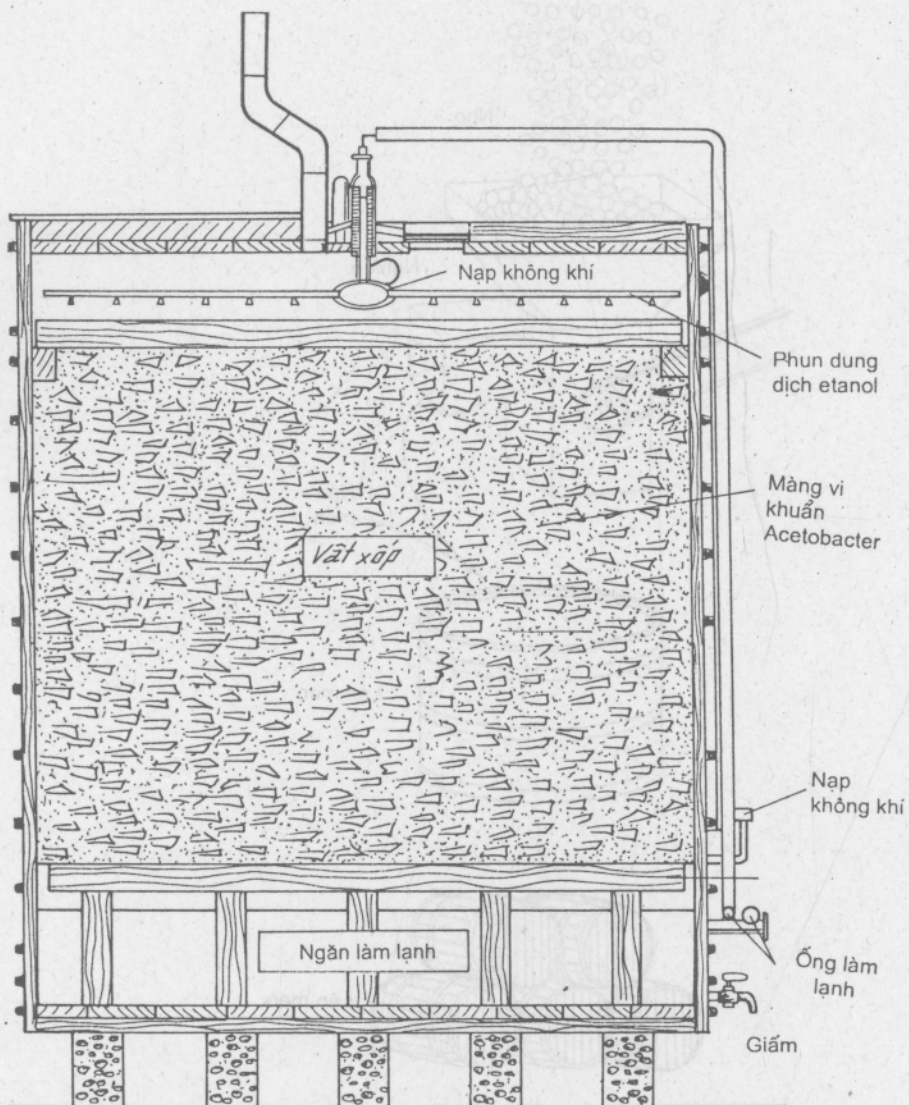
- a - Máy thổi khí (aerator)
- b - Thiết bị khử bọt (defoamer)
- c - Cồn kế (alcograph)
- d - Thiết bị kiểm tra mức môi trường
- e - Bơm nguyên liệu
- f - Bơm axit axetic (giảm)
- g - Thiết bị làm nguội
- h - Nhiệt kế
- i - Van nước lạnh
- k - Thiết bị đo lưu lượng khí
- l - Ống dẫn



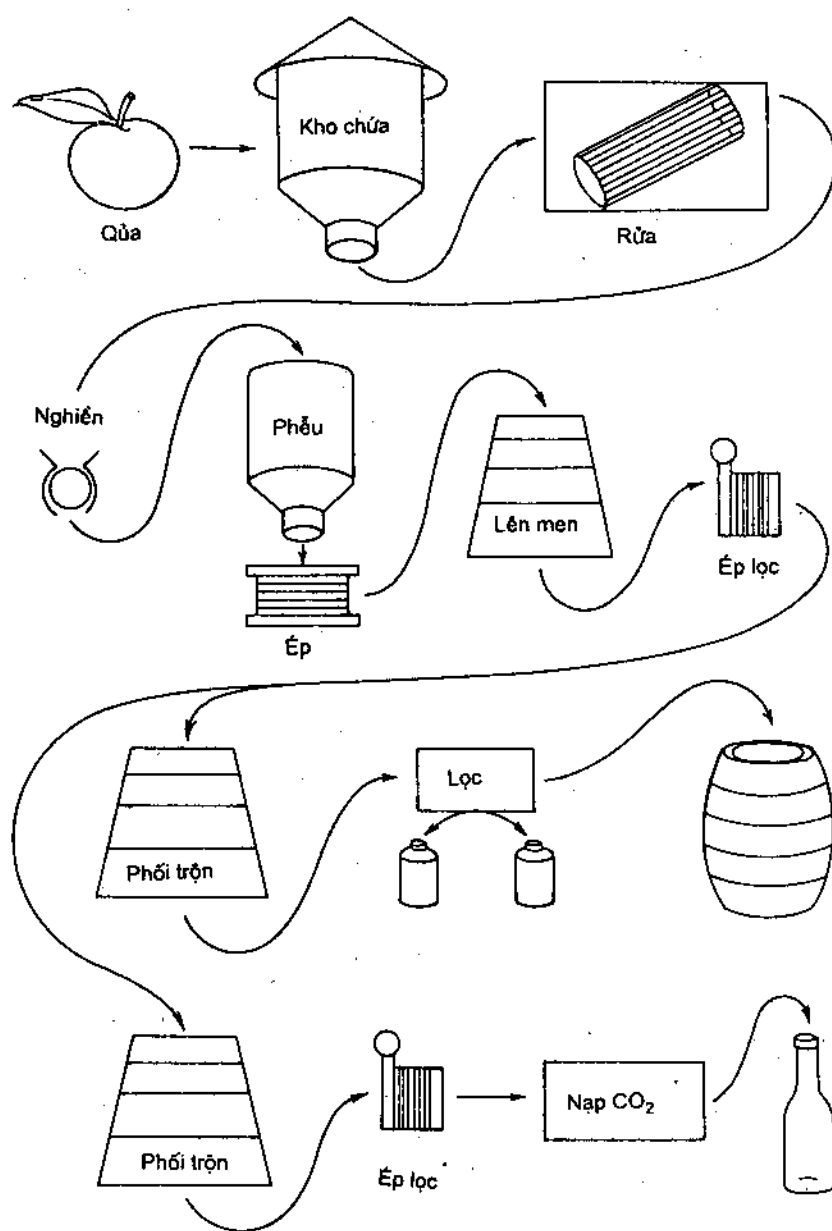
Sơ đồ sản xuất bia



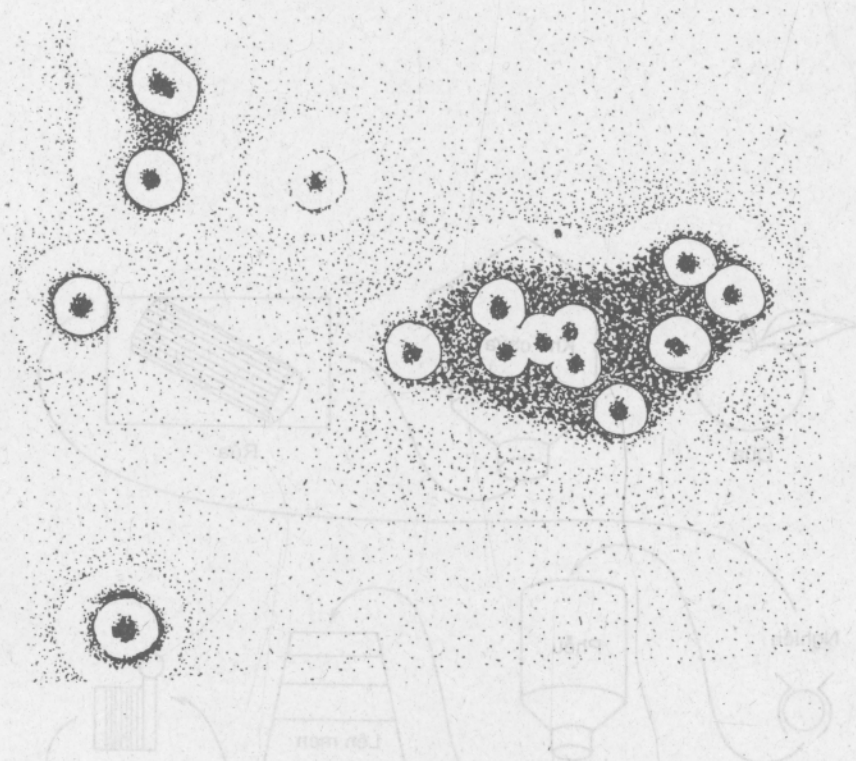
Sơ đồ sản xuất rượu vang nho



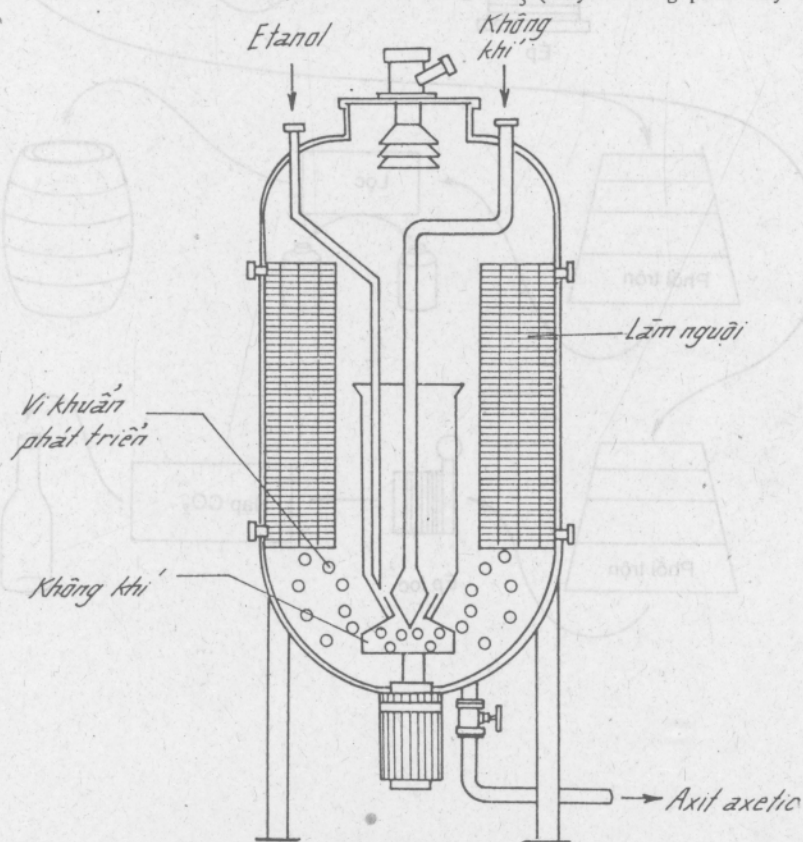
Cấu trúc của thùng lên men giấm



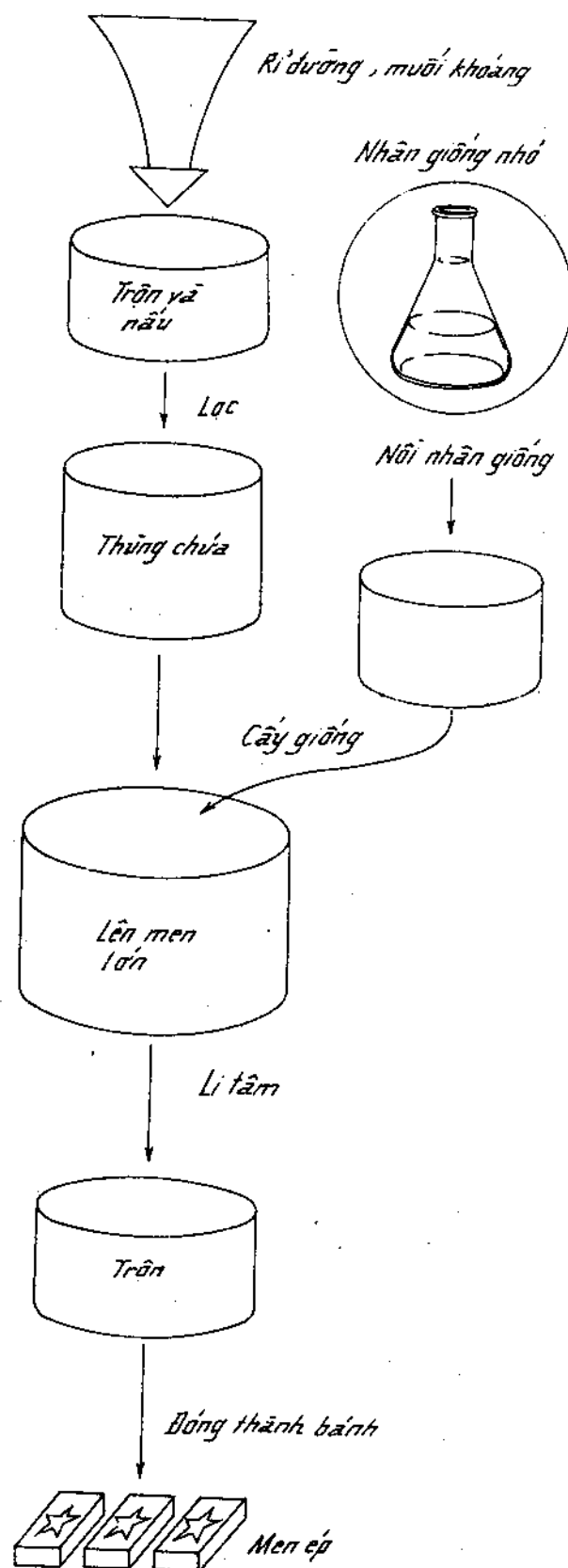
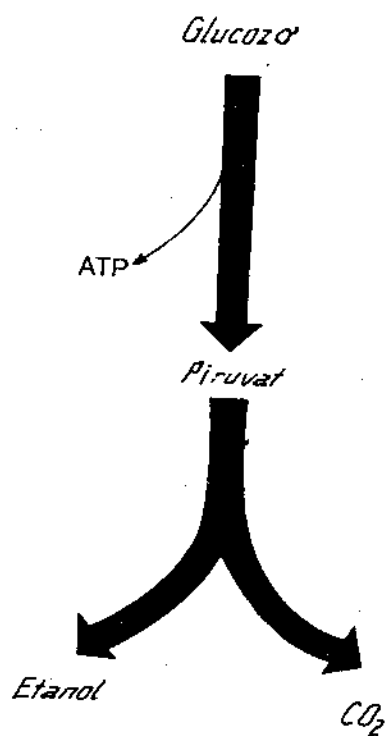
Sơ đồ sản xuất nước quả lên men



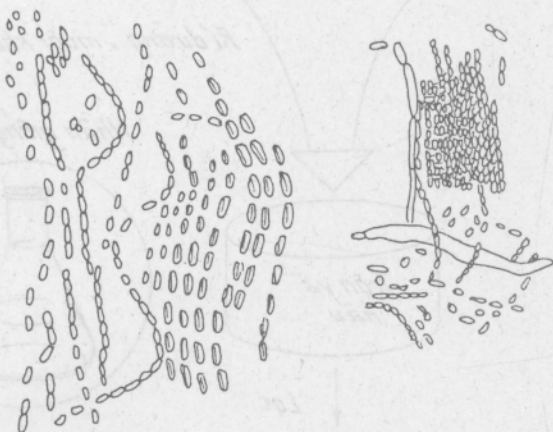
Khuẩn lạc *Acetobacter* trên thạch đĩa có chứa CaCO_3 (thấy rõ vòng phân hủy CaCO_3)



Cấu trúc của axetato (acetator)

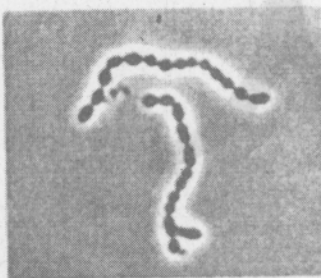


Làm nở bột mì bằng men bánh mì



Acetobacter và các dạng dị hình

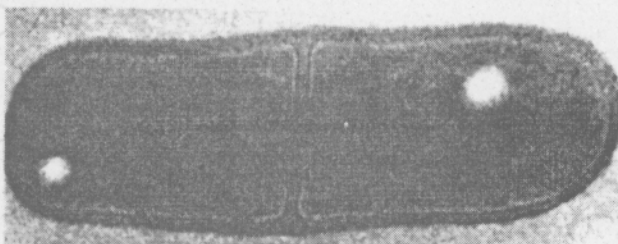
Vi khuẩn *S. lactis*



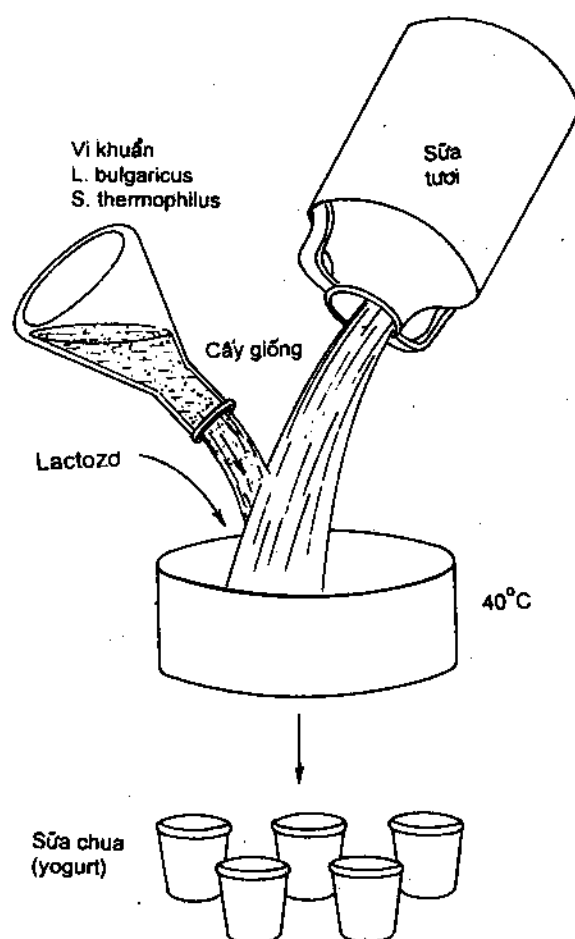
Vi khuẩn *L. acidophilus*,
(bề ngang tế bào khoảng $0,75\mu\text{m}$)



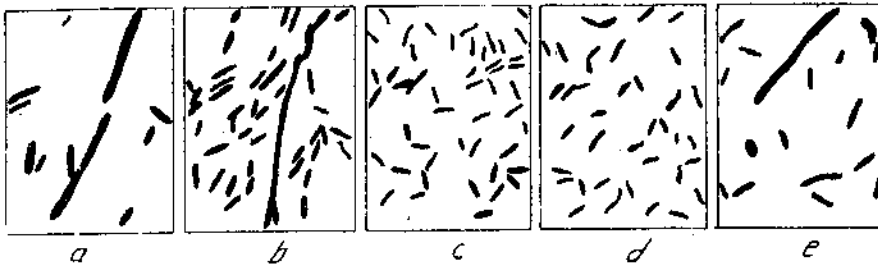
Vi khuẩn *L. brevis*
(chụp ở kính hiển vi điện tử),
kích thước tế bào khoảng $0,8 \times 2\mu\text{m}$



Vi khuẩn *L. delbrueckii*
(chụp ở kính hiển vi điện tử)
kích thước tế bào không $0,8 \times 2\mu\text{m}$.

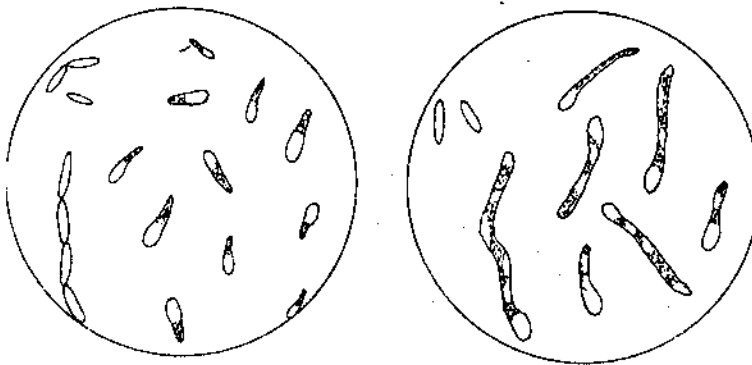


Sơ đồ sản xuất sữa chua

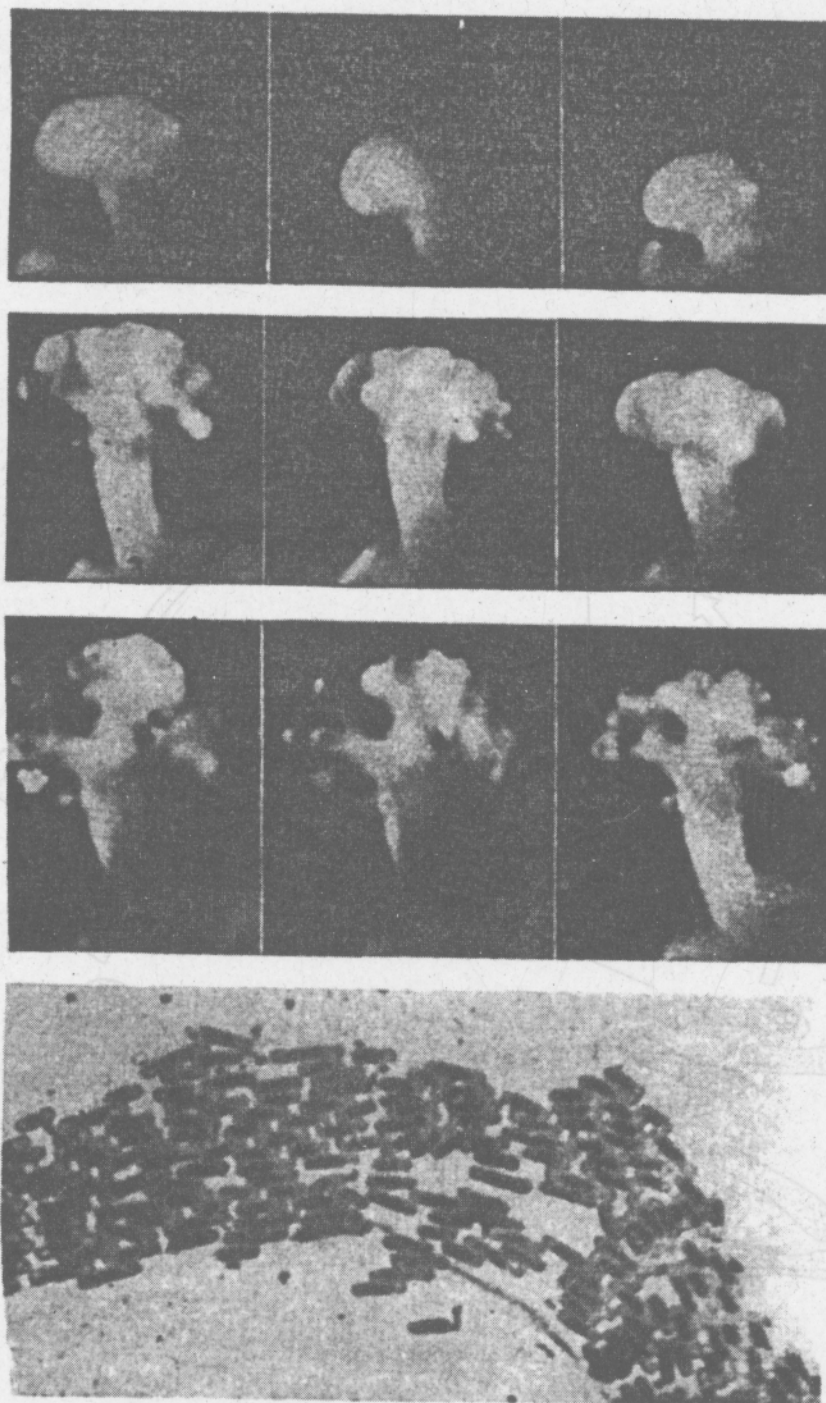


Vi khuẩn *C. acetobutylicum*

- a) lên men sau 3 - 6 giờ.
- b) lên men sau 6 - 12 giờ.
- c) lên men sau 12 - 20 giờ.
- d) lên men sau 18 - 30 giờ.
- e) cuối giai đoạn lên men.

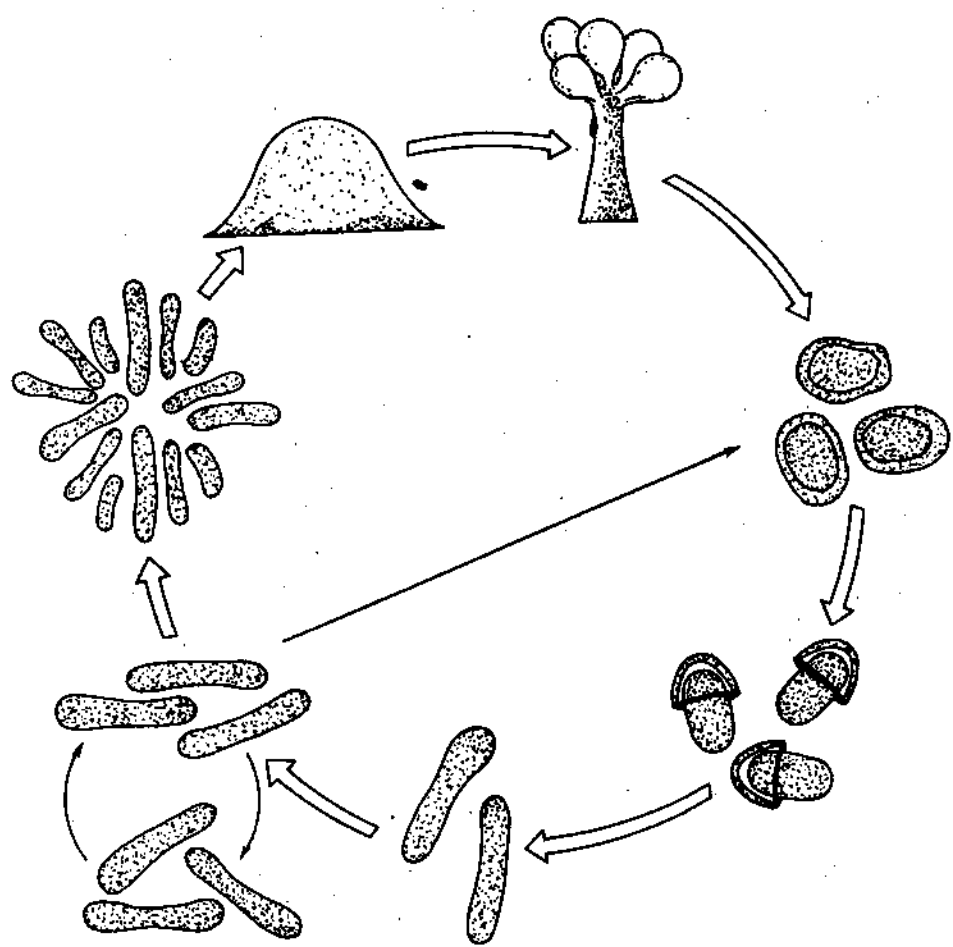


Vi khuẩn phân giải pectin
(trái : *C. pectinovorum*, phải : *C. felsenium*)

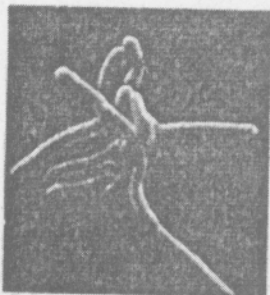


Quả thể và tế bào ở niêm: vi khuẩn *Chondromyces*

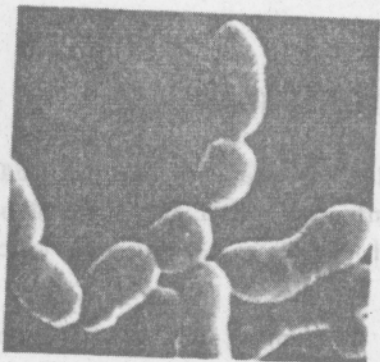
ĐẠI HỌC
Y DƯỢC
HÀ NỘI
1981-1982



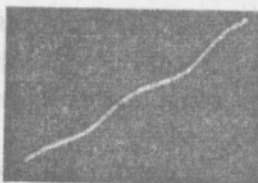
Chu trình phát triển ở niêm vi khuẩn *Myxococcus xanthus*



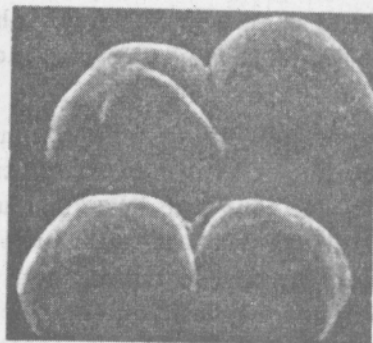
a) *Methanobrevibacter ruminantium*



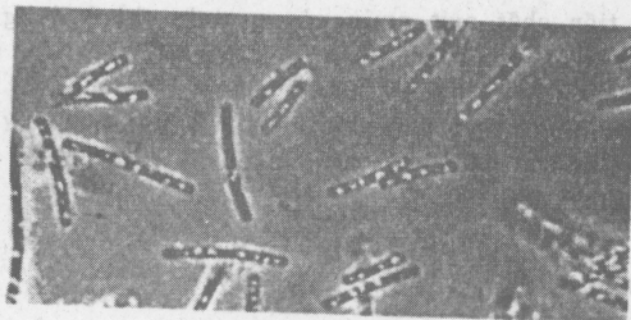
b) *Methanobacterium* sp.



c) *Methanospirillum hungatei*



d) *Methanosarcina barkeri*



e) *Methanotherix* sp.

Một số vi khuẩn cổ (Archae) sinh metan

CHƯƠNG VII

CÁC QUÁ TRÌNH SINH TỔNG HỢP VÀ CỐ ĐỊNH NITƠ

1. CÁC QUÁ TRÌNH SINH TỔNG HỢP

Khi một tế bào vi khuẩn sinh trưởng và phân chia, kết quả cuối cùng là xuất hiện hai tế bào. Vì vậy, để quá trình trên được hoàn thành, mỗi phân tử trong tế bào bố, mẹ phải được nhân đôi và được lắp vào đúng vị trí của chúng trong cấu trúc đang phát triển. Cấu trúc này sẽ trở thành tế bào con.

Như ta đã biết tế bào vi khuẩn tạo thành bởi một lượng lớn các cao phân tử (protein, axit nucleic, polisaccarit, lipid...). Tuy nhiên trong tế bào các chất này bao giờ cũng đi kèm với một tỉ lệ nhất định các hợp chất có khối lượng phân tử thấp. Bản thân các hợp chất có khối lượng phân tử thấp cuối cùng sẽ trở thành một phần của các cao phân tử hoặc được dùng với vai trò xúc tác trong sinh tổng hợp chất cao phân tử hay tham gia trong trao đổi năng lượng của tế bào.

Khi đưa vào môi trường nuôi cấy vi khuẩn các hợp chất có khối lượng phân tử thấp như axit amin, các purin và pirimidin, nhiều vi khuẩn có khả năng hấp thụ trực tiếp các chất trên. Nhưng khi trong môi trường thiếu các chất này, vi khuẩn phải tự tổng hợp chúng từ các tiền chất đơn giản hơn. Nguồn quan trọng cung cấp các tiền chất đó chính là chu trình tricarboxilic.

Việc tổng hợp tất cả các loại cao phân tử mang một nét chung : một trong các chất phản ứng phải cung cấp năng lượng cho bước trùng hợp. Chẳng hạn, trong trường hợp tổng hợp hidrat cacbon cần cung cấp năng lượng cho việc tổng hợp liên kết glucozit, với protein thì năng lượng cần cho việc tạo thành peptit và với các axit nucleic thì trùng hợp là việc hình thành este đường-phosphat. Trong tất cả các trường hợp thành phần có khối lượng phân tử thấp là phân tử được hoạt hóa và đảm nhiệm việc cung cấp năng lượng. Chẳng hạn các nucleotit là tiền chất của axit nucleic monosaccarit là tiền chất của các polisaccarit ; các tiền chất axit amin của protein thì ở dạng các anhidrit axit hỗn hợp với axit photphoric ; các bazơ purin và pirimidin cần cho tổng hợp axit nucleic thì ở dạng các nucleotit triphosphat. Đáng chú ý là việc tổng hợp protein và axit nucleic. Ở đây các hoạt động theo tính đặc hiệu của một phân tử thứ hai gọi là khuôn, khuôn mang thông tin bảo đảm cho các loại enzym khác nhau hoạt động ở vị trí và theo một thứ tự chính xác.

1.1. Sinh tổng hợp axit amin

Axit amin được phân thành một số họ trên cơ sở các phản ứng mở đầu chung trong quá trình sinh tổng hợp. Các họ này là :

Họ axit amin thơm : phenylalanin, triptophan, tirozin.

Họ aspartat : asparagin, axit aspartic, izoloxin, lizin, metionin, treonin

Họ glutamat : acginin, axit glutamic, glutamin, prolin.

Họ piruvat : alanin, loxin, valin

Họ xerin : xixtein, glixin, xerin.

Histidin

Tổng hợp histidin khác với tổng hợp của tất cả các axit amin còn lại và bước mở đầu tổng hợp tương tự với các bước đầu tiên trong việc tạo thành pirimidin.

Bước kết thúc chung trong sinh tổng hợp axit amin là sự chuyển amin từ glutamat đến một hợp chất keto dẫn đến tạo thành một axit amin và α - ketoglutarat.

Sinh tổng hợp của các axit amin thơm bao gồm việc hình thành hợp chất chuỗi thẳng 7-carbon 3-deoxy-D-arabino-heptulozonat-7-phosphat ; chất này sẽ chuyển thành 5-dehidro-quinat có cấu trúc vòng và là tiền chất của vòng thơm. Chất trung gian cuối cùng của con đường là corismat, một chất không bền.

Aspartat là điểm khởi đầu tổng hợp treonin. Bản thân treonin lại có thể bị khử amin để tạo thành α -ketobutirat, tiền chất của izoloxin. Việc tạo thành metionin, ngoài aspartat ra, còn cần xuxinyl-coA, xixtein và metyl-tetrahydrofolat.

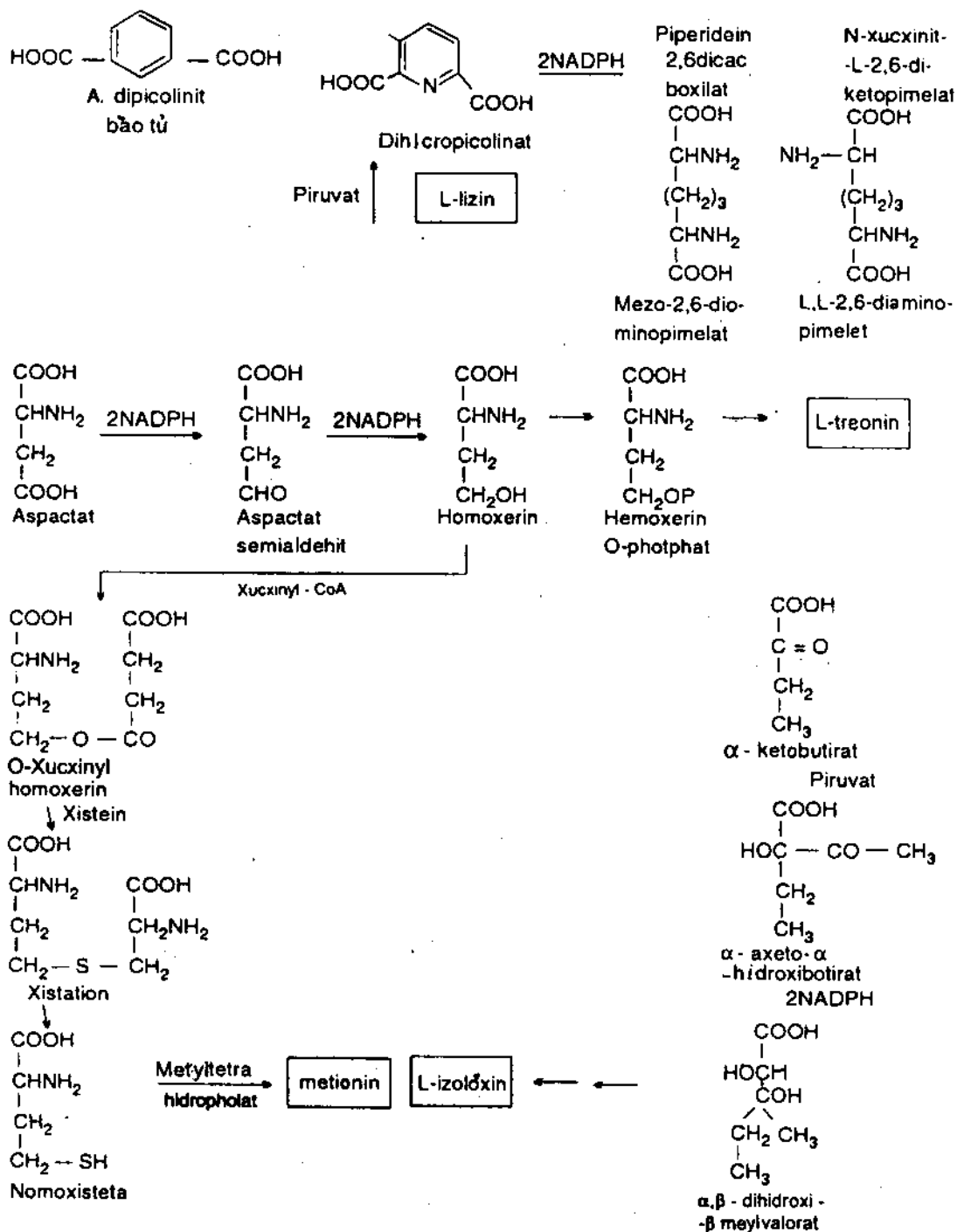
Con đường tổng hợp lizin trong vi khuẩn qua một chất trung gian là mezo-2,6-diaminopimelat ; chất này (hoặc lizin) là một thành phần của chuỗi peptit bên trong murein. Trong nấm sợi và nấm men, lizin lại được tổng hợp qua chất trung gian là α -aminoadipat.

Sinh tổng hợp của L-xerin có thể theo một trong hai con đường. Cả hai đều khởi đầu với 3-phosphoglixerat, nhưng trong một con đường cơ chất bị khử photpho ngay thành glixerat còn ở con đường kia cơ chất bị oxi hóa thành photphohidroxi-piruvat.

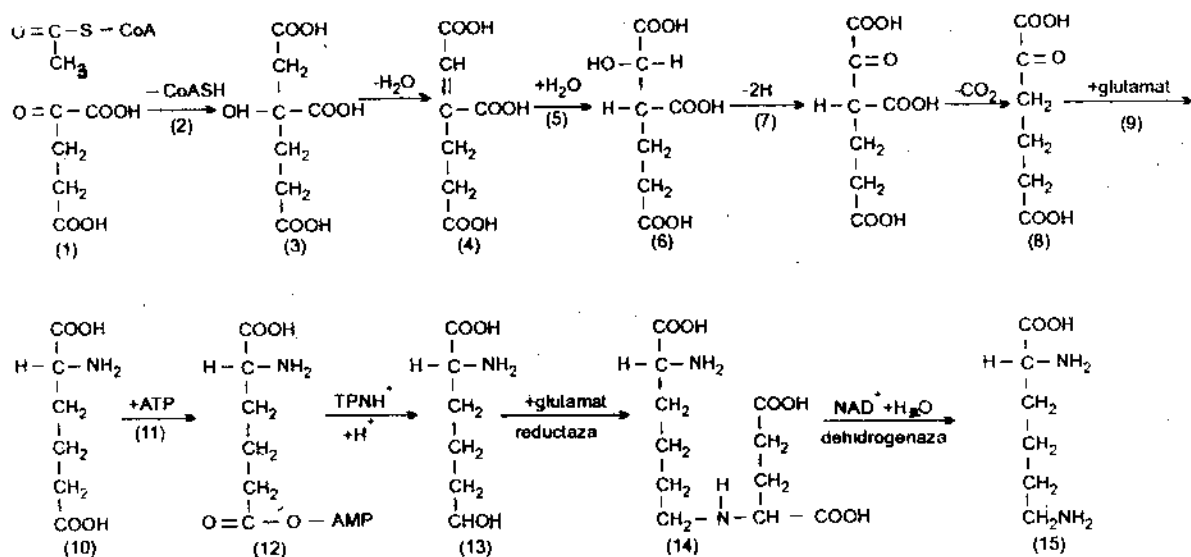
Trong họ glutamat, axit glutamic được tạo thành bằng con đường amin hóa axit α -ketoglutaric, một sản phẩm của chu trình tricarboxylic. Sinh tổng hợp của L-acginin, L-glutamin và prolin từ axit L-glutamic được trình bày ở sơ đồ.

Trong họ piruvat, L-alanin được tổng hợp trực tiếp từ piruvat bằng cách chuyển amin, hoặc trong một số trường hợp bằng amin hóa trực tiếp. Sinh tổng hợp của L-valin và L-loxin được trình bày ở sơ đồ.

Ngày nay các axit amin được sử dụng rộng rãi trong y học, trong chăn nuôi và trong công nghiệp thực phẩm. Có thể sản xuất axit amin bằng con đường tổng hợp hóa học nhưng nhược điểm của phương pháp này là sản sinh ra cả hai dạng đồng phân quang học. Trái lại con đường tổng hợp sinh học chỉ sản ra các L-axit amin là dạng gặp trong hầu hết các hệ thống sinh học. Đôi khi người ta kết hợp cả tổng hợp hóa học và tổng hợp sinh học như trong trường hợp sản xuất lizin từ axit diaminopimelic. Bước sản xuất axit diaminopimelic là thuần túy hóa học nhưng bước cuối cùng tới lizin là sinh học.



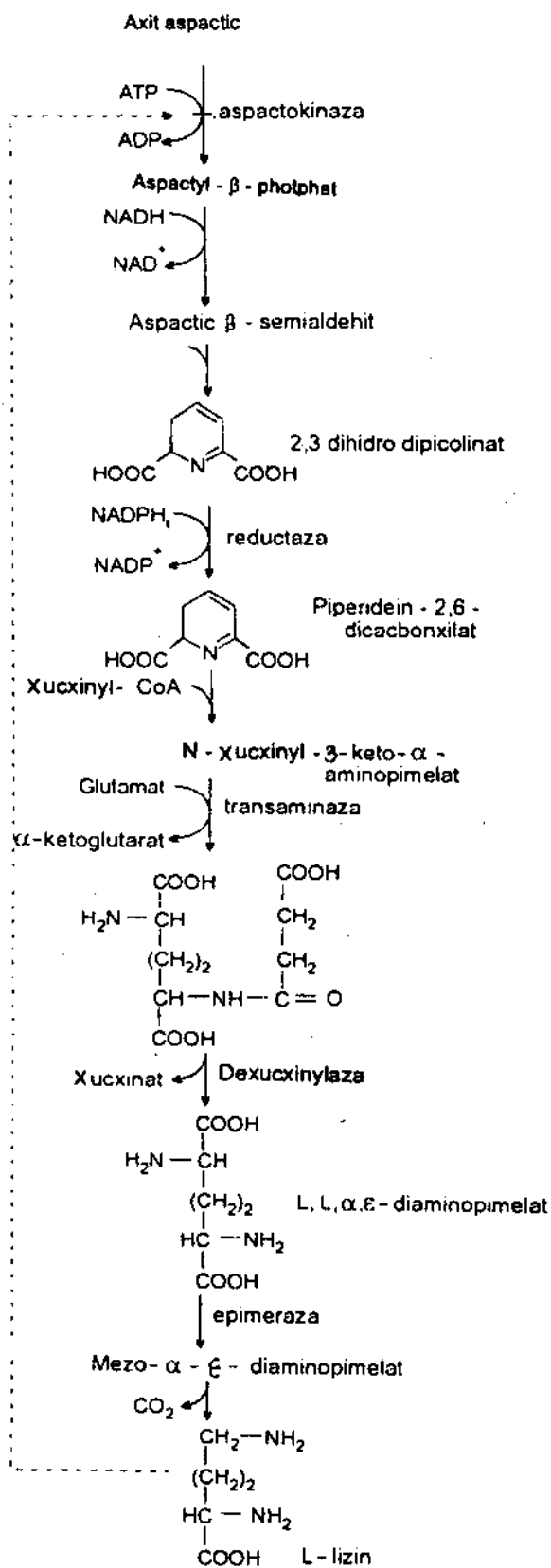
Sinh tổng hợp của các axit amin thuộc họ aspartat. Aspartat thường được hình thành từ oxalacetat do phản ứng chuyển amin từ glutamat. Một số vi khuẩn tổng hợp aspartat bằng con đường amin hóa trực tiếp. Con đường dẫn tới hình thành L-lizin ở đây thấy trong vi khuẩn *E.coli*.



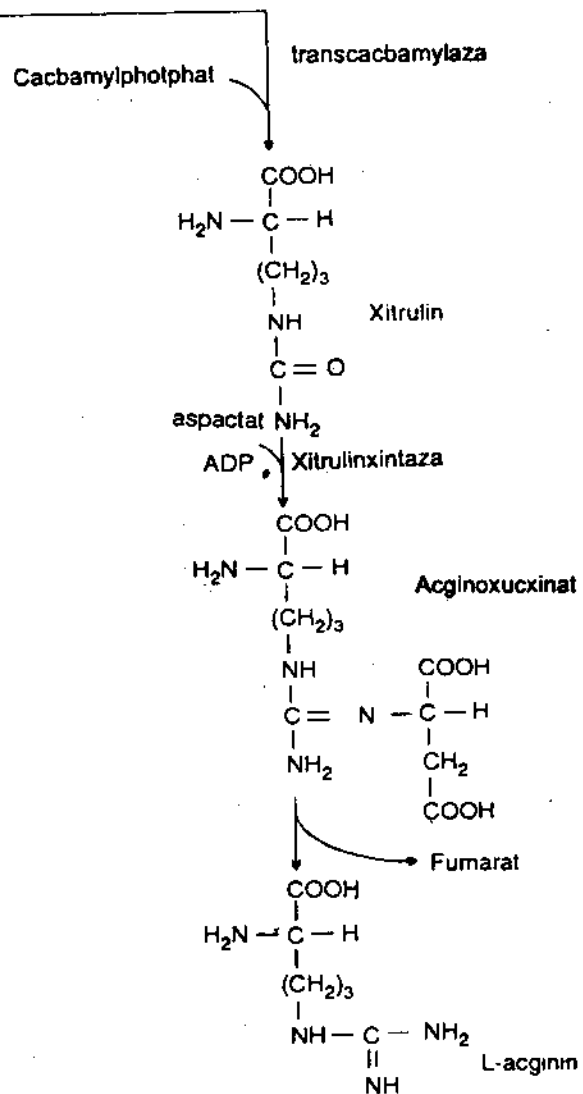
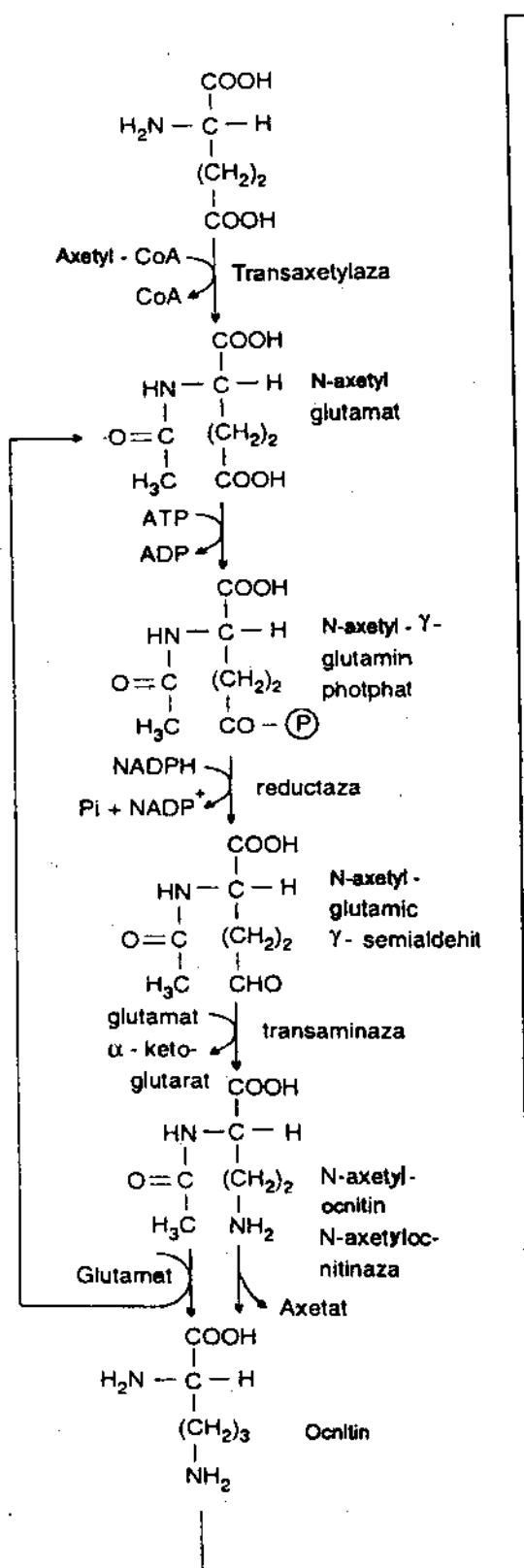
Chú thích :

- | | |
|--|---|
| (1) Axetyl-CoA +
α -ketoglutarat | (9) Transaminaza |
| (2) Homoxitrat sintaza | (10) α -Aminoacidat |
| (3) Homoxitrat | (11) Sintaza |
| (4) Homoaconitat | (12) δ -Adenilil -
α -aminoacidat |
| (5) Hidraza | (13) α -Aminoacidic -
δ -semialdehid |
| (6) Homoizoxitrat | (14) Saccaropin |
| (7) Dehidrogenaza | (15) Lizin |
| (8) α -Ketoadipat | |

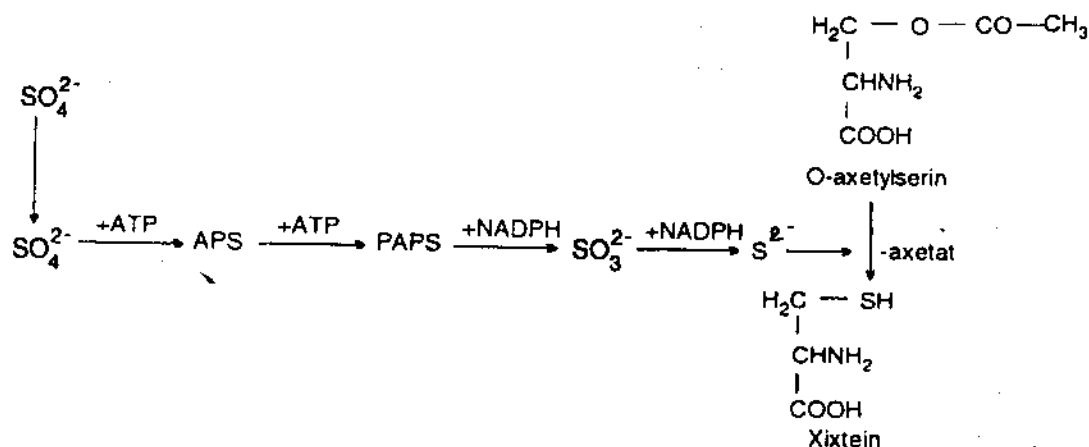
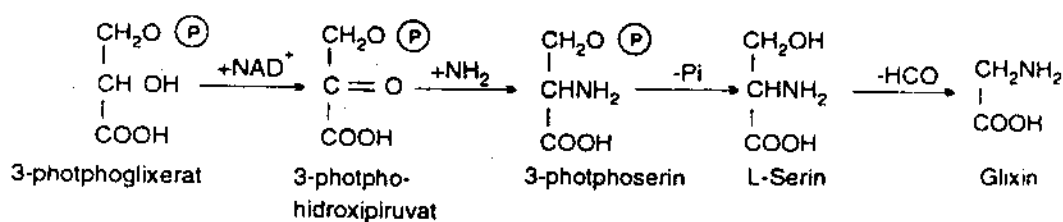
Sinh tổng hợp L-lizin ở nấm men và nấm sợi



Sinh tổng hợp L-lizin ở vi khuẩn



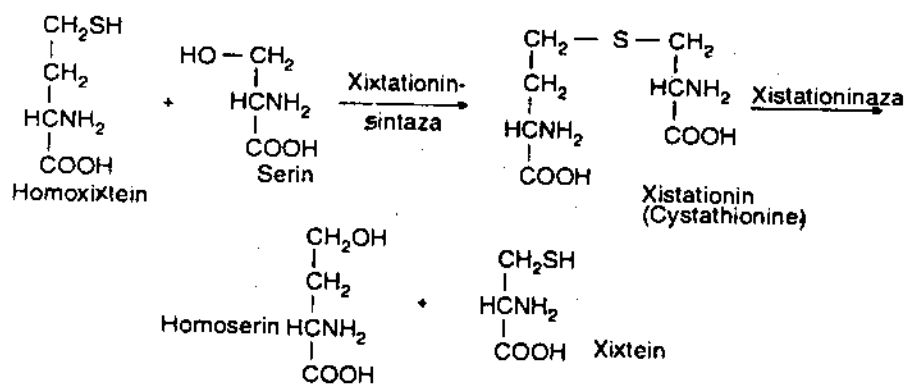
Sinh tổng hợp acginin



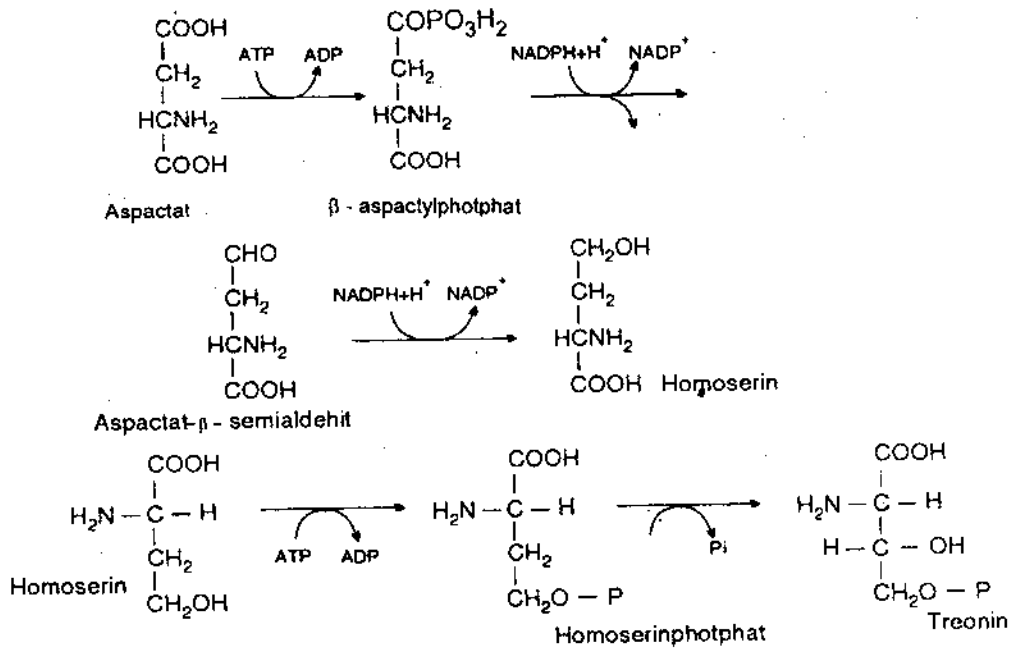
Sinh tổng hợp xerin, glixin và xixtein

Chú thích : APS : Adenozin-5'-phosphosunphat

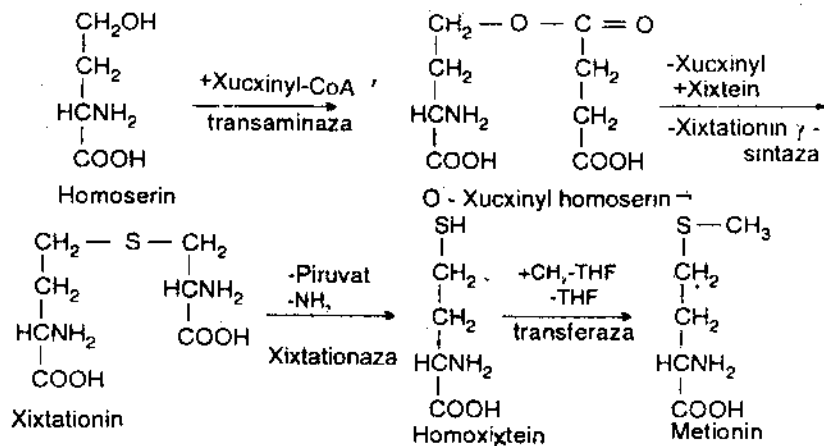
PAPS : 3'phosphoadenozin-5'-phosphosunphat



Một con đường khác để sinh tổng hợp xixtein



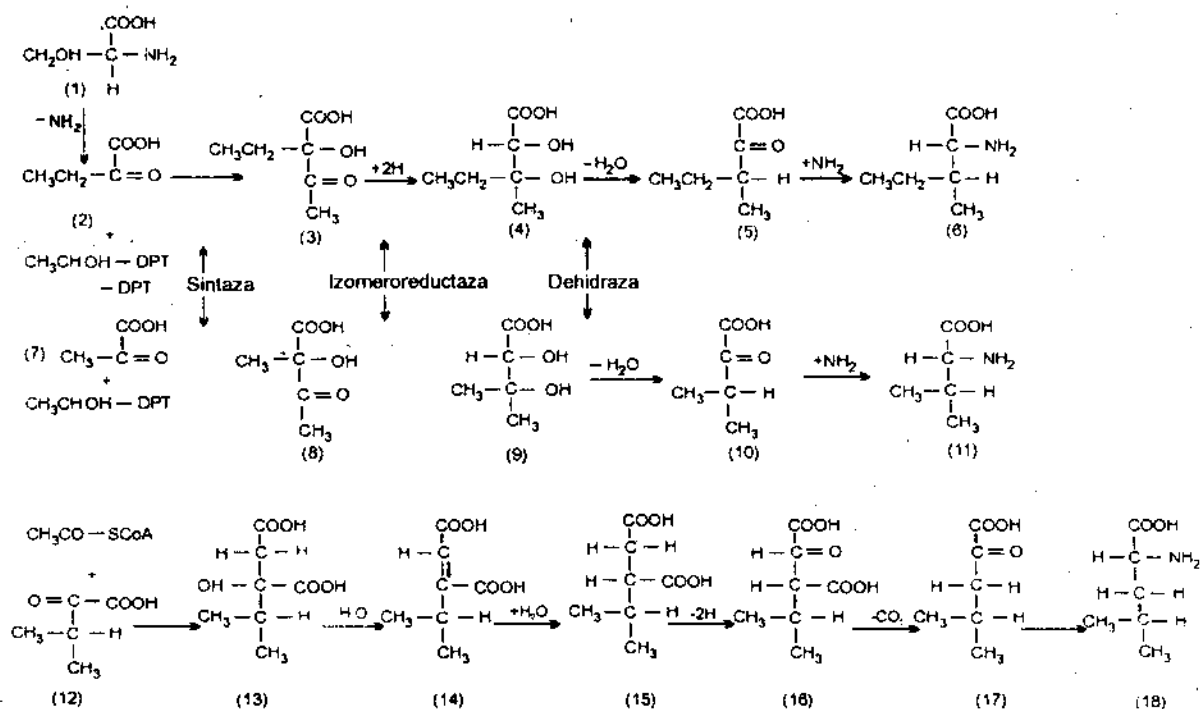
Sinh tổng hợp treonin



Sinh tổng hợp metionin

Chú thích: $\text{CH}_2\text{-THF} = \text{N}^5\text{-Metyltetrahydrofolat}$

THF = Tetrahydrofolat



Sinh tổng hợp isoleucin, leucin và valin

- (1) Treonin
- (2) α -Ketobutirat
- (3) α -Axeto- α -hidroxibutirat
- (4) $\alpha\beta$ -Dihidroxi- β -metyl valerat
- (5) α -Keto- β -metyl valerat
- (6) *L*-Izoloxin
- (7) Piruvat
- (8) α -Axetolactat
- (9) $\alpha\beta$ -Dihidroxi-izovalerat
- (10) α -Ketoizovalerat
- (11) *L*-Valin
- (12) α -Ketoizovalerat
- (13) α -Izopropylmalat
- (14) *sis*-Dimethylxitraconat
- (15) β -Izopropylmalat
- (16) α -Keto- β -cacboxyl-izo caproat
- (17) α -Ketoizocaproat
- (18) Loxin

Việc sản xuất công nghiệp các axit amin bằng con đường vi sinh vật bắt đầu từ khi phát hiện ra vi khuẩn tổng hợp với hàm lượng cao axit glutamic (Kinoshita và tập thể, 1957). Tuy nhiên hầu hết các chủng phân lập trong tự nhiên không cho ta sản lượng axit amin cao đủ cho việc sản xuất công nghiệp trừ ba loại là axit L-glutamic, DL-alanin và L-valin. Nguyên nhân chủ yếu là do tế bào có các cơ chế điều chỉnh trao đổi chất tránh được hiện tượng sản xuất thừa. Những biến chủng mất khả năng tổng hợp chất điều chỉnh (thường là sản phẩm cuối cùng hoặc dẫn xuất của sản phẩm cuối cùng của một con đường trao đổi chất) sẽ tích lũy một lượng lớn tiền chất và tiết ra môi trường bên ngoài. Đây là nguyên tắc ứng dụng các biến chủng trợ dưỡng vào việc sản xuất axit amin bằng con đường lên men.

Hai axit amin chính sản xuất bằng lên men là axit glutamic và lizin. Trong việc sản xuất axit glutamic nồng độ hydrat cacbon (glucozơ hoặc sacarozơ) thường dùng là 10-20%, nguồn nitơ là ure hoặc NH_4^+ , các muối kim loại là Mg^{2+} , Mn^{2+} và Fe^{2+} . Ngoài ra người ta còn thêm vào các chất kích thích như axit pelagonic. pH được điều chỉnh giữa 7 và 8 nhờ ure hoặc khí NH_3 . Nồng độ biotin rất quan trọng vì có tác dụng điều khiển sản lượng. Vi sinh vật thường được dùng để sản xuất axit glutamic là *Corynebacterium* sp., ngoài ra người ta cũng sử dụng các chi *Brevibacterium*, *Micrococcus*, *Microbacterium*. Việc thu hoạch sản phẩm từ môi trường nuôi cấy tương đối dễ dàng vì axit glutamic không hòa tan trong điều kiện axit. Cách tiến hành như sau: sinh khối loại bỏ đi, dịch lọc được cô đặc và điều chỉnh pH tới 3,2. Axit glutamic kết tủa được thu lại bằng lọc.

Việc sản xuất lizin cũng tương tự như sản xuất axit glutamic, vi sinh vật thường dùng là biến chủng của *Micrococcus glutamicus*. Biotin kém quan trọng hơn so với khi sản xuất axit glutamic nhưng nồng độ của homoxerin, treonin và metionin có ảnh hưởng sâu sắc đến hàm lượng lizin. Lizin khó tách khỏi môi trường hơn so với axit glutamic, nhưng có thể dùng nhựa trao đổi ion để chiết rút. Sản phẩm thu được ở dạng monohydroclorit lizin sau đó được kết tinh lại và cho axit amin thuần khiết.

Các axit amin khác được sản xuất nhờ vi sinh vật với số lượng ít hơn.

Sinh tổng hợp axit amin bằng con đường lên men

Axit amin	Chủng vi sinh vật	Năng suất
Lên men từ chủng hoang dại: Axit glutamic hay MSG Valin DL-alanin L-alanin	<i>Corynebacterium glutamicum</i> <i>Aerobacter cloacae</i> <i>Corynebacterium getatinosum</i> <i>Pseudomonas</i> sp.	50 ~ 150 g/l 15 g/l > 40% > 30%
Lên men từ chủng đột biến khuyết dưỡng: Lizin Lizin Valin DL-alanin Treonin Ocnitin Xitruilin Prolin Prolin	<i>C. glutamicum</i> (his ⁻) <i>Brevibacterium flavum</i> (thr ⁻) <i>B. lactofermentum</i> (thr ⁻) <i>Bacillus coagulans</i> (met ⁻) <i>A. aerogenes</i> (met ⁻) <i>E. coli</i> (met ⁻ , val ⁻) <i>C. glutamicum</i> (cit ⁻ hoặc arg ⁻) <i>B. subtilis</i> (arg ⁻) <i>Kurthia cateniform</i> (ser ⁻) <i>B. sp. No. 7996 YS-48</i> (his ⁻)	50 - 100 g/l 32.7 g/l 20 g/l 11.8 g/l 8 g/l 10.5 g/l 36% 13 % 30 g/l 25 g/l

Lên men từ chủng đột biến khuyết dưỡng đặc biệt :		
Lizin	<i>B. flavum</i> [S-(2-aminoethyl)- : -cystine]	34 g/l
Valin	<i>Serratia marcescens</i> [α -hydroxy axit butyric	8 g/l
Homoserin	<i>B. flavum</i> [α -amino- β -hydroxyvaleric axit met']	18 g/l
Acginin	<i>B. subtilis</i> [L-arginin hydroxamat']	4.5 g/l
Tryptophan	<i>B. subtilis</i> [5-fluorotryptophan']	Tryptophan 4 g/l
Histidin	<i>B. flavum</i> [2-thiazol alanin, Etionin, 2-aminobenzothiazol, α -amino- β -hydroxyvaleric axit']	Phenylalanin 6 g/l 10 g/l
Lên men có bổ sung tiền thể:		
A. α -amino butilic \rightarrow izoloxin	<i>C. amagasakii</i>	20 g/l
D-treonin \rightarrow izoloxin	<i>Serratia marcescens</i>	5 ~ 15 g/l
A.antranyl \rightarrow tryptophan	<i>Hansenula anomala</i>	10 ~ 15 g/l
Phản ứng nhờ enzym :		
A.aspartic	Aspartaza của <i>E.coli</i>	100%
Dopa	Tirosinaza của <i>Erwinia herbicola</i>	
Tryptophan	Tryptophanaza của <i>Proteus rettgeri</i>	96%

1.2. Tổng hợp các nucleotit và axit nucleic

1.2.1. Tổng hợp các nucleotit

Các con đường sinh tổng hợp bazơ purin và pirimidin hoàn toàn không có liên quan với nhau nhưng có một đặc điểm chung là đều dẫn đến việc hình thành trực tiếp nucleotit.

Sản phẩm cuối cùng của con đường tổng hợp purin là axit inozinic (IMP). Phân ribozylphosphat ở đây do photpho-riboxylpyrophosphat (PRPP) cung cấp. Bản thân PRPP lại được hình thành từ ribo-5-phosphat và ATP.



Trước hết PRPP kết hợp với glutamin cho 5-phosphoriboxylamin

Chất này ngưng tụ với glixin (trong sự có mặt của ATP) cho amit. Cần chú ý rằng ba nguyên tử C còn lại của nhân purin là xuất phát từ axit cacbonic và fomicoenzim F (axit fomic hoạt động). Còn nguyên tử nitơ N-1 của nhân là do axit aspartic cung cấp, nguyên tử nitơ N-3 do asparagin cung cấp.

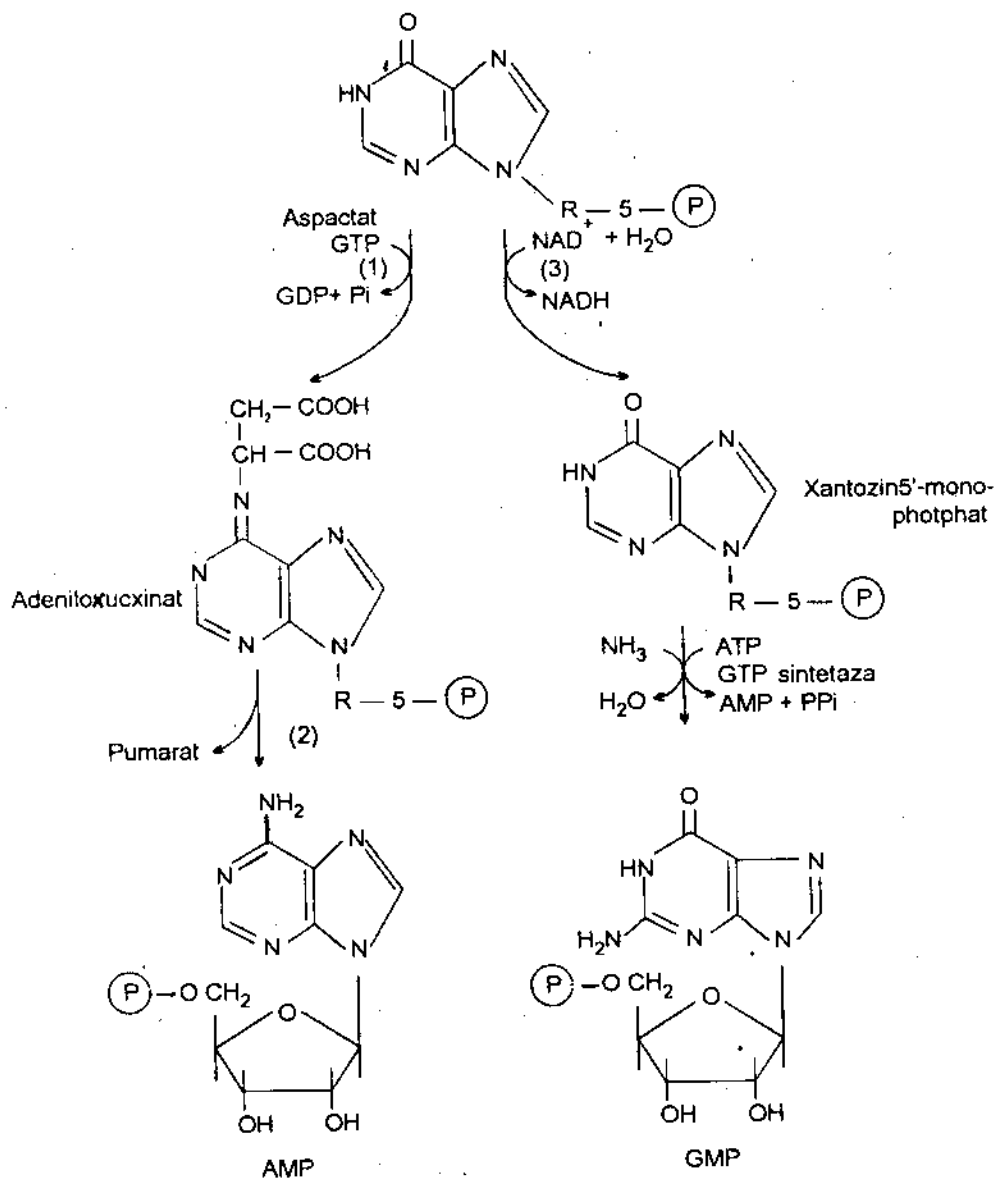
Axit inozinic là tiền chất của cả hai nucleotit purin adenosin-5'-phosphat (axit guanilic).

Con đường dẫn đến việc tổng hợp các ribonucleotit pirimidin ngắn hơn. Ở đây phần ribozyl của phân tử cũng xuất phát từ PRPP. Trước hết carbamylphosphat (hợp chất cao năng), kết hợp với axit aspartic thành axit carbamyl aspartic. Do phản ứng đóng vòng (phản ứng cần ATP) xuất hiện sản phẩm trung gian là axit dihydroorotic. Axit này bị khử hydro thành axit orotic, là chất cơ sở quan trọng nhất đối với các nucleotit pirimidin. Axit orotic phản ứng với PRPP tạo thành orotidin-5'-P, chất này bị khử cacboxyl cho axit uridilic (uridin-5'-P-UMP). Do phản ứng phosphoryl hóa nhờ ATP, từ UMP sẽ cho UDP và UTP. Trong dịch chiết tế bào của một số loài vi sinh vật, người ta đã tách được enzym xúc tác phản ứng giữa UTP và NH_4^+ cho XTP.

Về các phản ứng tổng hợp deoxyribonucleotit cho đến nay ta biết còn ít. Có lẽ các phản ứng này thay đổi tùy theo loài vi sinh vật. Chẳng hạn *E.coli* chứa enzym khử ribonucleozit-diphosphat thành các deoxyribonucleozitdiphosphat. Hoạt tính enzym cần ATP và Mg^{2+} , enzym là một tioredoxin khử có khối lượng phân tử khoảng 12.000.

Enzim tương ứng của *Lactobacillus leichmanii* lại xúc tác khử một số moni-, di- và triphosphat của các ribonucleozit ; khác với ở *E.coli*, enzim cần 5-deoxiadenozylcobamit là coenzim.

Ngoài việc tổng hợp *de novo* các ribo- và deoxiribonucleotit bắt đầu từ các hợp chất phân tử thấp nhiều vi sinh vật còn có khả năng sử dụng các purin hoặc pirimidin (hay các nucleozit và nucleotit của chúng) làm nguồn nucleotit của ARN và ADN. Một số vi sinh vật là trợ dưỡng (auxotroph, từ chữ la tinh *auxilium* = giúp đỡ, *troph* = dinh dưỡng) đối với các hợp chất này, vì chúng mất khả năng tổng hợp một hoặc một số enzim tham gia vào việc tổng hợp *de novo* các chất đó. Dịch chiết của các vi sinh vật chứa một số enzim có khả năng xúc tác sự chuyển hóa qua lại của các purin và pirimidin.

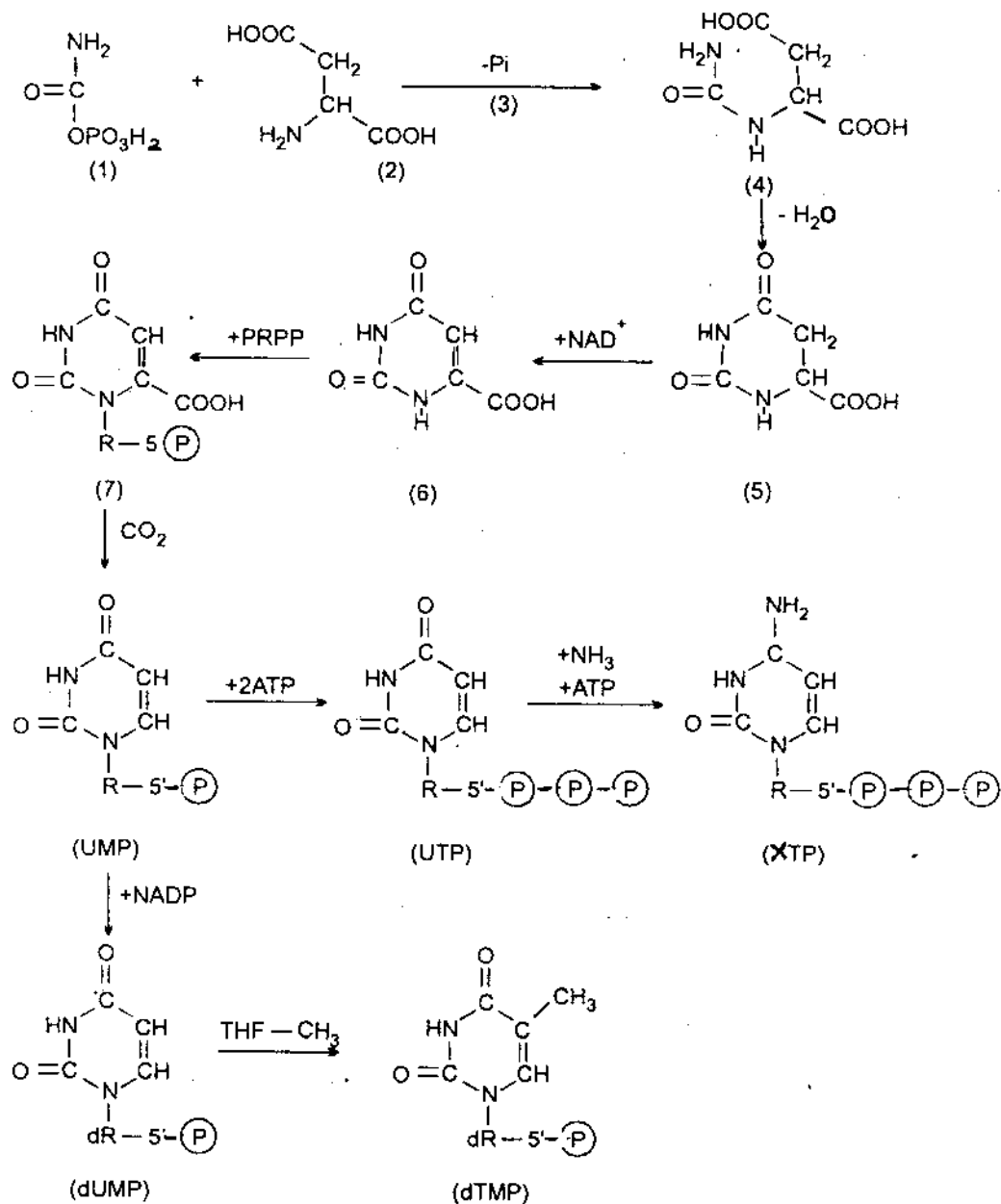


Sinh tổng hợp AMP và GMP từ IMP

AMP : adenosin-5'-phosphat = axit adenilic

GMP = guanosin-5'-phosphat = axit guanilic (1) Adeniloxuxinat sintetaza

(2) Adeniloxuxinaza (3) IMP dehidrogenaza



Sinh tổng hợp các pirimidin nucleotit

(1) Cacbamoyl photphat

(2) Aspactat

(3) Aspactat transcacbamoilaza

(4) N-cacbamoil-L-aspectat

(5) Dihidroorotat

(6) Orotat

(7) OMP (orotidin 5'-monophotphat)

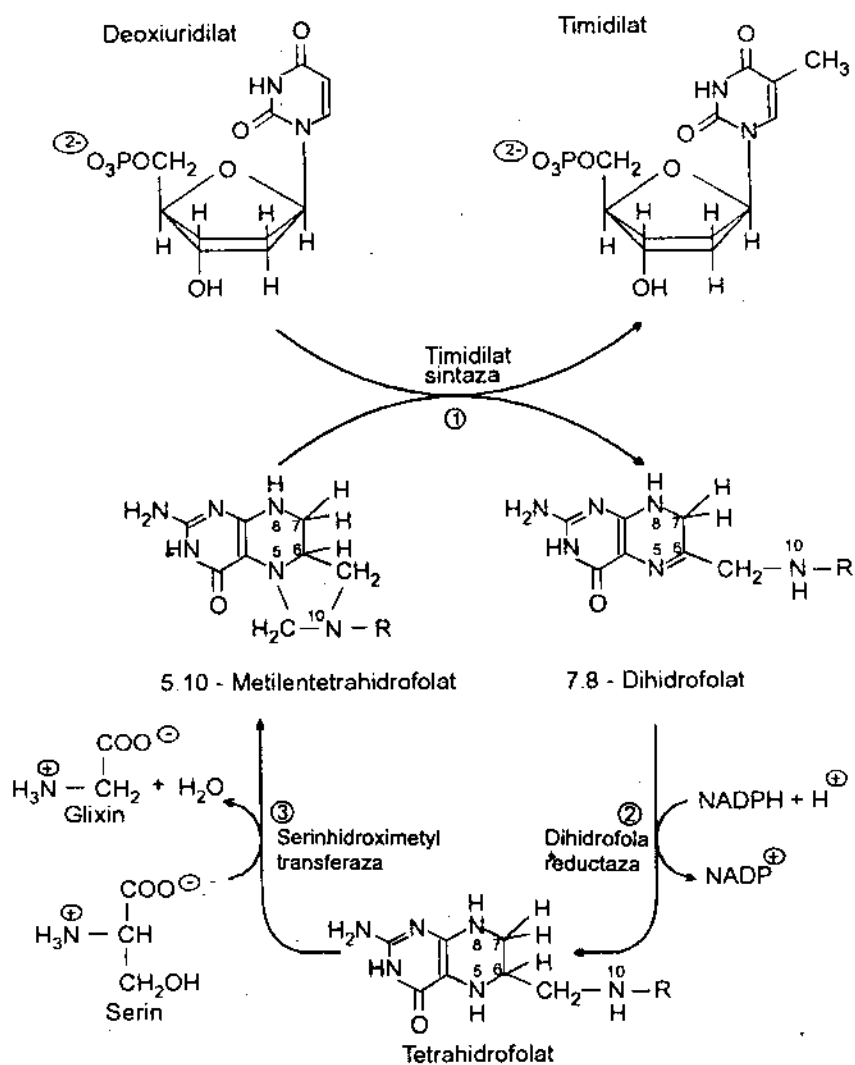
UMP = Uridilat (Uridin 5'-monophotphat)

UTP = Uridin 5'-triphotphat

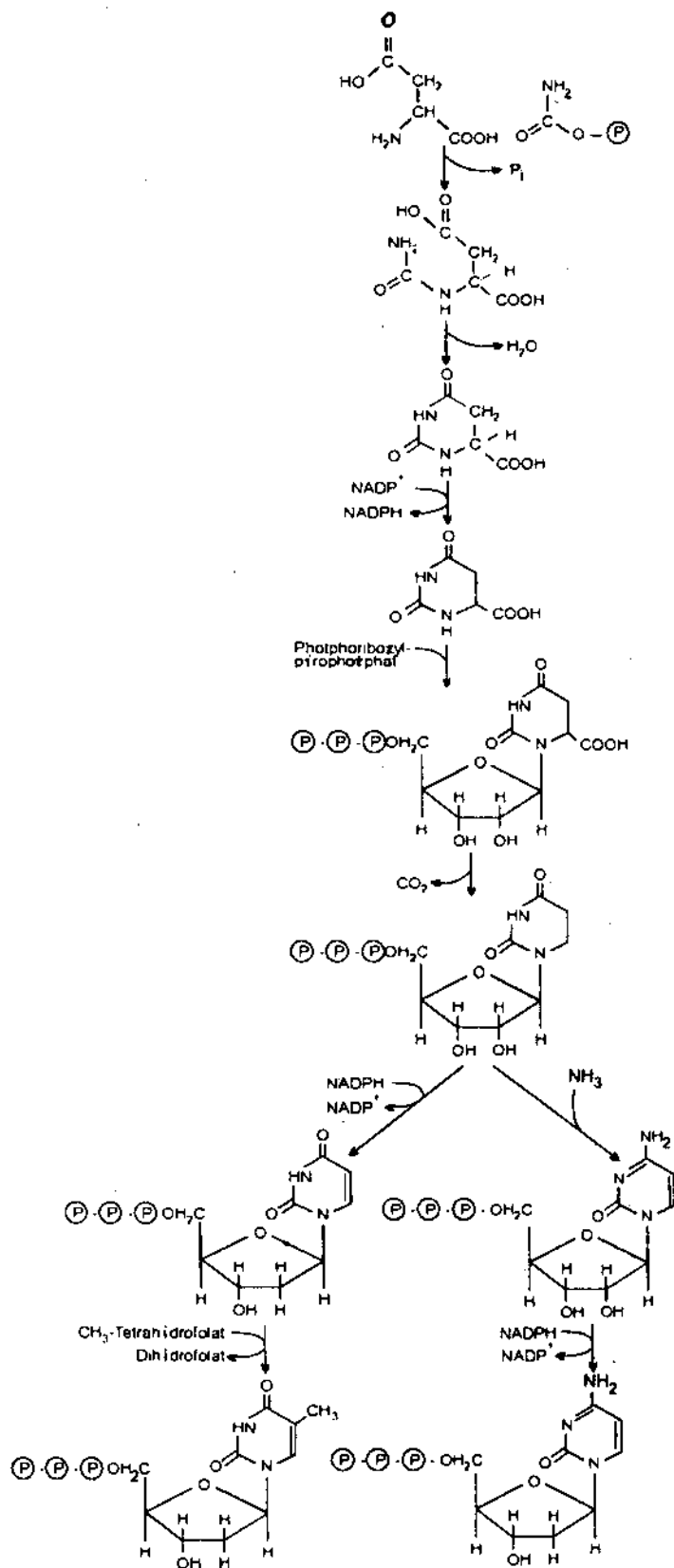
XTP = Xitidin 5'-triphotphat

dUMP = deoxi-uridin 5'-monophotphat = deoxi-uridilat

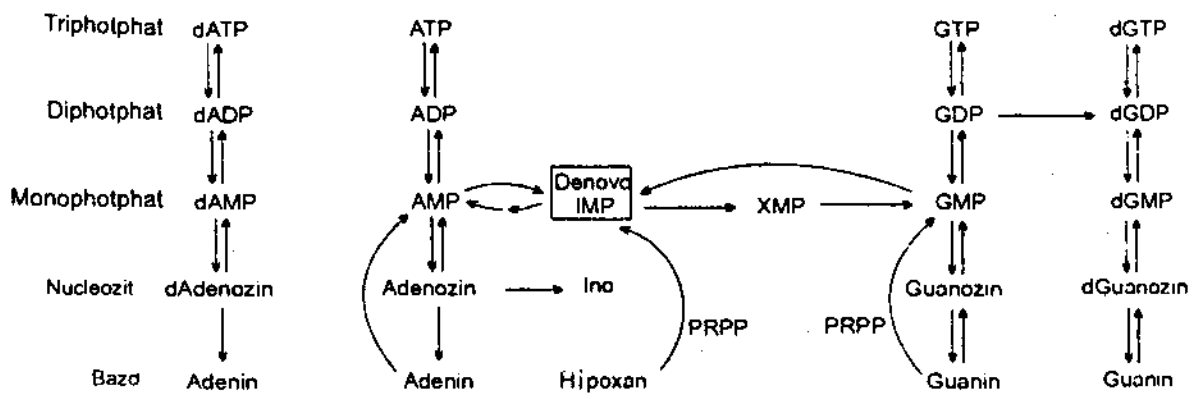
dTMP = deoxi-timidin 5'-monophotphat = deoxi-timidilat
= Timidin 5'-photphat



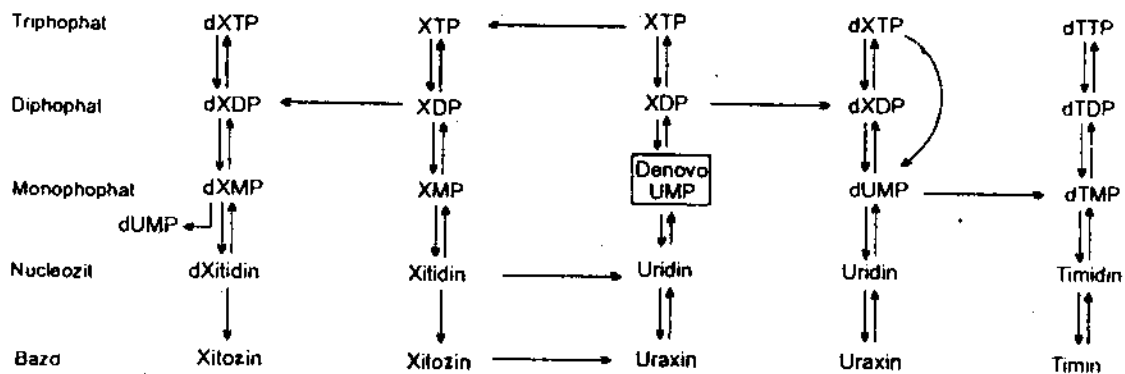
Chu trình các phản ứng trong quá trình tổng hợp dTMP từ dUMP



Chu trình các phản ứng trong quá trình tổng hợp dTTP và dXTP

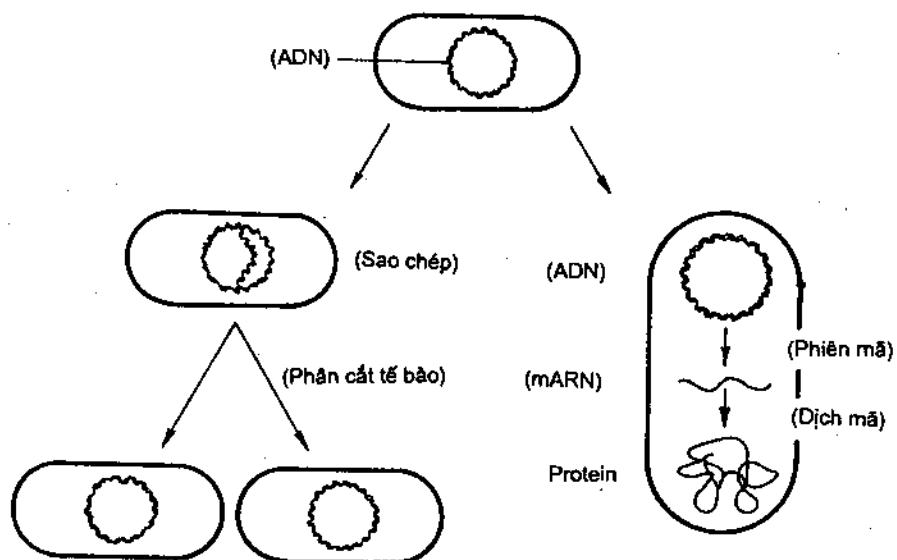


Sự chuyển hóa lẫn nhau của các purin nucleotit và các dẫn xuất của chúng

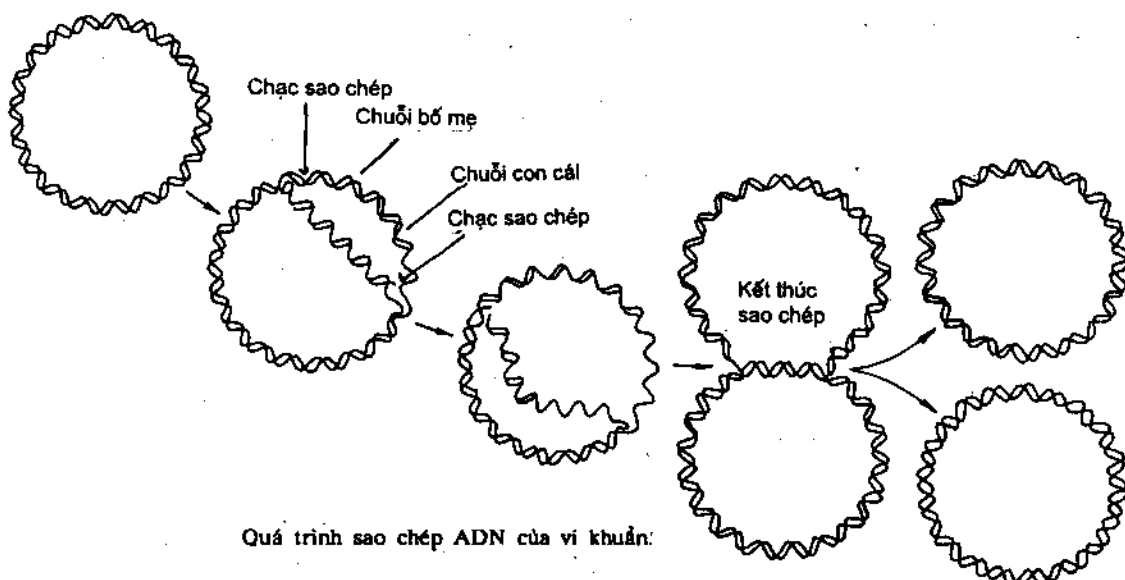
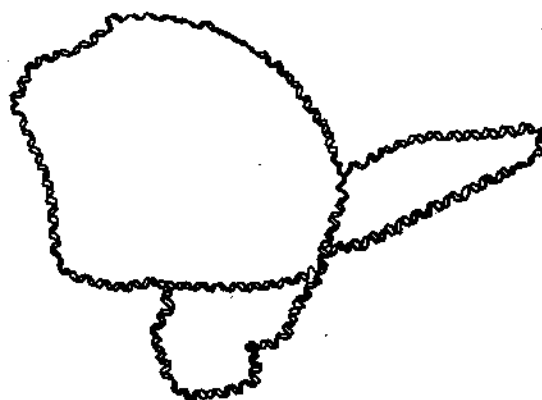
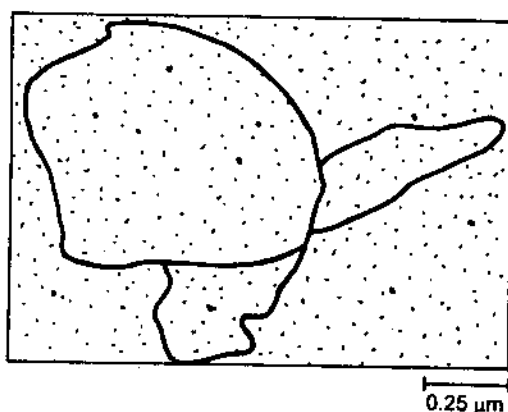


Sự chuyển hóa lẫn nhau của các pirinmidin nucleotit và các dẫn xuất của chúng

1.2.2. Tổng hợp các axit nucleic (xem chương 9, mục 1 và 2)

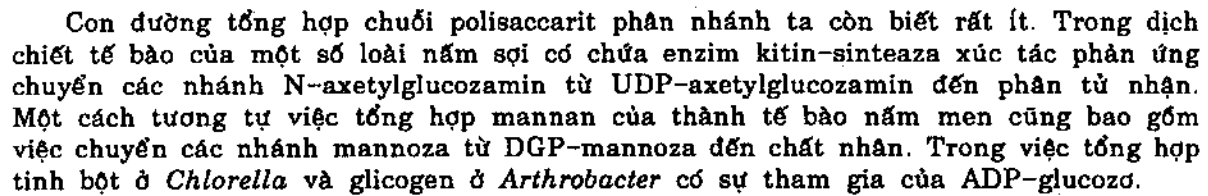


Hai con đường chuyển thông tin di truyền. Chuyển qua thể hệ con cháu nhờ sao chép và chuyển từ nhiễm sắc thể tới riboxom để tổng hợp ra protein nhằm duy trì sự sống và sinh trưởng



84-1087
44807

Tất cả các oligo và polisaccarit được tổng hợp bằng cách kéo dài chuỗi saccarit có trước nhờ việc thêm đơn vị monosaccarit (X). Đơn vị monosaccarit này tham gia vào phản ứng ở dạng nucleotit - monosaccarit được hoạt hóa, thường là dẫn xuất của uridin - diphosphat (UDP.X) nhưng đôi khi cùng với các nucleotit purin và pirimidin khác. Sự tổng hợp diễn ra theo phản ứng chung như sau :



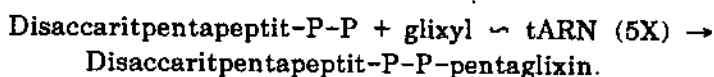
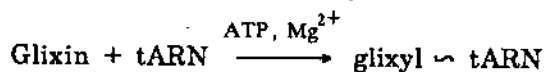
1.4. Tổng hợp murein và axit teichoic

1.4.1. Tổng hợp murein (hoặc glicopeptit, peptidoglican)

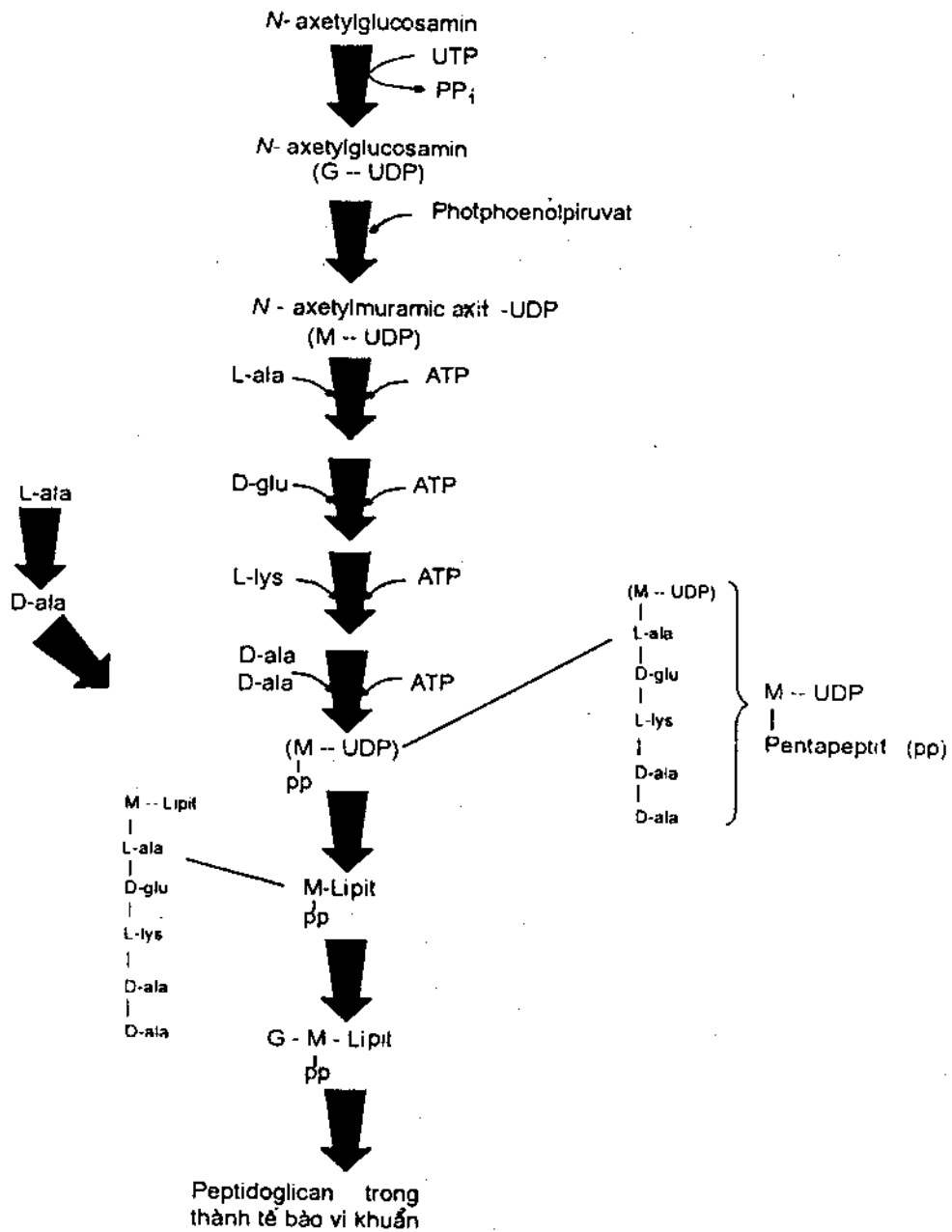
Murein là thành phần chủ yếu của thành tế bào vi khuẩn. Quá trình sinh tổng hợp chất này mới chỉ được nghiên cứu ở một số chủng vi khuẩn trước hết là *Staphylococcus aureus* và *Micrococcus lysodeikticus*. Con đường sinh tổng hợp murein ở *St. aureus* được trình bày ở hình vẽ. Bước đầu là việc tổng hợp UDP-N-axetylglucozamin (UDP-AG) và pentapeptit của UDP-N-axetylmuramic (UDP-AM). Các axit amin của phần pentapeptit được gắn từng nhánh một vào UDP-N axetylmuramic. Đáng chú ý là ở đây không có sự tham gia của ARN vận chuyển. Thứ tự của các axit amin trong pentapeptit là do các enzym xúc tác việc gắn axit amin quyết định. Hệ thống các enzym này có tính đặc hiệu không tuyệt đối, vì vậy có thể bị "đánh lừa" mà lắp nhầm axit amin. Điều này giải thích ảnh hưởng có hại của glixin và các axit D-amin khác lên tổng hợp thành tế bào ở vi khuẩn.

Sau đó các nhánh UDP-N-axetylglucozamin và N-axetyl-muramic - pentapeptit được liên kết với nhau theo một thứ tự xác định thành glicopeptit. Trong quá trình này có sự tham gia của một chất chuyển đặc biệt có tính chất lipid. Ở *Micrococcus lysodeikticus* chất chuyển đó là rượu undeonprenilic. Pentapeptit của N-axetylmuramic được liên kết nhờ cầu nối pyrophosphat với chất chuyển lipid và phản ứng với UDP-N-axetylglucozamin cho ta disaccaritpeptit vẫn còn gắn với chất chuyển.

Ở *S. aureus*, murein của thành tế bào chứa các cầu glixin giữa các peptit. Cho nên ở vi khuẩn này, trước khi nhánh disaccaritpentapeptit được lắp vào glicopeptit thì chuỗi pentaglixin được liên kết với nhóm ϵ - amin của lizin trong chuỗi peptit. Khác với tổng hợp pentapeptit, việc tổng hợp chuỗi pentaglixin có sự tham gia của một trong hai ARN vận chuyển glixin trong tế bào (tARN kia chỉ vận chuyển glixin trong tổng hợp protein) và các nhánh glixin được lắp từng cái một vào disaccaritpentapeptit :



Các cầu pentaglixin chỉ đóng lại sau khi disaccaritpentapeptit được lắp vào glicopeptit. Phản ứng đóng cầu này đi kèm với sự mất nhánh D-alanin cuối cùng của pentapeptit và được xúc tác bởi enzym transpeptidaza. Hàng loạt chất kháng sinh ảnh hưởng đến các bước khác nhau trong chuỗi phản ứng tổng hợp murein.



Sơ đồ quá trình sinh tổng hợp peptidoglican ở vi khuẩn

Các chất kháng sinh β -lactam penixilin và xephalosporin là những dipeptit vòng của L-xittein và D-valin. Do đó chúng là chất tương tự về cấu trúc với D-alanyl-D-alanin ở đầu chuỗi peptidoglican nằm trong phản ứng chuyển peptit. Liên kết cố hoạt động cao $\text{-}\overset{\text{N}}{\underset{\text{||}}{\text{C}}}\text{-N-}$ trong vòng β -lactam nằm đúng vào vị trí của liên kết peptit trong phản

ứng chuyển peptit. Penixilin (hoặc xephalosporin) đã cạnh tranh với đầu Dialanyl-D-alanin trên vị trí liên kết cơ chất của transpeptidaza.

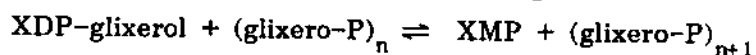
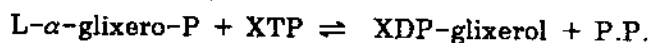
D-Xicloxerin là chất tự cạnh tranh của men alaninraxemaza xúc tác việc tạo thành D-alanin từ L-alanin. Baxitraxin là chất kháng sinh polipeptit kìm hãm phản ứng tách photphat vô cơ khỏi chất chuyển lipid. Ristoxetin và vancomixin ngăn cản việc chuyển disacaritpentapeptit từ chất chuyển lipid đến glicopeptit. Ngoài các chất kháng sinh ra một số khác cũng ảnh hưởng đến quá trình tổng hợp thành tế bào.

Chẳng hạn violet gentian kìm hãm sự liên kết của L-alanin và các axit amin khác vào axit muramic. Glixin thừa trong môi trường có thể phá hủy việc tạo thành các cấu glixin. Việc tổng hợp peptidoglican có lẽ dưới sự điều chỉnh của một cơ chế nào đấy ; khi môi trường thừa glixin hoặc các axit D-anim (như D-xerin) cơ chế trên bị kiểm chế.

1.4.2. Tổng hợp axit teichoic

Axit teichoic là các cao phân tử được phosphorin hóa của ribitol hoặc glixerol và thường liên kết với peptidorin-glican nhờ một cấu nối photphodiester yếu qua nhánh ribozo tận cùng.

Bước thứ nhất trong sinh tổng hợp của axit glixerolteichoic trong *B. licheiformis* là hoạt hóa L- α -glixerophotphat nhờ XTP. Tiền chất được hoạt hóa (XDP-glixerol) được gắn vào cao phân tử như sau :

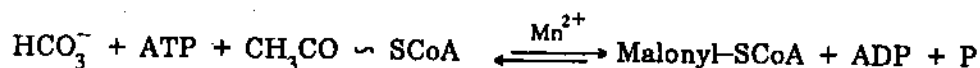
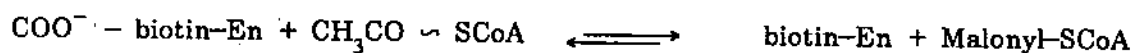
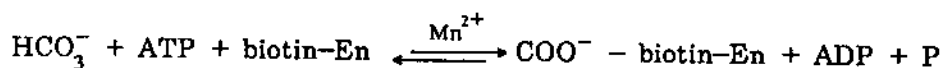


Các chuỗi poliribitolphotphat cũng được tạo thành theo một con đường tương tự, nhưng với XDP-ribitol là chất trung gian.

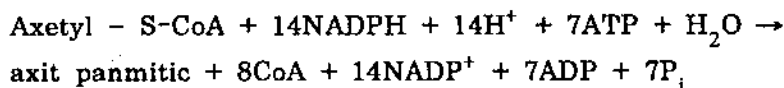
1.5. Tổng hợp các axit béo và lipid

Trong vi khuẩn và mô động vật có vú, việc tổng hợp các axit béo no, chẵn, chuỗi dài đều diễn ra theo cùng con đường : con đường malonyl-CoA. Malonyl-CoA, chứa nhóm -CH_2 rất hoạt động, dễ dàng phản ứng với axit.CoA (nghĩa là với axetyl-CoA hoặc một axit béo cao hơn được hoạt hóa) và sau khi loại đi CO_2 thì cho một β -ketoaxit. Các bước khác, về thực chất, diễn ra như quá trình β -oxi hóa nghịch trong đó tham gia vào việc khử β -ketoaxit và dẫn xuất chưa no của axit-CoA, là NADPH. Quá trình được lặp lại nhiều lần.

Bước đầu, cacboxyl hóa axetyl-CoA thành malonyl-CoA, được xúc tác bởi một enzym đặc biệt chứa biotin đó là axetyl-CoA-cacboxylaza (đã được phân lập từ vi khuẩn, nấm men và gan bò câu).



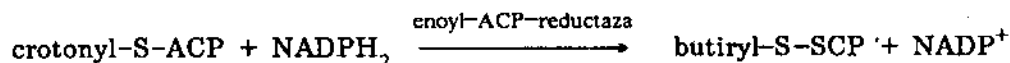
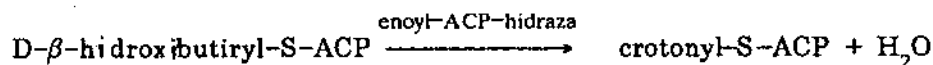
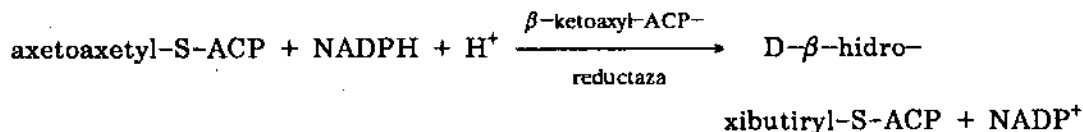
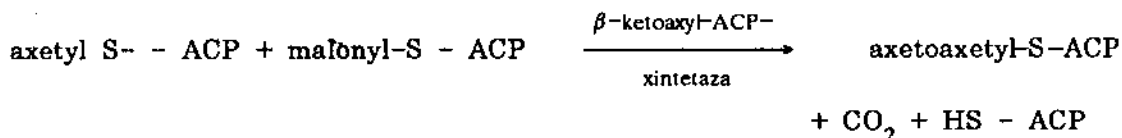
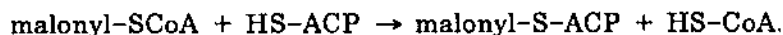
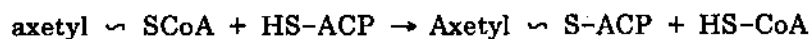
Sintetaza của axit béo (hệ thống tổng hợp axit béo trong vi sinh vật và mô động vật là những phức hợp enzym hòa tan trong tế bào chất xúc tác phản ứng chung tổng hợp axit panmitic :



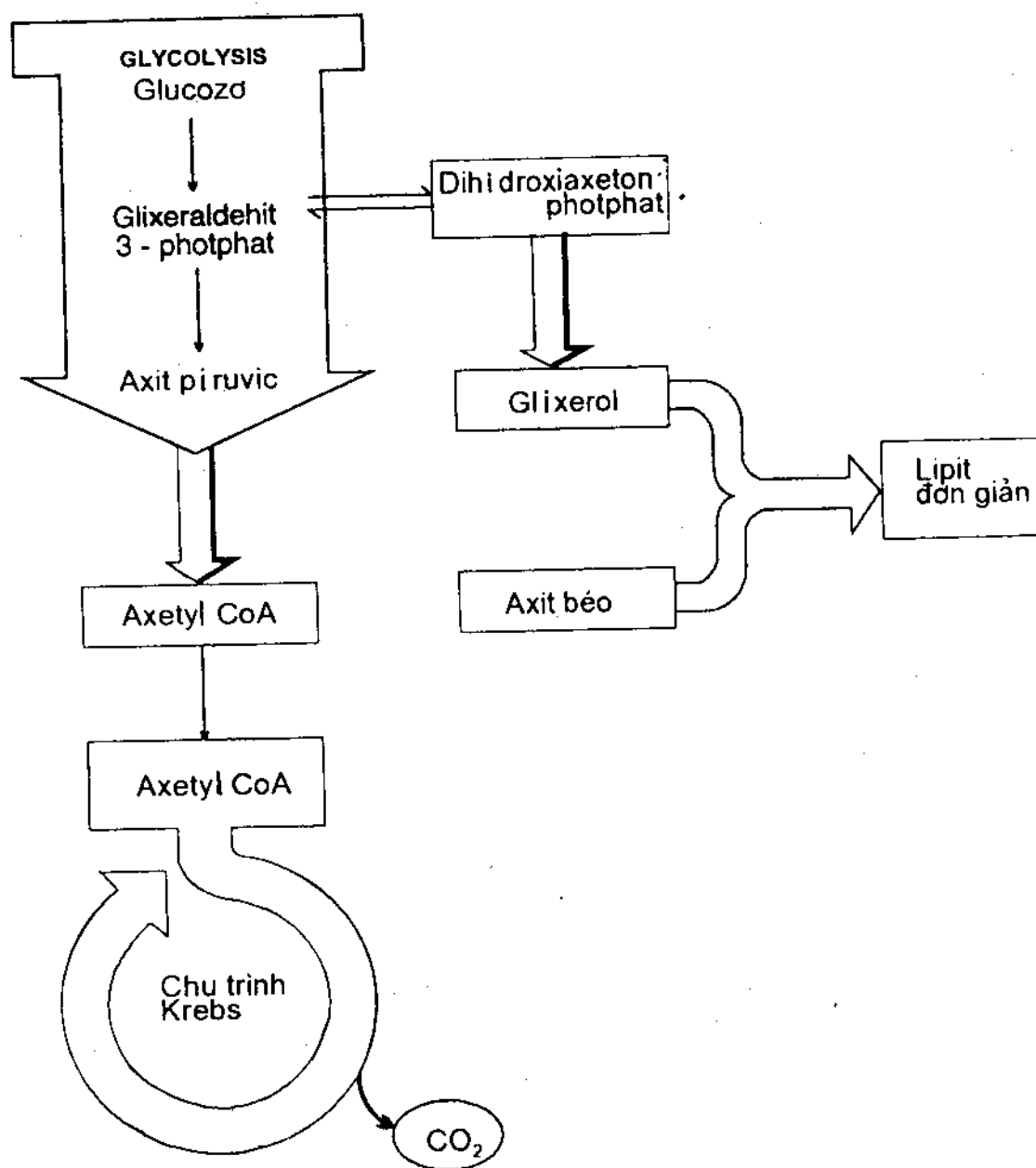
Phức hợp đã được phân lập từ nấm men trên đó diễn ra liên tục toàn bộ sự tổng hợp. Quá trình mở đầu bằng việc chuyển nhánh malonin đến nhóm SH hoạt động của protein (chuyển lần thứ nhất). Malonyl-S-CoA sẽ ngưng tụ với axetyl ~ SCoA (hoặc axil ~ CoA cao hơn) tạo thành dẫn xuất của β -ketoaxit còn gắn vào nhóm SH. Các phản ứng tiếp theo là khử β -ketoaxit thành hợp chất hidroxy, loại nước và khử lần thứ hai trong đó có sự tham gia của FMN gắn chặt vào phân tử men (FMN nhận hidro từ NADPH).

Phân tử kéo dài của axit béo lại được chuyển đến CoA để chuẩn bị ngưng tụ tiếp. Một nhánh malonin mới được gắn vào nhóm SH-trung tâm và phản ứng lại tiếp diễn. Chỉ sau khi chuỗi đã đạt được chiều dài 16 hoặc 18 nguyên tử cacbon palmitol-CoA (hoặc stearyl-CoA) mới tách ra.

Vagelos (1967) đã phân lập được từ *E.coli* 5 trong số 6 enzym xúc tác việc chuyển axetyl-CoA và malonyl-CoA thành axit béo. Mỗi enzym đều cần một protein đặc biệt gọi là protein mang nhánh axit ACP (acyl carrier protein). Nhóm thêm của CCP là 4'phosphopantetein liên kết tioeste với nhánh axyl và liên kết photpho dieste với nhóm OH của một trong ba nhánh xerin trong ACP. Các phản ứng diễn ra như sau :

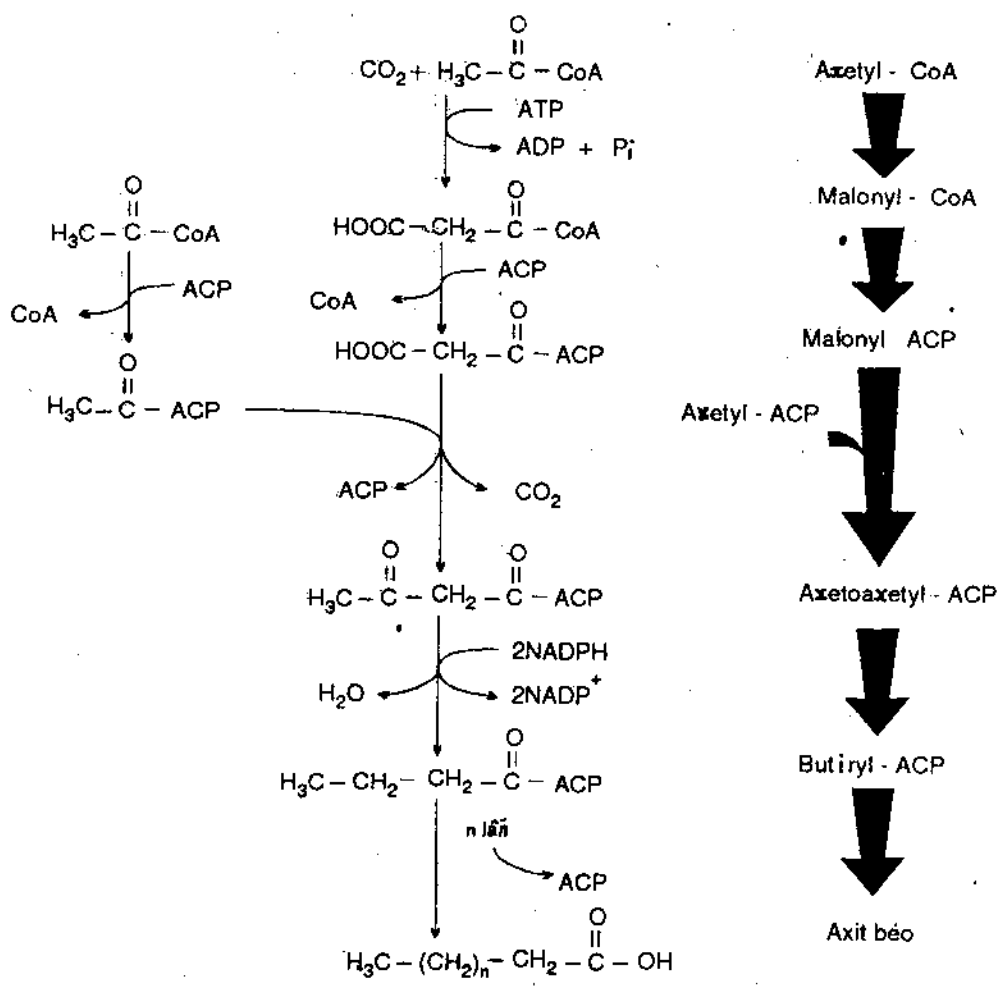


ACP tham gia trong việc tổng hợp axit béo ở cả vi khuẩn và thực vật. Đáng chú ý là chỉ có một ACP nhận axetyl hay malonyl.

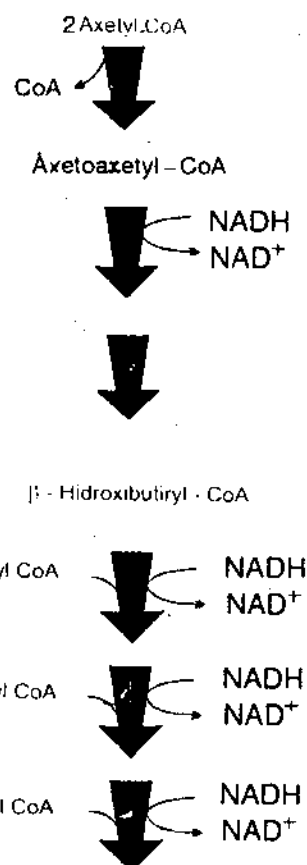
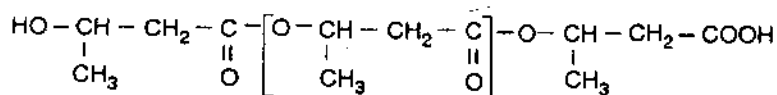
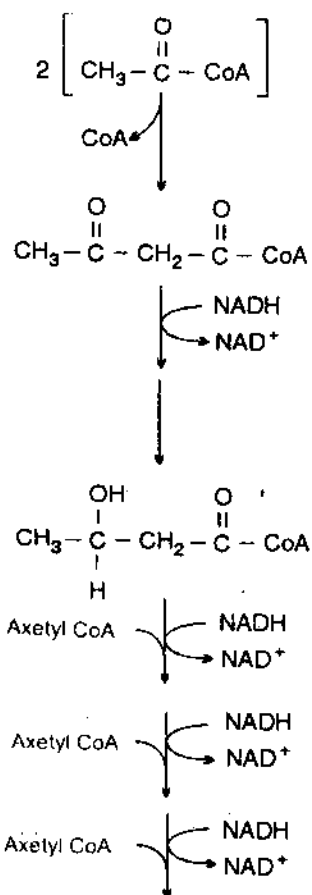


Sơ đồ sinh tổng hợp lipid

178.178.

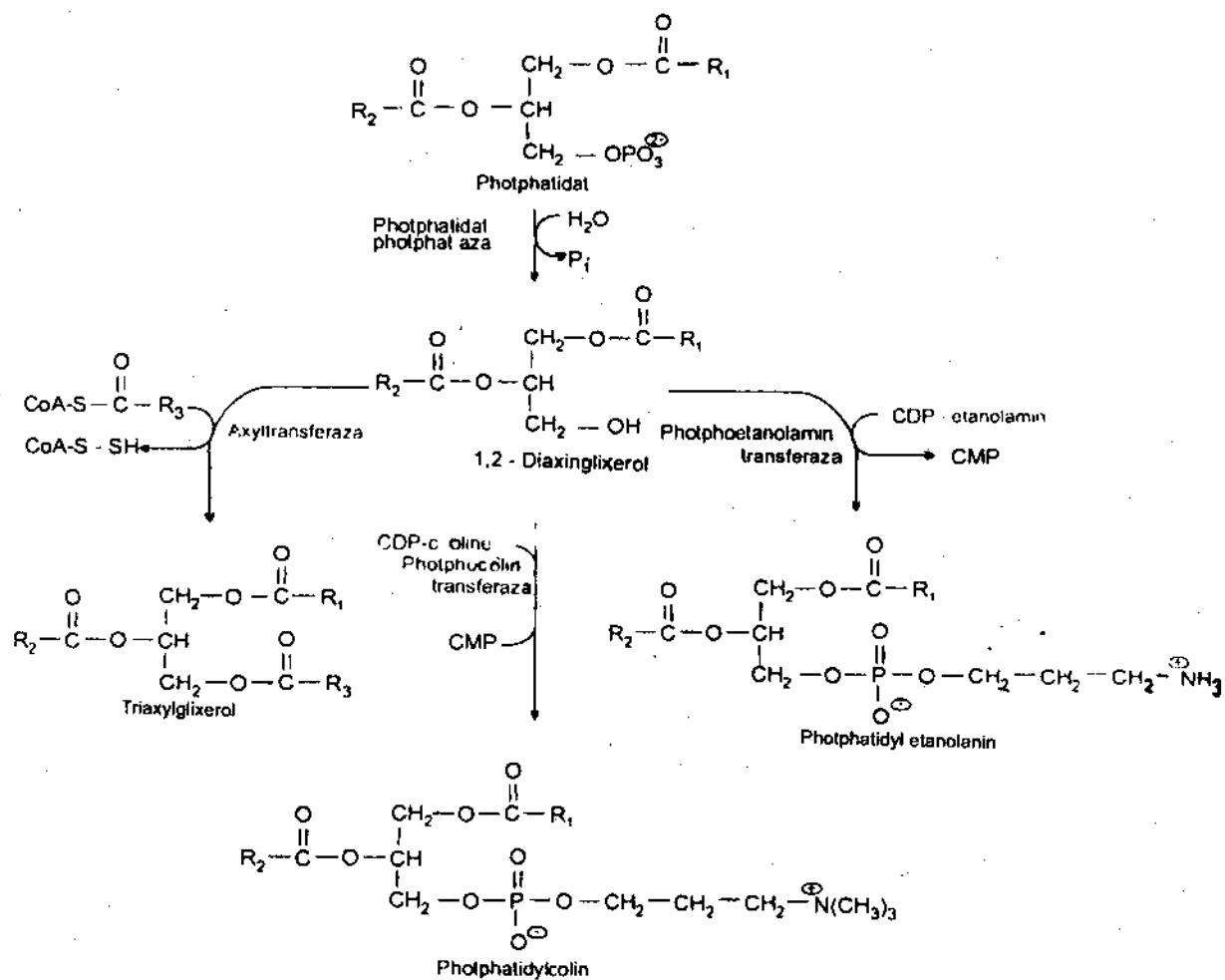


Sơ đồ sinh tổng hợp axit béo



Poli- β -axit hidroxitubiric

Sơ đồ sinh tổng hợp axit poli- β -hidroxitubiric



Sơ đồ sinh tổng hợp các lipid trung tính

1.6. Tổng hợp protein (sự dịch mã = translation)

Quá trình dịch thông tin di truyền từ ADN đến protein trải qua hai chặng, tổng hợp ARN (phiên mã) và tổng hợp protein (dịch mã). Toàn bộ quá trình, về cơ bản, diễn ra rất giống nhau trong cả hai bọ Prokaryota và Eukaryota.

Tuy nhiên đối tượng được nghiên cứu kĩ nhất vẫn là vi khuẩn, đặc biệt là *E. coli*. Mặc dù sản phẩm của quá trình phiên mã là cả ba loại ARN nhưng thông thường danh từ này dùng cho việc tổng hợp mRNA vì phần lớn genom đọc mã cho mRNA (chỉ 0,2 và 0,02% ADN tham gia vào việc tạo thành rARN và tARN).

Chặng phiên mã đã được nói ở trên, dưới đây chỉ đề cập đến chặng dịch mã.

Tổng hợp protein diễn ra trên các hạt riboxom. Các axit amin trong tế bào chất được hoạt hóa nhờ liên kết với tARN tương ứng và được chuyển tiếp phức hợp riboxom-ARN. Ở đây, liên kết peptit và do đó chuỗi polipeptit sẽ được hình thành.

1.6.1. Riboxom

Ở *E. coli* riboxom là những hạt nucleoprotein chứa 35 - 40% protein và 60 - 65% axit ribonucleic. Trong vi khuẩn riboxom tồn tại chủ yếu ở dạng tự do trong tế bào chất nhưng trong tế bào Eukaryota phần lớn riboxom gắn vào màng lưới nội chất, một phần nhỏ chứa trong các ti thể và lục lạp. Tùy theo hệ số lắng khi siêu li tâm riboxom được chia thành hai loại : riboxom 70S gặp trong cơ thể bọ Prokaryota (vi khuẩn, vi khuẩn lam) và trong các plastit (ti thể, lục lạp), riboxom 80S tồn tại trong tế bào chất của các cơ thể bọ Eukaryota. Cả hai loại đều cấu tạo bởi hai hạt dưới đơn vị, hạt nọ lớn gần gấp đôi hạt kia. Tuy nhiên đơn vị hoạt động thực sự trong tổng hợp protein không phải là các monoxom 70S riêng rẽ mà là một nhóm riboxom (gọi là polixom) liên kết cạnh nhau vào cùng một sợi mRNA. Trong tế bào vi khuẩn đang sinh trưởng riboxom trải qua một chu trình đều đặn phân li và tái tạo tùy theo nồng độ ion Mg^{2+} : $70S \rightleftharpoons 30S + 50S$. Một số chất kháng sinh kìm hãm chu trình này. Chẳng hạn, trong sự có mặt của streptomycin và neomycin tế bào sẽ tích lũy một lượng lớn monoxom 70S. Những monoxom này tuy vẫn còn gắn với mRNA, nhưng mất khả năng tổng hợp protein riboxom 70S chứa 55 phân tử protein : 21 phân tử trong hạt 30S (S1 - S21) và 34 phân tử trong hạt 50S (L1 - L34). (Thực ra, hai protein S20 và L26 là giống nhau hoàn toàn và được đọc mã bởi cùng một gen. Do đó tổng số các protein khác nhau trong riboxom 70S chỉ là 54). Tổng lượng phân tử của các protein riboxom ở trong khoảng 7000 - 32.000 (trung bình khoảng 17.000), trừ protein S_1 có khối lượng phân tử cao đặc biệt : 65.000.

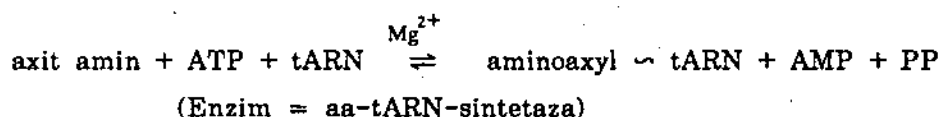
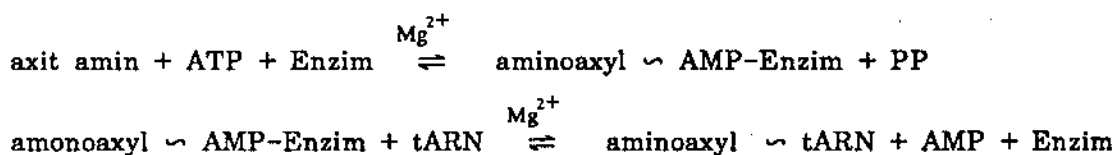
Về axit ribonucleic, riboxom 70S của *E. coli* chứa 3 phân tử rARN : hạt 30S chứa rARN 16S (\sim 1600 nucleotit) và hạt 50S chứa rARN 23S (\sim 3200 nucleotit) và rARN 5S (120 nucleotit).

Ở tế bào Eukaryota riboxom 80S chứa khoảng 70 loại protein và 4 phân tử rARN : hạt 40S chứa rARN 18S, hạt 60S chứa 3 phân tử rARN là 28S, 5S và 5,8S. Trong mỗi hạt dưới đơn vị phân tử rARN tạo thành cái khung quanh đó các phân tử protein được tập hợp lại.

Trên riboxom ít nhất có hai vị trí gắn tARN : vị trí A là vị trí gắn aminoacyl - tARN (aa - tARN) và vị trí P là vị trí gắn peptidyl - tARN (pept - tARN). Quá trình tổng hợp protein diễn ra ở mặt tiếp xúc giữa hai hạt dưới đơn vị.

1.6.2. Sự hoạt hóa axit amin

Trước khi tham gia vào tổng hợp protein axit amin phải được hoạt hóa, nghĩa là được liên kết với một tARN tương ứng. Chỉ sau đó axit amin này mới được chuyển đến riboxom. Quá trình hoạt hóa axit amin diễn ra qua hai bước. Trước hết axit amin phản ứng với ATP tạo thành phức hợp cao năng axit amin ~ AMP. Tiếp theo, axit amin trong phức hợp được chuyển đến tARN tương ứng. Cùng một enzym axit amin-tARN-sintetaza, đặc trưng đối với mỗi axit amin, đã xúc tác cả hai bước nói trên.



Rõ ràng enzym phải có các vị trí nhận đối với cả axit amin và tARN.

1.6.3. ARN vận chuyển

Là loại ARN có khối lượng phân tử thấp (khoảng 25.000) và có hệ số lắng khoảng 4S - 5S chỉ chứa chừng 75 - 80 nucleotit (do đó còn được gọi là ARN hòa tan). Điều đáng chú ý là tất cả tARN được nghiên cứu cho tới nay phân lập từ các tế bào của bốn Nhân nguyên thủy và Nhân thật đều có một cấu trúc tương tự theo mẫu là chế ba.

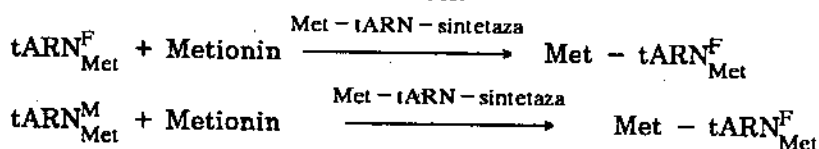
Khác với các loại ARN, phân tử tARN chứa tới 10 - 20% bazơ hiếm, không bình thường. Mặc dù là sợi polinucleotit đơn nhưng do gấp trở lại mà tARN chứa nhiều cặp bazơ ghép đôi ở những phần cuống của mỗi thùy. Do nguyên nhân này và do hàm lượng lớn các bazơ hiếm nên tARN khá bền với tác dụng của ribonucleaza. Các bazơ hiếm thường ở những phần không có bazơ ghép đôi của các thùy. Chúng là các bazơ bị cải biến do các enzym đặc biệt sau khi tARN được ghi từ khuôn. Có khoảng 50 gen đọc mã cho tARN nghĩa là chừng một gen cho mỗi loại tARN.

Khi ghi từ khuôn ADN các phân tử tARN còn chứa 20 nucleotit bổ sung, sau đó bị loại đi nhờ những phản ứng enzym. Có thể những nucleotit này là bản sao của một phần ADN đóng vai trò trong việc kích thích quá trình phiên mã (nghĩa là một vùng dùng làm điểm gắn của ARN-polimeraza và kích thích hoạt tính của enzym này). Một sự cải biến nữa đối với tARN trước khi chúng trở thành dạng hoạt động là tất cả tARN đều có thứ tự tận cùng XXA ở đầu 3'. Chính axit amin được gắn vào vị trí C₃ của adenosin này.

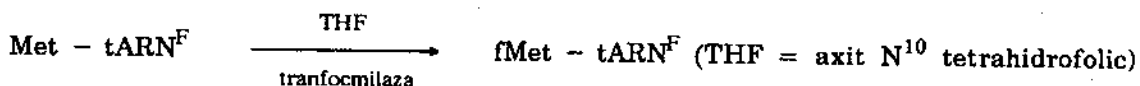
Điều đáng chú ý là trong hệ thống nhân nguyên thủy cũng như nhân thật, axit amin mở đầu chuỗi polipeptit luôn luôn là metionin. Trong tế bào của cả hai bọn đều có chứa hai loại tARN tương ứng đặc biệt vận chuyển metionin: một, chuyển axit vào vị trí giữa chuỗi và một, vận chuyển axit amin mở đầu chuỗi. Ở vi khuẩn (cả vi khuẩn lam, ti thể, lục lạp), metionin mở đầu chuỗi sau khi gắn với tARN tương ứng,

phải được focmyl hóa rồi mới được chuyển đến riboxom, chất cho nhánh focmyl là axit N^{10} - tetrahydrofolic.

Do đó hai loại tARN mang metionin ở hệ thống riboxom 70S được kí hiệu là $tARN_{Met}^F$ và $tARN_{Met}^M$. Cùng một enzym Met - tARN sintetaza nhận ra một vùng cấu trúc chung của metionin và $tARN_{Met}$ đã gắn metionin vào cả $tARN_{Met}^F$ và $tARN_{Met}^M$:



Nhưng sau đó chỉ metionin gắn vào $tARN^F$ được focmin hóa, phản ứng được xúc tác bởi enzym transfofocmilaza



ở thù đối diện với cuống mang axit amin có ba bazơ tự do gọi là anticodon. Ba bazơ của anticodon sẽ ghép đôi với ba bazơ tương ứng trên sợi mARN liên kết với riboxom: ba bazơ tương ứng này gọi là codon.

1.6.4. Các bước tổng hợp protein

Mở đầu chuỗi: Ngay khi sợi mARN còn đang sinh trưởng và chưa tách khỏi sợi khuôn ADN thì hạt riboxom 30S đã lần lượt gắn vào sợi mARN và mở đầu tổng hợp protein.

Trong vi khuẩn, tham gia vào mở đầu chuỗi polipeptit ngoài các thành phần khác, đặc biệt còn có GTP và ít nhất 3 yếu tố protein gọi là yếu tố mở đầu, kí hiệu là IF - 1; IF - 2 và IF₃ (IF = initiation fator) với khối lượng phân tử lần lượt là 9400; 80.000 - 90.000 và 21.000 - 23.000. Cả ba yếu tố đều là những chuỗi polipeptit duy nhất.

Yếu tố IF - 3 gắn vào hạt 30S và cần cho sự hình thành phức hợp mở đầu với sợi mARN tự nhiên do làm bền sự liên kết của mARN vào hạt 30S với codon mở đầu AUG (hoặc GUG) của mARN ở vị trí P. Tham gia vào quá trình này đặc biệt còn có protein S1.S1 nằm ở đầu 3' của rARN 16S vào đầu 5' của mARN nơi diễn ra mở đầu dịch mã. Chức phận của S₁ là cởi xoắn đầu 3' của rARN 16S khiến cho thứ tự AXUX XX của ARN này được tự do và có thể ghép đôi với thứ tự bổ sung UGGAGG ở vùng mở đầu của 5' trên mARN, điều này cần cho việc liên kết chính xác của mARN vào 30S.

Tiếp theo, aa - tARN mở đầu chuỗi - fMet - $tARN_{Met}^F$ - gắn vào phức hợp nói trên ở vị trí P tương ứng với codon mở đầu AUG. Sự liên kết này cần GTP và hai yếu tố IF - 1 và IF - 2 trong đó IF - 2 có lẽ nhận ra và kích thích sự liên kết của fMet - tARN và riboxom 30S còn IF - 1 chỉ làm bền phức hợp. (Có thể IF - 1 là một protein của bản thân riboxom 30S hơn là một yếu tố mở đầu). Sự liên kết của phức hợp [fMet - tARN - GTP - IF - 1 - IF - 2] vào phức hợp [30S - mARN] còn cần một số protein của 30S (S2, 3, 10, 12, 14, 19, 21). Sau đó hạt 50S gắn vào tạo thành phức hợp mở đầu [mARN - 70S - fMet - tARN]. Bây giờ GTP bị thủy phân nhờ trung tâm GTP - aza (guanozin - triphosphataza) tạo thành bởi yếu tố IF - 2 và một số protein của 50S (L5, 19, 20, 25, 30). Năng lượng của sự thủy phân GTP cần cho việc đặt chính xác tARN ở vị trí P. GDP và các yếu tố IF - 1, IF - 2 được tách khỏi riboxom.

Kéo dài chuỗi : Việc thêm một axit amin vào chuỗi polipeptit là một quá trình nhiều bước. Trong *E.coli*, tham gia vào quá trình này ngoài những thành phần khác còn có hai yếu tố protein gọi là yếu tố kéo dài : EF - T (từ chữ Anh : EF = elongation factor, T = transfer) là yếu tố liên kết và EF - G có hoạt tính của GTP - aza. EF - G là một protein duy nhất nhưng EF - T gồm hai thành phần : EF - Ts bền nhiệt (s = stable nghĩa là bền) và EF - Tu không bền nhiệt (u = unstable nghĩa là không bền)⁽¹⁾.

(EF-Ts có khối lượng phân tử 30.000 (ở *E.coli*) hoặc 37.000 (ở *Bacillus stearothermophilus*) còn EF - Tu có khối lượng phân tử 42.000 (ở *E.coli*) ; hoặc 48.000 (ở *Bacillus stearothermophilus*). EF - G có khối lượng phân tử 80.000 - 90.000. Trong tế bào *E.coli* đối với mỗi riboxom có một phân tử của EF - T và một phân tử của EF - G.

Quá trình kéo dài chuỗi diễn ra như sau :

Sau khi fMet - tARN đã ở vị trí P của riboxom 70S thì axit amin thứ hai ở dạng aa₂ - tARN, liên kết với yếu tố EF - Tu và GTP được chuyển đến vị trí A với codon tương ứng. GTP lại bị thủy phân thành GDP giải phóng ra năng lượng cần cho việc đặt chính xác aa₂ - tARN ở vị trí A. Tham gia vào sự kiện liên kết của phức hợp [aa₂ - tARN - EF - Tu - GTP] ở vị trí A ngoài một số protein của hạt 30S (S3, 9, 11, 14, 18, 19, 21) còn có rARN 5S (nhờ sự liên kết bổ sung thứ tự tetranucleotit AAGX trên rARN 5S cũng cùng với các protein L5, 18, 25, 30 tạo thành trung tâm GTP - aza. Các protein S11, S12 thì có vai trò trong việc nhận ra mối quan hệ codon - anticodon, cần thiết cho sự liên kết chính xác của aa - tARN ở vị trí A. Liên kết peptit thứ nhất được hình thành bằng cách chuyển nhóm - COOH của fMet - tARN ở vị trí P sang nhóm NH₂ của aa₂ - tARN ở vị trí A. Phản ứng được xúc tác bởi trung tâm peptit transferaza (PT - aza) chứa enzym PT - aza (protein L11) và một số protein của vị trí A (các protein L6 và L16) và vị trí P (các protein L1, 4, 27). Sau đó fMet - aa₂ - tARN được chuyển chỗ từ vị trí A về vị trí P, đồng thời riboxom trượt trên sợi mARN chiều dài một codon. Năng lượng cần cho sự chuyển chỗ là do phản ứng thủy phân GTP xúc tác bởi trung tâm GTP - aza bao gồm yếu tố EF - G và một số protein của hạt 50S tARN tự do (trước đó mang nhánh fMet) bị đẩy khỏi vị trí trên riboxom ra ngoài.

Toàn bộ quá trình kéo dài diễn ra sau đó đều lặp lại các bước như trên. Nghĩa là, việc thêm một axit amin mới vào chuỗi polipeptit đang sinh trưởng cần :

- Sự liên kết vào riboxom của một aa - tARN ở vị trí A.
- Việc tạo thành liên kết peptit giữa nhóm -COOH của pept - tARN và nhóm NH₂ của aa - tARN.
- Việc chuyển chỗ của pept - tARN từ vị trí A về vị trí P.

Kết thúc chuỗi : Quá trình tổng hợp chuỗi polipeptit kết thúc khi riboxom, trong lúc trượt lên sợi mARN, gặp một trong ba codon kết thúc hoặc codon vô nghĩa (codon không đọc mã cho một axit amin nào) ở vị trí A : UAA (ochre), UAG (amber) và UAQ (Opal) trong đó codon UAA là codon kết thúc phổ biến. Sự thủy phân của pept - tARN và sự giải phóng của chuỗi protein khỏi riboxom cần một số yếu tố protein gọi là yếu tố tách rời : RF - 1 nhận ra hai codon UAA và UAG, RF - 1 nhận ra hai codon UAA và UGA. Một yếu tố thứ ba, RF - 3, và GTP cũng kích thích các quá trình trên (RF = release factor). Khối lượng phân tử của ba yếu tố RF lần lượt là 44.000, 47.000 và 46.000. Sự phân hủy tARN khỏi chuỗi protein có lẽ cũng được xúc

(1) Hai yếu tố này cũng là các dưới đơn vị của replicaza ở thể thực khuẩn Q. β

tác bởi men peptidyltransferaza. Có thể, dưới tác dụng của các yếu tố tách rời nhận ra codon kết thúc, peptidyltransferaza giải phóng chuỗi polipeptit. Ngoài ra, tham gia vào sự liên kết riboxom của các yếu tố tách rời và vào sự thủy phân pept - tARN còn có một số protein của riboxom (S9, S11 ; L7, L12, và L16). Cuối cùng mARN cũng bị phân giải bởi ribonucleaza, còn riboxom bị phân li thành các hạt dưới đơn vị 50S nhờ yếu tố IF - 3. Như vậy IF - 3 vừa có vai trò trong sự liên kết mARN vào riboxom 30S vừa có chức năng phân li riboxom 70S. Cả hai hoạt tính này, rõ ràng đều cần cho bước mở đầu phiên mã.

Điều đáng chú ý là mặc dù metionin được focmyl hóa (fMet) là axit amin mở đầu chuỗi trong hệ thống riboxom 70S (vi khuẩn lam, ti thể, lục lạp) nhưng, trừ vài trường hợp (như rubredoxin, một protein nhỏ vận chuyển electron trong *C. pasteurianum* hay protein đọc mã bởi ADN dạng nhân đôi của thể thực khuẩn X. 174), các chuỗi polipeptit sau khi tách khỏi riboxom thường không chứa nhánh focmyl thậm chí cả nhánh metionin ở đầu chuỗi. Trong quá trình sinh trưởng, khi chuỗi đạt tới một chiều dài nhất định thì nhánh focmyl và sau đó thường cả nhánh metionin lần lượt bị phân hủy bởi các enzym defocmilaza và aminopeptidaza.

1.6.5. Tổng hợp protein ở tế bào có nhân thật (Eukaryota)

Mặc dù quá trình tổng hợp protein ở hệ thống riboxom 80S và 70S về cơ bản là giống nhau nhưng tổng hợp protein ở tế bào Eukaryota có một số sai khác sau đây :

1. Axit amin mở đầu chuỗi tuy cũng là metionin nhưng không bị focmyl hóa ; do đó tế bào không chứa enzym transfofocmilaza.

2. Trong bước mở đầu Met - tARN được gắn vào hạt 40S trước, sau đó mARN mới được liên kết tiếp vào phức hợp trên.

3. Có tới 6 yếu tố mở đầu gọi là eIF (e = eukaryota) trong đó :

- eIF - 2 tương đương với IF - 2, kích thích Met - tARN mở đầu gắn vào hạt 40S.

- eIF - 2a₁, eIF - 2a₂ và eIF - 2a₃ kích thích sự liên kết của mARN vào phức hợp [Met - tARN - eIF - 2 - GTP - 40S].

- eIF - e, chưa rõ chức năng, không có eIF - 1 (tương đương với IF - 1).

4. Hai yếu tố kéo dài tương ứng là TF - 1 hay EF - 1 (tương ứng với EF - T) và TF-2 hay EF-2 (tương ứng với EF-G).

5. Chỉ có một yếu tố RF : ngoài ra sự liên kết của yếu tố này vào vị trí A chứa codon kết thúc cần GTP. Điều này hoạt hóa trung tâm PT - aza dẫn đến sự thủy phân chuỗi polipeptit khỏi tARN. Sau đó GTP mới bị thủy phân giải phóng ra năng lượng cần cho sự phân li yếu tố RF khỏi riboxom.

Quá trình tổng hợp protein chịu ảnh hưởng của hàng loạt chất kháng sinh và độc tố. Điều đáng chú ý là một số chất kháng sinh tác dụng lên cả hai hệ thống nhân nguyên thủy và nhân thật (axit fusidic, gougerotin, spacersomixin, các tetraxiclin), một số khác lại tác dụng một cách chọn lọc chỉ lên hệ thống vi sinh vật nhân nguyên thủy (cloramphenicol, kasugamixin, lincomixin, erytromixin, streptomixin, gentamixin, canamixin, neomixin) hoặc hệ thống sinh vật Nhân thật (độc tố bạch hầu, actidio, tricoecmin, các alcaloit của *Tylophora*).

Kasugamixin thuộc các chất kháng sinh aminoglicozit (kasugamixin, streptomixin, gentamixin, canamixin, neomixin) nhưng do không có phần dihydrostreptamin hoặc streptamin đặc trưng nên không gây nên hiện tượng độc sai mật mã. Chất kháng sinh này tác dụng lên riboxom 30S, ngăn cản sự liên kết của fMet - tARN^F. Tính kháng

- kasugamixin ở *E.coli* là do sự thiếu methyl hóa của hai nhánh adenin gần nhau trong rARN 16S của hạt 30S. Ngoài ra trong các biến chủng kháng - kasugamixin một protein của ribosom (S4) đã bị thay đổi.

Streptomixin ảnh hưởng lên một số quá trình kể cả tổng hợp protein. Trong tổng hợp protein, từ lâu người ta đã biết hiện tượng đọc sai mật mã do streptomixin gây nên. Chẳng hạn, trong sự cố mật của chất kháng sinh này codon UUU bị đọc sai thành AUU ; kết quả không phải phenylalanin mà là izoloxin được lắp vào chuỗi polipeptit. Vị trí tác dụng của streptomixin là hạt ribosom 30S. Một trong các protein ribosom (S4) đã bị thay đổi trong các biến chủng kháng - streptomixin. Tuy nhiên việc đọc sai mật mã không phải là tác dụng chủ yếu của streptomixin trong tổng hợp protein vì chất kháng sinh này kìm hãm quá trình dịch mã ngay ở pha mở đầu ; phức hợp mở đầu được hình thành trong sự cố mật của streptomixin là không bền và sự liên kết đó của aa - tARN không thể xảy ra. Streptomixin cũng ngăn cản bước kéo dài chuỗi do ảnh hưởng đến phản ứng liên kết của aa - tARN vào vị trí A và bước kết thúc chuỗi do kìm hãm việc nhận ra yếu tố RF - 1 hoặc RF - 2.

Một số chất kháng sinh aminoglicozit khác (như gentamixin, canamixin, neomixin và paromomixin) cũng gây hiện tượng đọc sai mật mã và tác dụng lên ribosom 30S ở hoặc gần vị trí của streptomixin.

Tetraxiclin kìm hãm sự liên kết phụ thuộc vào yếu tố EF - Tu của aa - tARN vào ribosom ở vị trí A và cản trở bước kết thúc chuỗi do ảnh hưởng đến việc nhận ra yếu tố RF.

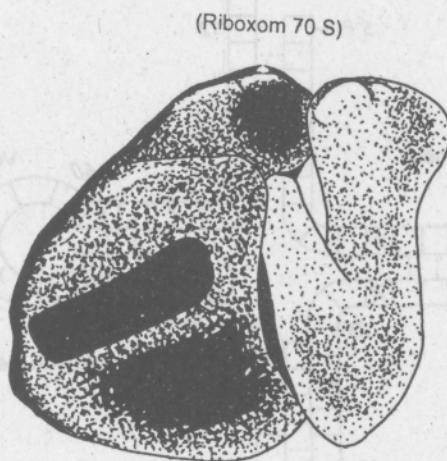
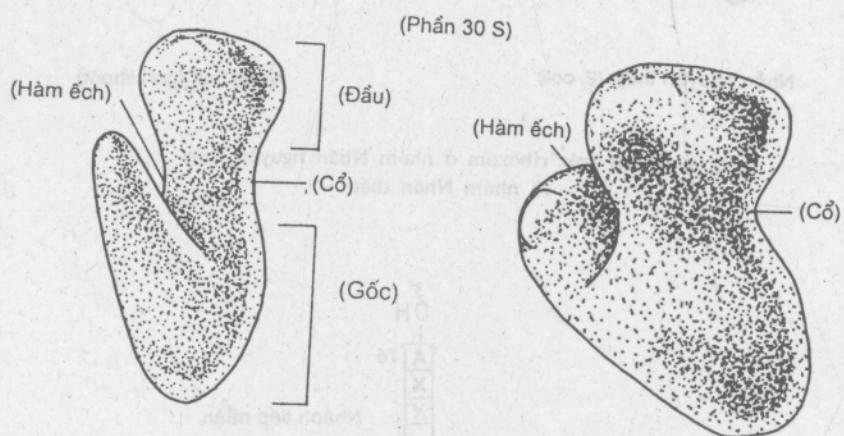
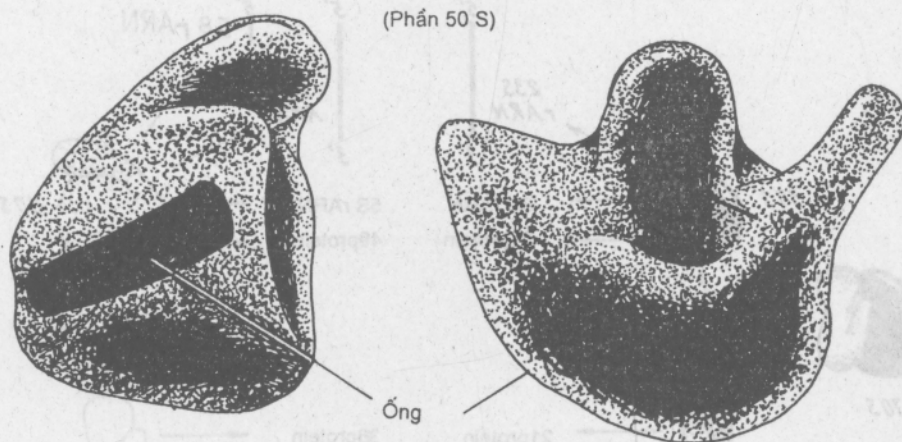
Axit fusidic ngăn cản sự chuyển chỗ và sự thủy phân GTP phụ thuộc vào yếu tố EF - G (và EF -2) do tạo thành phức hợp bền [axit fusidic - GDP - ribosom - EF - G (hoặc EF-2)].

Đặc biệt, puromixin, do có cấu trúc tương tự với phần đầu tận cùng 3' của aa - tARN đã cạnh tranh với aa-tARN trong phản ứng nhận nhánh peptidyl từ pep - tARN. Nhưng vì không có phần anticodon nên sau khi hình thành phức hợp [peptidyl - puromixin] tách khỏi ribosom dẫn đến việc kết thúc sớm quá trình kéo dài chuỗi.

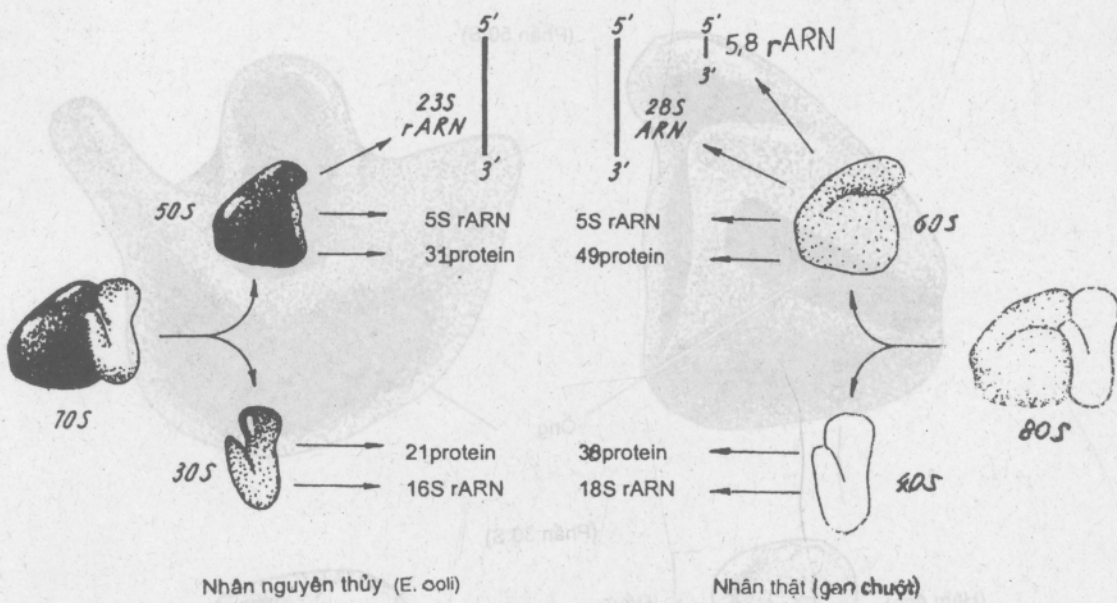
Sự hình thành liên kết peptit ở vi khuẩn bị cloramphenicol kìm hãm vì chất kháng sinh này tác dụng lên trung tâm peptidyl-transferaza. Tương tự có lincomixin. Lincomixin ảnh hưởng đến việc hình thành liên kết peptit và cản trở sự liên kết của đầu tận cùng 3' của cơ chất vào vị trí cho và vị trí nhận của trung tâm peptidyl-transferaza. Eritromixin có lẽ kìm hãm cả việc hình thành liên kết peptit và sự chuyển chỗ.

Trong số các chất tác dụng một cách chọn lọc lên tổng hợp protein ở hệ thống Eukaryota, ngoài actidion (xicloheximit), đáng chú ý là độc tố bạch hầu. Như ta đã biết vi khuẩn bạch hầu (*Corynebacterium diphtheriae*) chỉ sản sinh độc tố trong trường hợp bị nhiễm thể thực khuẩn β , và gen cấu trúc của độc tố là thuộc genom của thể thực khuẩn β . Độc tố là một protein (khối lượng phân tử 62.000) gồm hai polipeptit liên kết bởi một cầu disunphit. Sự khử cầu S-S và sự thủy phân một liên kết peptit xảy ra khi độc tố xâm nhập vào tế bào. Đoạn polipeptit lớn (khối lượng phân tử 38.000) cản cho việc xâm nhập của độc tố vào tế bào, đoạn polipeptit nhỏ (khối lượng phân tử 24.000) kìm hãm tổng hợp protein. Trong sự cố mật của NAD^+ độc tố làm bất hoạt yếu tố EF-2 bằng cách xúc tác phản ứng ADP - ribozyl hóa yếu tố này và vì vậy ngăn cản sự chuyển chỗ : Phản ứng diễn ra như sau :

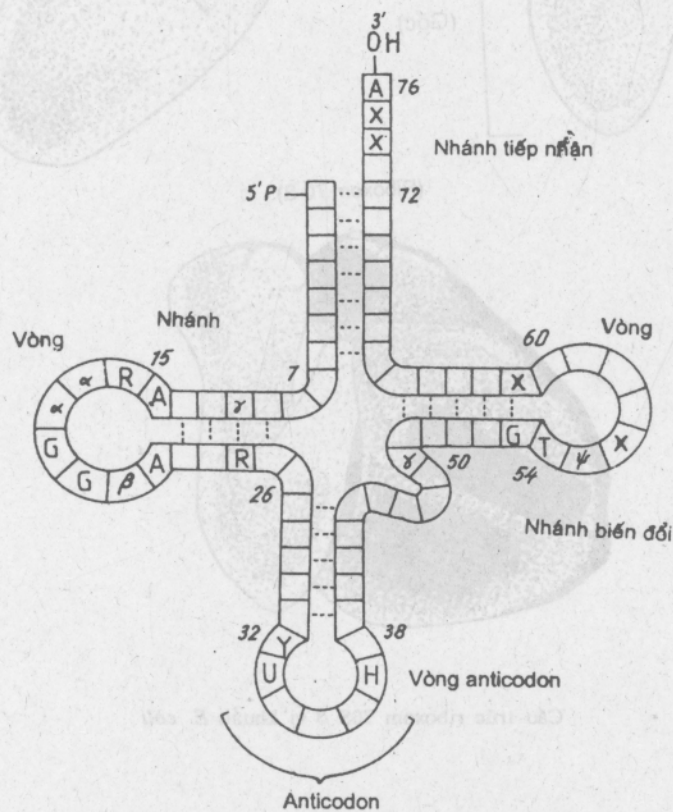




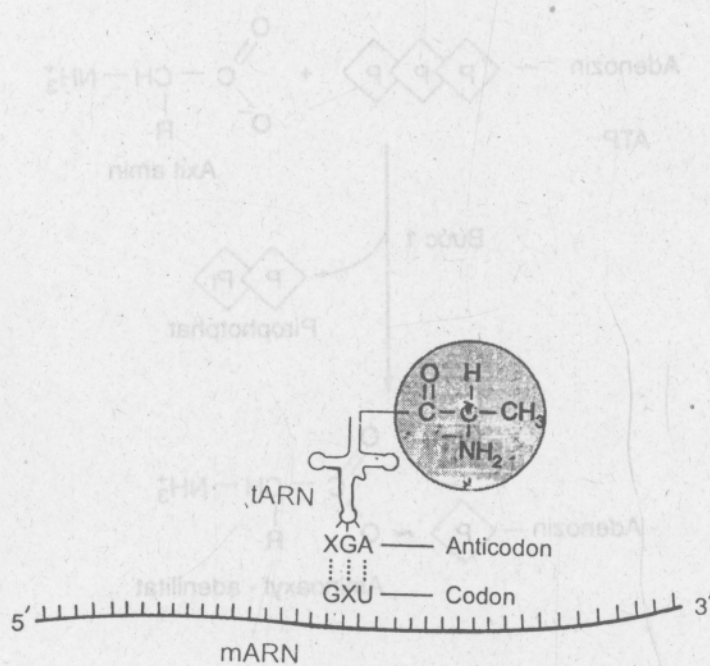
Cấu trúc riboxom 70S ở vi khuẩn *E. coli*



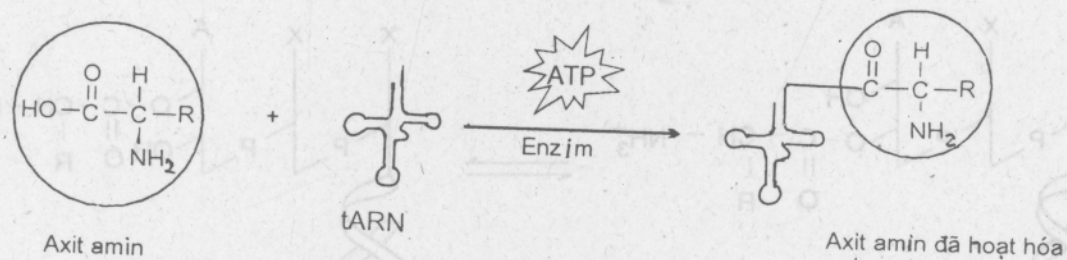
So sánh cấu trúc riboxom ở nhóm Nhân nguyên thủy và nhóm Nhân thật



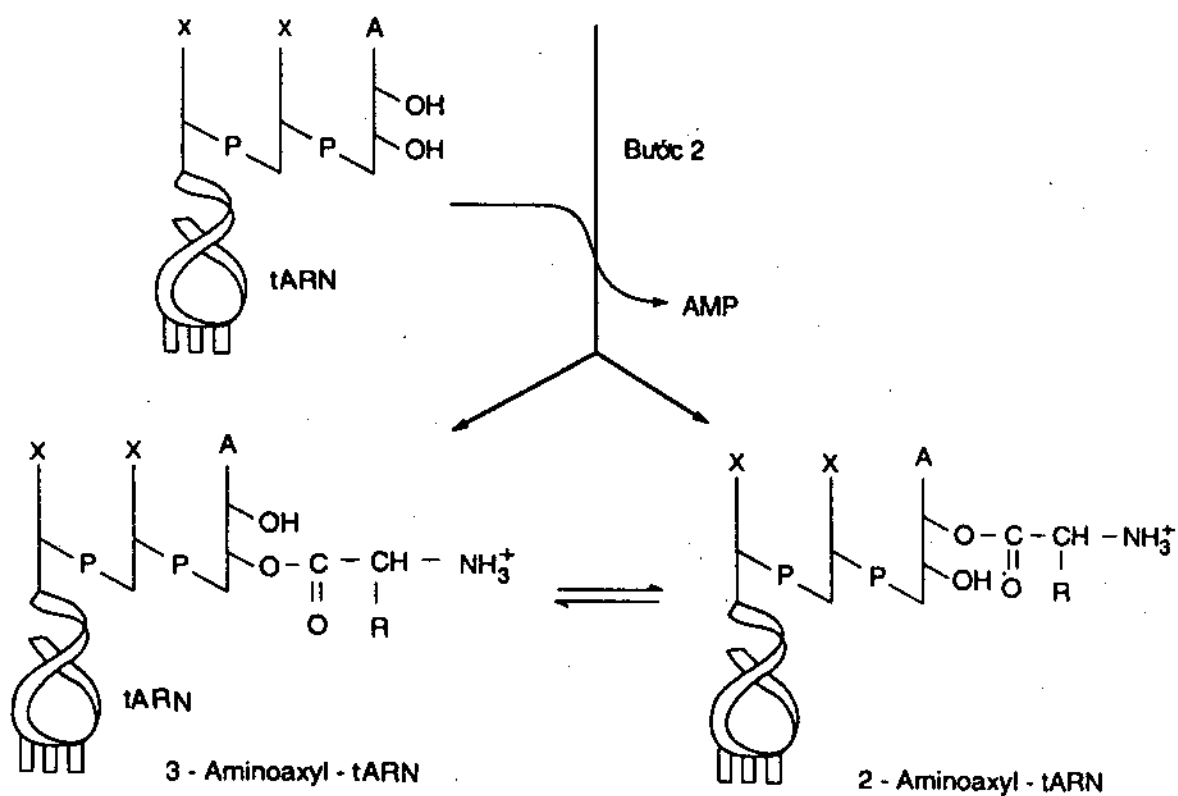
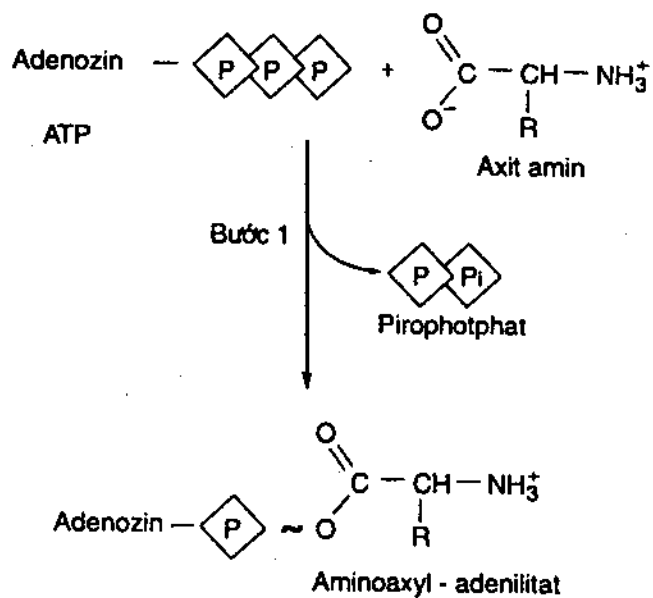
Cấu trúc chung của tARN



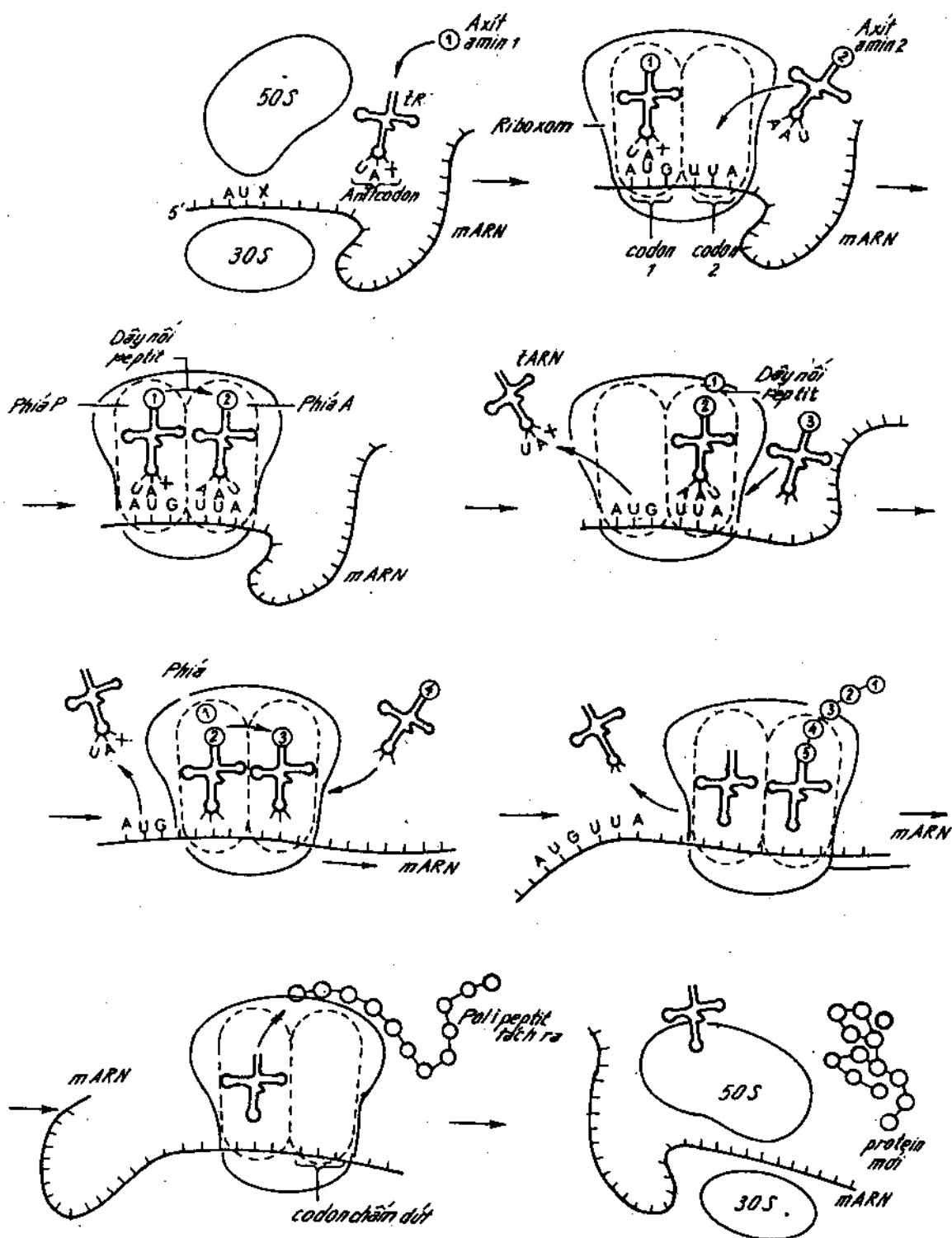
Việc liên kết anticodon với codon qua các cặp bazơ nitơ tương ứng



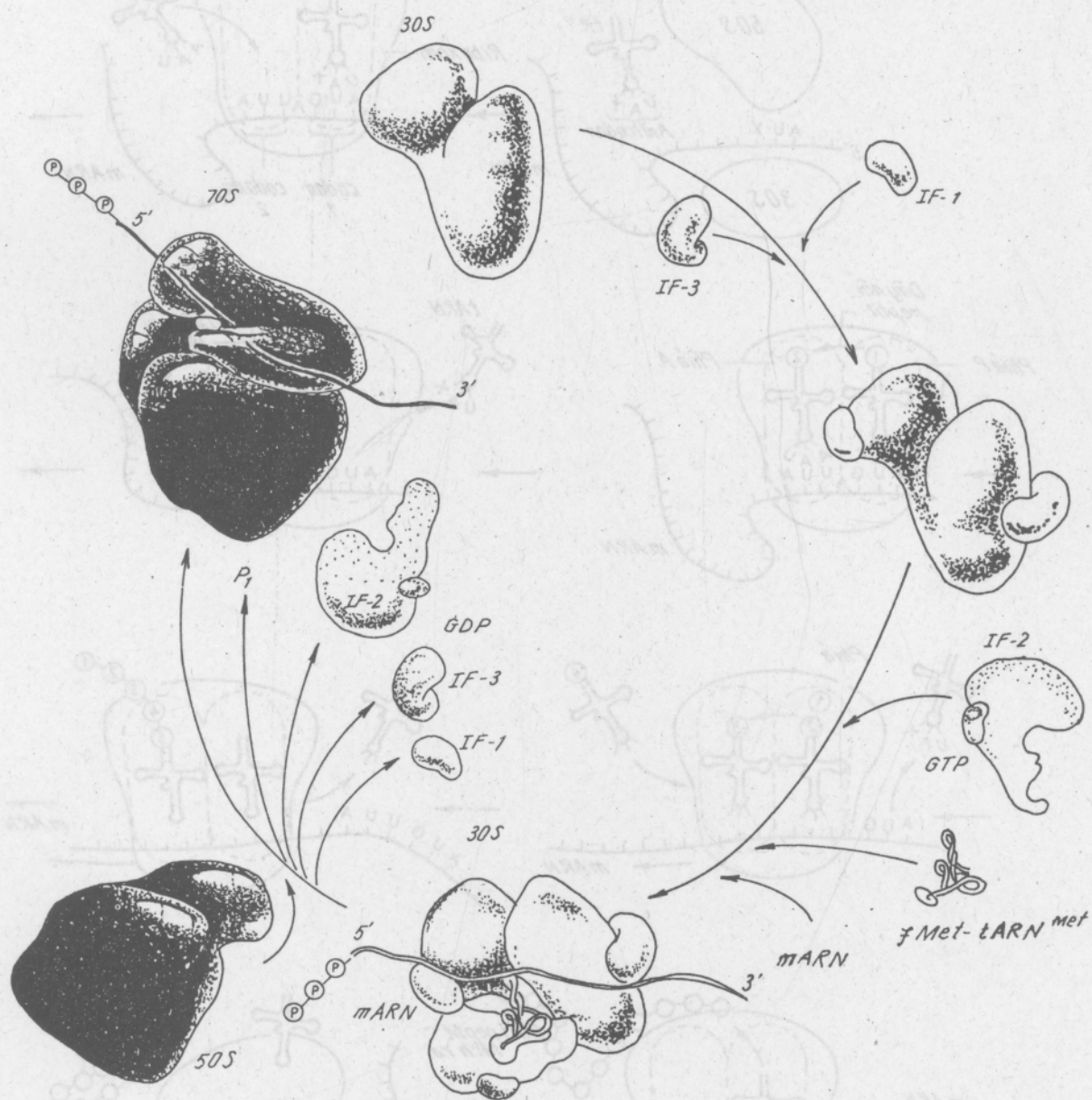
Sự hoạt hóa axit amin



Cơ chế hoạt hoá axit amin



Các bước sinh tổng hợp protein



Các bước hình thành riboxom 70S trong quá trình sinh tổng hợp protein

Vị trí 1 (đầu 5')	Vị trí 2				Vị trí 3
	U	X	A	G	
U	Phe	Ser	Tyr	Cys	U
	Phe	Ser	Tyr	Cys	X
	Leu	Ser	Không mã hóa	Không mã hóa	A
	Leu	Ser	Không mã hóa	Trp	G
X	Leu	Pro	His	Arg	U
	Leu	Pro	His	Arg	X
	Leu	Pro	Gln	Arg	A
	Leu	Pro	Gln	Arg	G
A	ile	Thr	Asn	Ser	U
	ile	Thr	Asn	Ser	X
	ile	Thr	Lys	Arg	A
	Met	Thr	Lys	Arg	G
G	Val	Ala	Asp	Gly	U
	Val	Ala	Asp	Gly	X
	Val	Ala	Glu	Gly	A
	Val	Ala	Glu	Gly	G

Mã di truyền tiêu chuẩn

2 - QUÁ TRÌNH CỐ ĐỊNH NITƠ

Người ta nhận thấy muốn có thu hoạch 12 tạ hạt trên mỗi hecta, cây trồng cần lấy đi khỏi đất khoảng 30kg nitơ. Số lượng nitơ này nằm trong hạt và trong rơm rạ hoặc thân lá. Hiệu suất sử dụng của phân hóa học là vào khoảng 75%. Như vậy có nghĩa là nếu chỉ dựa vào nguồn nitơ của phân hóa học thì muốn có 5 tấn hạt chúng ta phải bón vào mỗi hecta khoảng 166,6kg nitơ (tương đương với 833kg amon sunphat). Số lượng nitơ lớn này thật khó có thể thỏa mãn ngay cả ở các nước có công nghiệp phân nitơ hóa học phát triển.

Trong thực tế cây trồng có thể nhận được một nguồn nitơ lớn nhờ quá trình phân giải của vi sinh vật đối với các chất hữu cơ có mặt trong đất hoặc được đưa vào đất (phân rác, phân xanh, phân chuồng...). Quá trình này được gọi là quá trình amon hóa hoặc quá trình thối rữa.

Nếu đất bị ngập nước hoặc không đủ oxi, thì muối amon được tạo thành sẽ tích lũy lại trong đất, nhưng nếu trong đất có đầy đủ oxi thì NH_3 sẽ được oxi hóa thành nitrit rồi tiếp đó oxi hóa thành nitrat (quá trình nitrat hóa). Nitrat là một trong những dạng hợp chất nitơ được cây trồng hấp thụ một cách dễ dàng.

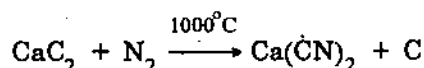
Ngược lại với quá trình nitrat hóa là quá trình phản nitrat hóa, tức là quá trình khử nitrat thành nitơ phân tử. Bên cạnh quá trình phản nitrat do vi sinh vật còn có một quá trình phản nitrat hóa hoàn toàn hóa học (phản ứng giữa HNO_2 với axit amin hoặc amit).

Những tổn thất về nitơ do quá trình phản nitrat hóa gây nên được bù đắp lại nhờ một quá trình sinh học đặc biệt gọi là quá trình cố định nitơ. Nhóm vi sinh vật có khả năng thực hiện quá trình này được gọi là các vi sinh vật cố định nitơ. Chúng có khả năng chuyển hóa nitơ phân tử trong không khí thành các hợp chất chứa nitơ và làm giàu thêm nguồn dự trữ thức ăn nitơ trong đất.

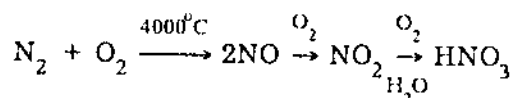
Trong không khí, nitơ chiếm khoảng 78,16% theo thể tích (hoặc 75,5% theo khối lượng). Người ta tính ra rằng bầu không khí bao quanh Trái Đất có chứa tới 4×10^{15} tấn nitơ. Trái Đất có diện tích khoảng 500 triệu km^2 , vì vậy suy ra trong khoảng không khí bên trên mỗi km^2 đất đai có khoảng 8.000.000 tấn nitơ. Số lượng nitơ này đủ thỏa mãn cho nhu cầu về nitơ của cây trồng sống trên mảnh đất đó (với thu hoạch 20 tạ/hecta) trong khoảng 80 triệu năm.

Trong thực tế cây trồng (cũng như người và các loài động vật) không có khả năng đồng hóa trực tiếp nguồn nitơ lớn lao này. Sở dĩ như vậy bởi vì trong không khí, phân tử nitơ tồn tại ở trạng thái liên kết hai nguyên tử nitơ lại với nhau nhờ ba dây nối rất bền vững ($\text{N} \equiv \text{N}$). Năng lượng của ba dây nối này là vào khoảng 255 Kcal/M.

Năm 1905 lần đầu tiên con người tìm được phương pháp phá vỡ các dây nối này và bắt N_2 liên kết với các canxi để tạo thành một dạng phân nitơ hóa học đầu tiên là canxi xianamit. Muốn thực hiện phản ứng này người ta phải duy trì một nhiệt độ cao đến 1000 - 1100°C :



Ít lâu sau các nhà khoa học Na Uy lại tìm được cách liên kết N_2 với O_2 để tạo thành một dạng phân nitơ hóa học khác - nitrat. Phản ứng này cũng có giai đoạn đòi hỏi nhiệt độ cao đến 4000°C.



Năm 1908 nhà khoa học Đức Gabe đã tìm được phương pháp liên kết N_2 với H_2 để tạo ra amoniac. Phản ứng này không những đòi hỏi nhiệt độ cao (600°C), áp suất cao (1000atm) mà còn đòi hỏi phải có mặt một số chất xúc tác đắt tiền (Os, Ru). Với phát minh quan trọng này Gabe đã được nhận giải thưởng Noben năm 1918.

Từ đó đến nay ngành công nghiệp hóa học đã có những tiến bộ rất lớn. Người ta đã sản xuất rộng rãi nhiều loại phân nitơ hóa học khác nhau với sản lượng ngày càng tăng. Nếu như năm 1613 toàn thế giới mới chỉ sản xuất được có 0,51 triệu tấn nitơ trong dạng phân hóa học thì đến năm 1964 con số này đã tăng lên đến 29 lần tức 14,5 triệu tấn (trong khi đó sản lượng phân kali chỉ tăng có 8,4 lần ; phân photpho chỉ tăng có 5,8 lần).

Dù sao thì phân nitơ hóa học chỉ bù đắp được một phần số lượng nitơ mà cây trồng lấy đi khỏi đất hàng năm. Có thống kê cho biết hàng năm các sản phẩm nông nghiệp trên thế giới lấy đi khỏi đất khoảng 100-110 triệu tấn nitơ (G.Colar và Greenland, 1963). Con số này vượt quá đến hơn 7 lần so với số lượng phân nitơ hóa học sản xuất ra lúc đó ở tất cả các nước gộp lại. Mặt khác việc sử dụng phân nitơ hóa học lại rất không đồng đều trên thế giới. Số dân của các nước có kinh tế phát triển chỉ vào khoảng 1/3 nhân loại nhưng ở các nước này người ta đã tiêu thụ hết gần 90% so với tổng số phân nitơ hóa học của thế giới. Ai cũng biết rằng phân nitơ có tác dụng rất rõ rệt đối với mùa màng (bón 1kg nitơ có thể thu nhận thêm được khoảng 10-20kg thóc, 15-25kg ngô hoặc 15-40kg cỏ khô). Vậy mà 2/3 nhân loại chỉ được sử dụng hết sức dè sẻn một lượng phân nitơ rất nhỏ.

Khó khăn chủ yếu làm cản trở việc mở rộng nhanh chóng hơn nữa việc sản xuất phân nitơ hóa học là vì điều kiện để phá vỡ các liên kết trong phân tử N_2 không phải là đơn giản (cần nhiệt độ cao, áp suất cao và nhiều chất xúc tác đắt tiền).

Chính vì vậy mà vai trò của các vi sinh vật cố định nitơ có một ý nghĩa hết sức lớn lao đối với nông nghiệp, nhất là đối với các nước có nền công nghiệp phân hóa học chưa phát triển lắm. Những nghiên cứu gần đây nhất cho biết tổng số nitơ cố định được bởi vi sinh vật trên toàn thế giới là khoảng 175 triệu tấn.

Người ta đã dành những cố gắng rất lớn để một mặt đi sâu nghiên cứu về đặc điểm sinh học của các nhóm vi sinh vật cố định nitơ và tìm cách phát huy đến mức cao nhất tác dụng lớn lao này của chúng, mặt khác tìm cách khám phá ra các bí mật của cơ chế cố định nitơ sinh học với hy vọng sẽ từng bước dẫn đến những cải tiến quan trọng trong ngành công nghiệp sản xuất các loại phân nitơ hóa học.

2.1. Vi khuẩn nốt sần cộng sinh với cây thuộc bộ Đậu

2.1.1. Vi khuẩn nốt sần và sự tạo thành nốt sần

Năm 1866 hai nhà khoa học Đức là Henrichen và Vinphac (H.Hellriegel và H. Willfarth) lần đầu tiên dùng thực nghiệm để chứng minh được rằng cây đậu khác các thực vật khác ở chỗ chúng có khả năng sử dụng nitơ trong không khí. Hai năm sau (1888) nhà khoa học Hà Lan Beyerinck (M.W.Beyerinck) đã phân lập được loại vi khuẩn sống cộng sinh trong nốt sần ở rễ một cây thuộc bộ Đậu (đậu Hòa lan, đậu tằm, đậu liên li, đậu cove, đậu chân chim, đậu lotus...). Ông đặt tên cho loại vi khuẩn này là

Bacillus radicicola. Năm 1889 vi khuẩn này được xếp vào một chi riêng là chi *Rhizobium* (B. Frank, 1889). Từ phát hiện quan trọng này đến nay đã 108 năm. Trong hơn một thế kỉ qua người ta đã nghiên cứu khá kĩ về các loài trong chi vi khuẩn đặc biệt này cũng như về mối quan hệ cộng sinh giữa chúng và các cây bộ Đậu.

Người ta đã miêu tả được khoảng 11.000 loài thuộc bộ Đậu nhưng người ta chỉ mới điều tra về khả năng tạo thành nốt sần ở 1200 loài trong số này. Có khoảng 133 loài được chứng minh là không có khả năng tạo thành nốt sần (12/134 ở họ Trinh nữ, 64/97 ở họ Muống và 57/969 ở họ Đậu).

Căn cứ vào những tài liệu hiện có thì vi khuẩn nốt sần khi còn non có tế bào hình que, kích thước vào khoảng $0,5 - 0,9 \times 1,2 - 3,0 \mu m$, bắt màu đồng đều và có khả năng di động nhờ tiên mao. Vi khuẩn có nốt sần có loại đơn mao, có loại chu mao và cũng có loại tiên mao mọc thành chùm ở gần đầu.

Khi già vi khuẩn nốt sần trở nên bất động. Lúc đó tế bào trở nên bắt màu từng đoạn khi nhuộm bằng thuốc nhuộm anilin (có thể do xuất hiện các thể ẩn nhập giàu lipid). Có lúc vi khuẩn nốt sần tạo thành những dạng hình cầu di động hoặc không di động. Có tài liệu cho biết trong đất vi khuẩn nốt sần thường có dạng hình cầu, cũng có khi chúng tạo thành những thể qua lọc. Khi gặp điều kiện thuận lợi những thể qua lọc này lại có thể phát triển thành các tế bào bình thường.

Trên môi trường nhân tạo cũng như trong nốt sần người ta thường gặp những tế bào gọi là thể giả khuẩn (bacteroides). So với các tế bào hình que bình thường thì thể giả khuẩn có kích thước lớn hơn, thường phân nhánh (tạo thành các hình giống như chữ X, V, Y ...) chứa nhiều glicogen, volutin và lipoprotein hơn. Có nghiên cứu cho biết trong nốt sần ở cây Diên thanh hạt tròn (*Sesbania grandiflora* = *S. paludosa*) không bao giờ thấy có các dạng thể giả khuẩn này.

Khi theo dõi sự phát triển của vi khuẩn nốt sần trên các môi trường dinh dưỡng nhân tạo người ta thường chia chúng ra thành hai nhóm :

- Nhóm mọc nhanh (vi khuẩn nốt sần có ba lá, đậu Hà lan, đậu Còve, mướp tức...). Nhóm này thuộc chi *Rhizobium*.

- Nhóm mọc chậm (vi khuẩn nốt sần đậu tương lạc, đậu đũa). Nhóm này thuộc chi *Bradyrhizobium*.

Trên môi trường đặc, vi khuẩn nốt sần thường có khuẩn lạc trơn bóng, nhầy, vô màu. Chất nhầy do vi khuẩn nốt sần sinh ra thuộc một loại polisaccarit cấu tạo bởi các hexozơ, pentozơ và axit uronic.

Vi khuẩn nốt sần có khả năng đồng hóa nhiều nguồn cacbon khác nhau (đường đơn, đường kép, axit hữu cơ, rượu bậc thấp, dextrin, glicogen...). Khoảng 30% lượng đường do vi khuẩn nốt sần đồng hóa được dùng để tạo thành chất nhầy của chúng.

Vi khuẩn nốt sần có thể phát triển được trên những môi trường rất nghèo nitơ. Tuy nhiên cho đến nay vẫn chưa có ai xác định được là chúng có khả năng cố định nitơ khi phát triển trên các môi trường dinh dưỡng (phát triển bên ngoài nốt sần). Còn có ý kiến cho rằng khả năng cố định nitơ chưa chắc đã thuộc về vi khuẩn nốt sần mà có thể là thuộc về cây họ Đậu. Vi khuẩn nốt sần chỉ có tác dụng làm kích thích cho việc thực hiện quá trình này. Khi sử dụng N^{15} một số tác giả cho biết nguyên

tổ phóng xạ này sẽ được tích lũy lại chủ yếu là trong màng tế bào thực vật và được tích lũy rất ít trong tế bào vi khuẩn nốt sần. Rõ ràng đây là vấn đề cần được đi sâu nghiên cứu thêm.

Vi khuẩn nốt sần có thể đồng hóa tốt nhiều loại axit amin, một số nòi có thể đồng hóa pepton. Khả năng sử dụng các protein phân tử lớn nói chung là rất ít. Ngược lại, vi khuẩn nốt sần có thể sử dụng dễ dàng các muối amon, nitrat và các gốc kiềm purin, pirimidin. Chúng còn có thể sử dụng được cả ure hoặc biure.

Việc nuôi cấy vi khuẩn nốt sần trên các môi trường với nồng độ các hợp chất nito cao có thể làm mất khả năng xâm nhiễm cũng như khả năng tạo thành nốt sần trên cây bộ Đậu. Chính vì vậy cho nên người ta thường sử dụng các loại môi trường chứa nước chiết thực vật để nuôi cấy vi khuẩn nốt sần.

Nhu cầu về vitamin thay đổi đối với tùy từng nòi vi khuẩn nốt sần. Nói chung nhiều loại vi khuẩn nốt sần có khả năng tự tổng hợp khá nhiều loại vitamin (B_1 , B_2 , B_{12} ...). Nhiều vi khuẩn nốt sần còn có khả năng tổng hợp các chất sinh trưởng thực vật (như gibberellin, axit β -indolaxetic...).

Để nuôi cấy vi khuẩn nốt sần, người ta thường sử dụng các môi trường chứa đường kính hoặc mannitol, một số muối khoáng và một ít cao nấm men hoặc dịch tự phân nấm men (các môi trường Harrison, 1915; Fred và Waksman; 1928, Matchette, 1933; Bond 1910, Hendrickson 1942; Van Schreven, 1953; Burton 1965...). Để nhân giống vi khuẩn nốt sần trong điều kiện các hợp tác xã nông nghiệp cũng có thể sử dụng cả những môi trường rất đơn giản chứa đường kính hoặc đường đen với tỉ lệ 1% trong nước chiết của loại đậu tương ứng (50g/lít).

Vi khuẩn nốt sần thuộc loại hiếu khí. Tuy nhiên chúng vẫn có thể phát triển được ngay cả trong trường hợp chỉ có một áp lực oxy rất thấp, khoảng 0,01 atm.

Đa số các loại vi khuẩn nốt sần thích hợp phát triển ở pH = 6,5 - 7,5. Sự sinh trưởng của chúng bị cản trở khi pH hạ thấp đến 4,5 - 5,0 hoặc nâng lên đến 8,0.

Nhiệt độ thích hợp đối với nhiều loại vi khuẩn nốt sần là 24-26°C. Ở nhiệt độ 37°C sự phát triển của chúng bị cản trở một cách rõ rệt.

Về việc phân loại các loài vi khuẩn nốt sần nói chung còn chưa có ý kiến thống nhất.

Mỗi loại vi khuẩn nốt sần chỉ xâm nhiễm được lên một nhóm cây nhất định trong bộ Đậu. Ví dụ các nghiên cứu ở Việt Nam cho biết vi khuẩn nốt sần Điển thanh hoa vàng (*S. cannabana*) có thể tạo cả nốt sần trên cây Điển thanh hạt tròn (*S. paludosa*) và ngược lại, trong khi đó không có khả năng tạo thành nốt sần trên rất nhiều loại đậu khác (đậu tương, đậu đen, đậu xanh, đậu dũa, lạc, điều tử...).

Cũng có trường hợp vi khuẩn nốt sần nhập được vào những loại đậu không đặc biệt đối với chúng, khi đó chúng chỉ có thể tạo ra rất ít nốt sần và cố định nito rất yếu. Có tác giả cho rằng nhờ đặc điểm này mà vi khuẩn nốt sần có thể tồn tại được lâu dài trong những vùng đất không có mặt loại đậu đặc biệt đối với chúng. Nhân tố quyết định tính chuyên hóa của vi khuẩn nốt sần tồn tại trên ADN của chúng. Có thể dùng nhiều tác nhân lí hóa hoặc sinh học để làm dao động tính chuyên hóa này của chúng.

Nói chung, cứ loài nào phát triển trên môi trường thạch - cao nấm men - mannit mà có thời gian thế hệ nhỏ hơn 4 giờ, có khuẩn lạc 2-4mm đường kính xuất hiện sau 3-5 ngày thì được xếp vào chi *Rhizobium* (mọc nhanh), còn nếu có thời gian thế hệ lớn hơn 8 giờ, khuẩn lạc không quá 1mm đường kính xuất hiện sau 5-7 ngày thì được xếp vào chi *Bradyrhizobium* (mọc chậm). Có thể kể đến *R.leguminosarum* (đậu Hà Lan), *R.phaseoli* (ở đậu xanh, đậu tây, đậu ngự), *R.trifolii* (ở cỏ Ba lá), *R.meliloti* (ở cỏ mục túc), *B.japonicum* (ở đậu tương) v.v...

Một đặc tính quan trọng của vi khuẩn nốt sần là tính hữu hiệu của chúng tức là hoạt tính đồng hóa N_2 khi cộng sinh với cây bộ Đậu. Sự tồn tại trong thiên nhiên các nòi vi khuẩn nốt sần hữu hiệu và vô hiệu đã được phát hiện từ năm 1904 và từ đó đến nay đã được rất nhiều nghiên cứu để cập tới.

Vi khuẩn nốt sần hữu hiệu thường tạo nên những nốt sần lớn và tập trung trên rễ cái của cây đậu. Còn vi khuẩn vô hiệu thì thường tạo nên những nốt sần nhỏ phân tán trên khắp bộ rễ. Nhiều nghiên cứu cho biết nốt sần tạo nên bởi các vi khuẩn hữu hiệu thường có màu hồng. Sắc tố hồng thuộc loại hemin. Người ta đã tách được sắc tố hồng ở dạng tinh khiết từ nốt sần của cây đậu tương và gọi là leghemoglobin. Sắc tố này thường tồn tại trong không bào của tế bào thực vật chứ không phải tồn tại trong tế bào vi khuẩn. Ở nhiều loại đậu trong mỗi gam nốt sần có chứa tới 1,09 - 3,25mg leghemoglobin. Khi phân tích bằng điện di người ta thường chú ý đến hai thành phần của leghemoglobin. Một thành phần có điểm đẳng điện khoảng pH = 4,4 và có khối lượng phân tử là 16800. Thành phần thứ hai có điểm đẳng điện khoảng pH = 4,7 và có khối lượng phân tử là 15400. Nhóm hemin của leghemoglobin rất giống với hemoglobin của máu nhưng thành phần protein của leghemoglobin thì rõ ràng là có cấu trúc phức tạp hơn nhiều. Ở các cây đậu một năm khi đã kết thúc quá trình cố định nitơ, người ta nhận thấy màu hồng ở nốt sần sẽ chuyển thành màu lục. Khi đó một số dây nối metin ở vòng pocphirin của sắc tố bị rách ra và liên kết oxi. Ở các cây đậu nhiều năm, hiện tượng này thường không xảy ra. Sắc tố lục này đã được tách ra để nghiên cứu và người ta nhận thấy nó có chứa khoảng 0,29% sắt.

Rất nhiều nghiên cứu cho phép khẳng định được rằng leghemoglobin đóng vai trò xúc tác trong quá trình cố định nitơ phân tử.

Hiện đã có đủ dấu hiệu cho phép khẳng định rằng có thể dùng nhiều biện pháp khác nhau để nâng cao mạnh mẽ tính hữu hiệu của những vi khuẩn nốt sần vô hiệu. Chẳng hạn như sử dụng tia gamma (với liều 45.000r), consixin và nhất là sử dụng biện pháp thông qua cơ thể thực vật.

Vi khuẩn nốt sần thường xâm nhập vào rễ cây bộ Đậu thông qua các lông hút, đôi khi thông qua vết thương ở vỏ rễ. Một loại cây thuộc bộ Đậu thường tiết ra chung quanh rễ của mình những chất có tác dụng kích thích sự phát triển của các vi khuẩn nốt sần thuộc loại tương ứng với nhóm cây đó. Chẳng hạn khi trộn với vi khuẩn nốt sần cỏ ba lá với vi khuẩn nốt sần mục túc rồi đưa vào bộ rễ của cỏ ba lá, sau ba tuần lễ người ta lấy đất để kiểm tra và nhận thấy số lượng vi khuẩn nốt sần cỏ ba lá tăng lên hàng triệu lần trong khi đó thì vi khuẩn nốt sần cỏ mục túc lại hầu như không phát triển gì cả.

Người ta nhận thấy muốn xâm nhiễm tốt vào thực vật thì vi khuẩn nốt sần cần đạt tới mật độ 10^4 tế bào/g đất. Theo O.N. Allen (1966) thì đối với loại hạt đậu

nhỏ tốt ra trên mỗi hạt cần nhiễm khoảng 500-1000 tế bào vi khuẩn nốt sần, còn đối với các loại hạt đậu lớn thì cần nhiễm khoảng 70.000 tế bào vi khuẩn nốt sần. Khi đó cây đậu sẽ tạo thành khá nhiều nốt sần và hoạt động cố định nitơ sẽ được tăng lên nhiều.

Dưới ảnh hưởng của vi khuẩn nốt sần, rễ cây họ Đậu sẽ tiết ra enzym poligalacturonaza, enzym này sẽ làm phân hủy thành lỏng hút và giúp cho vi khuẩn nốt sần có điều kiện xâm nhập vào rễ. Trong lỏng hút vi khuẩn nốt sần sẽ tạo thành một cái gọi là dây xâm nhập. Đó là một khối chất nhầy dạng sợi, bên trong chứa đầy các vi khuẩn hình que ở trạng thái phát triển nhanh chóng. Dây xâm nhập đi dần vào bên trong rễ với tốc độ khoảng 5-8 $\mu\text{m/s}$. Sự vận động của dây xâm nhập được thực hiện dưới áp lực sinh ra do sự phát triển của các vi khuẩn bên trong dây.

Một số dây xâm nhập sẽ tiếp tục phát triển và lọt được vào đến lớp nhu mô. Ở đây vi khuẩn nốt sần sẽ kích thích các tế bào thực vật bị chúng xâm nhiễm cũng như các tế bào lân cận. Kết quả là làm cho chúng phân chia nhanh chóng thành rất nhiều tế bào mới. Vi khuẩn sẽ thoát ra khỏi dây xâm nhập và đi vào trong tế bào chất. Ở đó chúng sẽ lớn lên và phân cắt thành nhiều tế bào mới. Chúng sẽ chuyển sang trạng thái thể giả khuẩn. Thể giả khuẩn không có khả năng phân cắt nhưng có khả năng tăng kích thước đến một mức nhất định. Trong các nốt sần vô hiệu người ta không thấy các thể giả khuẩn mà chỉ thấy toàn các vi khuẩn hình que. Người ta còn nhận thấy khi màu hồng của các nốt sần hữu hiệu chuyển sang màu lục thì cũng là lúc thể giả khuẩn bị dung giải. Những điều đó cho phép người ta tin rằng việc tạo thành thể giả khuẩn có liên quan mật thiết đối với quá trình cố định nitơ.

Khi hình thành thể giả khuẩn thì ti thể và lục thể của tế bào sẽ bị dồn sát vào thành tế bào và phân bố dọc theo thành. Khi đó trong tế bào sẽ bắt đầu xuất hiện leghemoglobin và số lượng ribosom cũng đồng thời tăng lên khá nhiều.

Ở những nốt sần trưởng thành, người ta có thể thấy rõ ba vùng sau đây :

1. Vỏ nốt sần : Gồm vài lớp tế bào không bị vi khuẩn xâm nhiễm. Những tế bào này thường có kích thước nhỏ hơn các tế bào vỏ rễ. Sau khi hình thành vỏ nốt sần phần vỏ rễ sẽ bị nát đi, một ít còn lại sẽ dính vào bên ngoài phần vỏ của nốt sần.

2. Vùng phân cắt mạnh mẽ : Vùng này cũng gồm những tế bào không bị xâm nhiễm, nằm bên dưới lớp vỏ nốt sần. Từ các tế bào của vùng này về sau sẽ phân hóa và tạo thành các tế bào vỏ nốt sần, các tế bào chứa vi khuẩn và các tế bào mạch dẫn.

3. Vùng mô bị xâm nhiễm : Trong vùng này các tế bào chứa vi khuẩn nằm xen lẫn với các tế bào không chứa vi khuẩn. Thể tích của mỗi tế bào chứa vi khuẩn có thể lớn gấp đến 8 lần so với tế bào không chứa vi khuẩn. Ở cỏ ba lá hầu như vùng mô bị xâm nhiễm gồm toàn các tế bào chứa vi khuẩn trong khi đó ở *Caragana* thì số tế bào chứa vi khuẩn chỉ chiếm khoảng 50-70%.

4. Hệ thống mạch dẫn của nốt sần : Khi nốt bắt đầu phát triển, một số tế bào nằm giữa phần vỏ nốt sần và phần mô bị xâm nhiễm sẽ phân hóa và phân cắt thành các tế bào mạch dẫn của nốt sần. Về sau các mạch dẫn này sẽ liên kết với hệ thống mạch dẫn của rễ cây. Số bố mạch trong mỗi nốt sần tùy loại cây mà thay đổi trong khoảng 1-12.

10.11

2.1.2. Ảnh hưởng của điều kiện ngoại cảnh đối với vi khuẩn nốt sần và sự cố định nitơ

Mối quan hệ cộng sinh giữa vi khuẩn nốt sần và cây bộ Đậu cũng như hoạt tính cố định nitơ của chúng chịu ảnh hưởng của một số điều kiện ngoại cảnh sau đây :

1. *Độ ẩm của đất* : Nốt sần thường chỉ được tạo thành ở những đất có độ ẩm khoảng 40-80% so với độ ẩm tuyệt đối. Độ ẩm thích hợp nhất là 60-70%. Khi nốt sần đã hình thành rồi thì độ ẩm có cao hơn cũng không ảnh hưởng mấy đến hoạt động của chúng. Mức độ phản ứng đối với độ ẩm không giống nhau tùy loại cây. Chẳng hạn *Medicago* rất mẫn cảm đối với sự khô cạn, trong khi đó thì *Onobrychis* lại có thể tạo thành nốt sần ngay cả ở những đất có độ ẩm rất thấp.

2. *Độ thoáng khí* : Trong thí nghiệm trồng cây bộ Đậu với kĩ thuật tách rễ ra thành từng nhóm nuôi trong các dung dịch có độ thông khí khác nhau người ta nhận thấy nốt sần tạo thành rất nhiều ở những bình được thông khí tốt. Khi kém thông khí, người ta nhận thấy lượng chứa leghemoglobin trong nốt sần giảm đi một cách rõ rệt. Chính có lẽ vì ảnh hưởng của độ thoáng khí nên người ta nhận thấy ở các lớp rễ càng sâu, số lượng nốt sần càng giảm. Có thể vì kém thoáng khí mà xảy ra sự tích lũy H_2O_2 và do đó ảnh hưởng đến mối quan hệ cộng sinh giữa vi khuẩn và cây bộ Đậu.

Cây Diên thanh có một đặc điểm rất đáng chú ý, đó là khi ngập nước, chúng có thể sinh ra rất nhiều nốt sần trên thân cây, chỗ phía trên mặt nước. Còn có loại Diên thanh có nốt sần mọc thành hàng dọc cả thân cây.

3. *Nhiệt độ* : Hoạt động cố định nitơ chỉ được thực hiện một cách mạnh mẽ trong một phạm vi nhiệt độ xác định. Phạm vi này thay đổi đối với tùy loài cây trong bộ Đậu. Những cây thuộc vùng nhiệt đới thường có phạm vi nhiệt độ cố định nitơ cao hơn so với các cây thuộc vùng ôn đới.

4. *pH của đất* : Phạm vi pH thích hợp đối với vi khuẩn nốt sần thay đổi khác nhau tùy loài, thậm chí tùy chủng vi khuẩn. Giới hạn pH đối với sự sinh trưởng của một loài đậu nào đấy thường rộng hơn giới hạn pH đối với sự tạo thành nốt sần của chúng. Một số nghiên cứu cho biết nhiều loại Đậu có thể mọc được ở phạm vi pH = 3,9-9,6, nhưng chỉ tạo được nốt sần ở phạm vi pH = 4,6-8,0. Trừ một số cây thuộc bộ Đậu có thể chịu được chua tốt (như cây Diên thanh chẳng hạn), nói chung nốt sần được sinh ra nhiều trên rễ đậu khi đất có pH trung tính.

Bón vôi là một biện pháp rất hữu hiệu để nâng cao khả năng tạo thành nốt sần cũng như nâng cao hoạt tính cố định nitrogen của các cây bộ Đậu. Biện pháp nhằm cho các cây bộ Đậu trồng ở vùng đất chua những nòi vi khuẩn nốt sần chịu chua đã được lựa chọn cũng là một phương hướng đáng lưu ý.

5. *Phân đạm* : Sự tồn tại một lượng nitơ dễ tiêu nhất định nào đó thường làm ức chế sự tạo thành nốt sần ở cây bộ Đậu. Khả năng ức chế của nitrat thường lớn hơn của muối amon.

Đáng chú ý là khi cây bộ Đậu còn non, chưa hình thành nốt sần thì việc bổ sung một lượng thích hợp phân đạm sẽ làm thúc đẩy mạnh mẽ sự phát triển của chúng, làm ảnh hưởng tốt đến sự tạo thành nốt sần và hoạt động cố định nitơ phân tử.

6. *Phân lân* : Khi trong đất hàm lượng photpho thấp vi khuẩn nốt sần vẫn có thể xâm nhập được vào rễ nhưng không tạo thành được nốt sần. Các chủng vi khuẩn nốt sần khác nhau có những nhu cầu về photpho khác nhau. Photpho làm tăng ảnh hưởng dương tính của Mo đối với quá trình đồng hóa nitơ. Photpho làm tăng cường hoạt động cố định nitơ của vi khuẩn nốt sần, chính vì vậy mà người ta cho rằng tăng cường việc sử dụng phân lân để bón cho đậu tương, lạc hoặc các cây phân xanh bộ Đậu (điển thanh, muống, cốt khí...) là biện pháp rất có hiệu quả để nâng cao năng lực cố định nitơ của chúng.

7. *K* : Cây thuộc bộ Đậu lấy đi khỏi đất một lượng kali lớn hơn nhiều loại cây trồng khác. Bón phân kali, nhất là phân kali - photpho có thể làm tăng cường mạnh mẽ sự phát triển cũng như hoạt động cố định nitơ của chúng. Có tác giả cho rằng đậu đỗ có hoạt động cố định nitơ mạnh mẽ nhất và cho sản lượng cao nhất khi phát triển trên các môi trường chứa N, P, K theo tỉ lệ 0,5N : 1P : 2K. Thực ra K không có ý nghĩa đặc hiệu đối với quá trình cố định nitơ, nó chỉ làm thúc đẩy sự phát triển của cây bộ Đậu và thông qua đấy mà làm tăng cường hoạt động cố định nitơ của chúng.

8. *Ca* : Bón vôi không những làm cải thiện pH của đất mà còn nâng cao hàm lượng Ca trong đất và thông qua đó mà làm tăng cường sự phát triển và hoạt động cố định nitơ của cây bộ Đậu. Rất nhiều nghiên cứu đã khẳng định ảnh hưởng xấu của việc thiếu Ca đối với sự phát triển và các hoạt động sinh lí của vi khuẩn nốt sần. Nhiều nghiên cứu đã chứng minh về mối quan hệ rõ rệt giữa hàm lượng Ca trong môi trường với sự phát triển và sự tạo thành nốt sần ở cây bộ Đậu.

9. *Mg, S và Fe* : Mg có ảnh hưởng tích cực lên sự tạo thành nốt sần và hoạt động cố định nitơ của cây bộ Đậu. Thiếu magie sẽ làm tác hại rõ rệt đối với hoạt động sống và sự phát triển của vi khuẩn nốt sần. Một số nghiên cứu cũng đã chứng minh vai trò của lưu huỳnh trong quá trình tạo thành nốt sần và quá trình tổng hợp leghemoglobin. Sắt cũng có ảnh hưởng dương tính đối với hoạt động cộng sinh của vi khuẩn nốt sần và cây bộ Đậu. Người ta tìm thấy trong riboxom của mầm cây đậu Hà Lan một chất protein chứa sắt tương tự như ferritin ở các mô động vật. Có thể đây là nguồn dự trữ sắt để cung cấp cho quá trình tổng hợp leghemoglobin.

10. *Các nguyên tố vi lượng* : Nhiều thí nghiệm cho biết bổ sung Mo có thể đẩy mạnh sự phát triển của vi khuẩn nốt sần cũng như sự tạo thành nốt sần. Mo có hiệu quả không rõ trên các đất chua chứa nhiều nhôm. Bón vôi sẽ làm nâng cao rõ rệt tác dụng của việc bổ sung Mo.

Mo (cũng như Fe, Co, Cu...) có tác dụng như những chất trung gian vận chuyển điện tử trong các quá trình oxy hóa - khử có enzym xúc tác.

V không những có tác dụng làm tăng cường ảnh hưởng của Mo mà có ảnh hưởng trực tiếp đối với quá trình cố định nitơ của vi khuẩn nốt sần.

Nhiều nghiên cứu cho biết B rất cần đối với sự phát triển bình thường và đối với quá trình cố định nitơ của vi khuẩn nốt sần. Co cũng có tác dụng đáng kể đối với việc nâng cao sản lượng và nâng cao hoạt động cố định nitơ của cây bộ Đậu. Cu cần thiết cho quá trình tổng hợp leghemoglobin. Khi thiếu Cu, cây bộ Đậu thường tạo ra những nốt sần nhỏ bé và nằm rải rác trên khắp bộ rễ. Mn cũng được coi là nguyên tố vi lượng cần thiết đối với vi khuẩn nốt sần.

11. *Dinh dưỡng cacbon* : Một số thí nghiệm cho biết phun nước đường lên lá cây bộ Đậu có thể làm tăng cường quá trình xâm nhiễm và quá trình cố định nitơ của cây bộ Đậu. Bón các loại rơm rạ rác rưởi có tỉ lệ C : N cao là biện pháp tích cực để nâng cao sản lượng và khả năng tích lũy nitơ của các cây bộ Đậu. Nâng cao nồng độ CO₂ trong không khí cũng có thể làm đẩy mạnh sự phát triển và sự tạo thành nốt sần của vi khuẩn nốt sần.

12. *Các nhân tố sinh học* : Nhiều nghiên cứu cho biết các vi sinh vật sinh chất kháng sinh sống trong đất có thể làm ức chế mạnh mẽ sự phát triển của vi khuẩn nốt sần. Một số tác giả lại cho rằng đây chỉ là kết luận của những thí nghiệm nhân tạo với các giống vi sinh vật thuần chủng, trong đất thường không thấy rõ những ảnh hưởng này. Nhiều loại thể thực khuẩn của vi khuẩn nốt sần có khả năng làm tan tế bào nhiều loại khác nhau trong giống *Rhizobium*. Tuy nhiên phần lớn các thực khuẩn thể lại tác động một cách chuyên hóa lên từng nòi hoặc từng loài vi khuẩn nốt sần xác định. Một số các loài côn trùng (như *Sitotona lineatus*, *S. crinitus*...) có thể làm phá hủy nốt sần trên rễ nhiều cây thuộc bộ Đậu.

Khả năng tạo thành nốt sần còn chịu ảnh hưởng của sự tích lũy ancaloit trong bộ rễ các cây thuộc bộ Đậu.

2.1.3. Phân vi khuẩn nốt sần

Người ta nhận thấy hàng năm vi khuẩn nốt sần cộng sinh trong rễ các cây thuộc bộ Đậu có thể làm giàu thêm cho đất khoảng 50-600kg nitơ/hecta (trung bình là 75-200kg).

Để nâng cao hiệu suất cố định nitơ của cây bộ Đậu từ lâu người ta đã nghĩ đến biện pháp chủ động nhiễm cho hạt giống các cây bộ Đậu những nòi vi khuẩn nốt sần hữu hiệu đã được lựa chọn.

Chế phẩm vi khuẩn nốt sần (có tên gọi là nitragin) này đã được sản xuất và sử dụng rộng rãi ở Liên Xô (cũ), Trung Quốc, Ba Lan, Bungari, Hungari, Rumani, Pháp, Mi, Hà Lan, Bỉ, Nam Tư (cũ) v.v...

Khác với nhiều loại phân vi sinh vật khác, nitragin thường có hiệu quả khá rõ rệt và khá phổ biến. Ở những vùng đất chưa trồng quen một loại đậu đỗ nào đó nếu sử dụng loại nitragin tương ứng có thể làm tăng sản lượng đến 50-100%. Ở những đất đã trồng quen một loại đậu đỗ nào đó rồi người ta nhận thấy việc sử dụng nitragin vẫn có thể làm tăng sản lượng khoảng 15-25%.

Tùy từng nhà máy, tùy từng nước mà nitragin được sản xuất ra dưới những hình thức khác nhau : trên thạch, trong dịch thể, hấp thụ vào than bùn, vào đất vườn... Khó khăn lớn nhất hiện nay là việc đảm bảo duy trì chất lượng của nitragin trong thời gian từ khi sản xuất ra đến lúc sử dụng. Vi khuẩn nốt sần là loại không có bào tử nên rất dễ dàng chết dần đi trong quá trình bảo quản chế phẩm nitragin ở điều kiện nhiệt độ trung bình. Để khắc phục khó khăn này ở nhiều nước người ta đã nghiên cứu sản xuất các chế phẩm vi khuẩn nốt sần ở dạng "đông khô". Tất nhiên là làm theo lối này sẽ rất tốn kém và rất khó có điều kiện để mở rộng quy mô sản xuất.

Trong hoàn cảnh nước ta hiện nay, có nghiên cứu cho biết hình thức đơn giản nhất là trước mùa gieo một loại đậu đỗ nào đó các phòng thí nghiệm nhỏ tổ chức ở các tỉnh sẽ sản xuất các giống thạch nghiêng cấy vi khuẩn nốt sần và chuyển trực tiếp xuống các hợp tác xã, các nông trường. Ở đây giống sẽ được nhân lên trong các môi trường đơn giản (chứa nước chiết đậu 5%, với 1% đường kính). Sau 72 giờ nuôi cấy trong mỗi ml môi trường này có thể đạt tới 3800×10^{16} tế bào vi khuẩn nốt sần điển thanh hoặc 2800×10^{16} tế bào vi khuẩn nốt sần lạc (Nguyễn Lân Dũng, 1969).

Sử dụng nitragin không những làm nâng cao rõ rệt sản lượng các cây trồng thuộc bộ Đậu mà còn có thể làm tăng phẩm chất của các sản phẩm của chúng. Rất nhiều nghiên cứu cho biết khi sử dụng nitragin hàm lượng protein trong cây và trong hạt đậu đỗ sẽ tăng lên khá rõ. Một số tác giả cho biết cây được nhiễm vi khuẩn nốt sần sẽ có hàm lượng nhiều loại vitamin cao hơn so với các cây không được nhiễm.

Một điều đáng chú ý là khi sử dụng nitragin cần tránh sử dụng đồng thời các loại thuốc trừ sâu, thuốc diệt cỏ có khả năng tiêu diệt hoặc ức chế sự phát triển của vi khuẩn nốt sần.

2.2. Sự tạo thành nốt sần và khả năng cố định nitơ ở một số cây không thuộc bộ Đậu

Khả năng hình thành nốt sần được phát hiện thấy ở cả nhiều thực vật không thuộc bộ Đậu.

Trong số các thực vật thuộc ngành Hạt trần (Gymnospermae) người ta đã phát hiện thấy trong các chi sau đây có một số loài có khả năng hình thành nốt sần ở bộ rễ : *Bowenia*, *Cycas*, *Ceratozamia*, *Dioon*, *Encephalarlos*, *Macrozamia*, *Stangeria*, *Zamia* (thuộc bộ Cycadales), *Ginkgo* (thuộc bộ Ginkgoales), *Agathis*, *Araucaria*, *Libocedrus*, *Acmophyle*, *Dacridium*, *Microcachrys*, *Phyllocladus*, *Pherosphaera*, *Podocarpas*, *Saxegothaea*, *Sciadopitys* (thuộc bộ Coniferales).

Trong số các thực vật thuộc lớp Hai lá mầm (Dicotyledoneae) trong ngành Hạt kín (Angiospermae) người ta nhận thấy có các loại nằm trong một số chi sau đây (không kể các loài thuộc bộ Đậu) có khả năng tạo thành nốt sần trên rễ : *Coriaria* (bộ Coriariales), *Myricagale*, *Comptonia* (bộ Myricalee), *Almus* (bộ Fagales), *Casuarina*, (bộ Casuarinales), *Brassiacae*, *Raphanus*, (bộ Rhocadales), *Melampyrum*, *Rhinanthus* (bộ Tubiflorae), *Coffea* (bộ Rubiales) *Dryas Purshia*, *Cercocapus* (bộ Rosales), *Acrostaphylos* (bộ Ericales).

Trong số các thực vật thuộc lớp Một lá mầm (Monocotyledoneae) người ta đã tìm thấy một số loài trong các giống sau đây có khả năng tạo thành nốt sần ở rễ : *Poa*, *Clinelymus*, *Alopecurus*.

Ngoài ra một số loài thực vật thuộc các chi *Pavetta*, *Psychotria*, *Chomelia*, *Coprosoma*... còn có khả năng tạo ra nốt sần trên lá.

Các loài thực vật nói trên được nghiên cứu không nhiều. Một số vi khuẩn cộng sinh đã được phân lập và định tên, một số khác còn chưa đủ tài liệu để xác định. Khả năng cố định nitơ của chúng thường cũng không lớn như các loài thuộc bộ Đậu. Đáng chú ý hơn cả là khả năng cố định nitơ của loài *Casuarina equisetifolia*, khoảng 143kg/ha/năm. Vi sinh vật cố định nitơ trong các trường hợp này thường là xạ khuẩn thuộc chi *Frankia*.

Ngoài vi khuẩn nốt sần, nhiều loài nấm rễ (khuẩn căn hay mycorrhiza) cũng có khả năng cố định nitơ phân tử. Chẳng hạn các loài nấm rễ phân lập từ các cây thuộc họ Thạch nam (Ericaceae) thường có hoạt tính cố định nitơ là 10,92 - 22,14mg nitơ/lg đường. Có nghiên cứu cho biết nhờ tác dụng của nấm rễ mà đất trồng loài thông *Pinus radiala* ở Mĩ hàng năm có thể được làm giàu thêm khoảng 50kg nitơ/hecta.

2.3. Azospirillum. Năm 1974 lần đầu tiên người ta phân lập được 1 loài xoắn khuẩn sống trên rễ một số cỏ nhiệt đới và đặt tên là *Spirillum lipoferum* (J.Dobereiner, J.M. Day, 1976). Về sau căn cứ vào tỉ lệ các bazơ nitơ trong ADN người ta xác định chúng thuộc về một chi mới, được đặt tên là *Azospirillum*. Xác định ADN của 61 chủng *Azospirillum* người ta chia chi này ra thành 2 loài khác nhau: *A.lipoferum* và *A.brasilense* (J. J.Tarrand, N.R.Krieg, J.Dobereiner, 1978). *Azospirillum* có số lượng khá lớn ở vùng rễ và trong lớp tổ chức ở bề mặt rễ (khoảng $10^6 - 10^7$ tế bào/g rễ khô). Việc nuôi cấy và nhiễm phân vi khuẩn (microbial fertilizer) có chứa các chủng *Azospirillum* có hoạt tính cao có thể làm tăng khá rõ rệt sản lượng ngô, lúa, lúa mì, mía và nhiều loài cỏ chăn nuôi trên cùng một đơn vị diện tích so với đối chứng (không nhiễm).

2.4. Vi khuẩn hiếu khí sống tự do thuộc chi *Azotobacter* và *Beijerinckia*

2.4.1. *Azotobacter*

Azotobacter được phân lập lần đầu tiên vào năm 1901 (M.W.Beijerinck, 1901). Đó là loài *Azotobacter chroococcum*. Về sau người ta tìm thấy nhiều loài khác trong chi *Azotobacter*.

Vi khuẩn thuộc chi *Azotobacter* có tế bào từ hình cầu đến hình que. Khi còn non, tế bào thường có hình que với kích thước khoảng $2,0 - 7,0 \times 1,0 - 2,5\mu m$. Đôi khi chiều dài đạt đến $10 - 12\mu m$. Tế bào sinh sôi nảy nở theo lối phân cắt giản đơn. Di động nhờ tiên mao mọc quanh khắp cơ thể (chu mao). Ngoài tiên mao trên tế bào còn có cả nhiều sợi tiên mao rất nhỏ bé. Lượng ADN trong tế bào *Azotobacter* thường thấp hơn so với nhiều loài vi khuẩn khác (khoảng 0,70 - 0,81%).

Khi già, tế bào *Azotobacter* mất khả năng di động, kích thước thu nhỏ lại nom như hình cầu. Nguyên sinh chất xuất hiện nhiều hạt lớn nhớt. Đó là các hạt volulin, granulozo, các giọt mỡ... Quan sát dưới kính hiển vi ta còn thấy khi già tế bào *Azotobacter* được bao bọc bởi một vỏ nhầy khá dày. Vỏ nhầy của *Azotobacter* chứa khoảng 75% là chất hidrit của axit uronic và chỉ chứa khoảng 0,023% nitơ. Một số loài *Azotobacter* có khả năng tạo thành bào xác.

Trong các bình nuôi cấy có thể thấy xuất hiện những dạng khổng lồ của tế bào *Azotobacter*. Ngược lại cũng có khi xuất hiện những dạng hiển vi nhỏ bé đến $0,2\mu m$, thậm chí đôi khi xuất hiện cả những dạng qua lọc hết sức nhỏ bé. Khi gặp điều kiện thuận lợi, các dạng hiển vi hoặc các dạng qua lọc này lại có thể nhanh chóng phát triển thành các tế bào bình thường.

Trên các môi trường không chứa nitơ khuẩn lạc của *Azotobacter* có dạng nhầy, lồi, đôi khi nhăn nheo. Khi nuôi cấy lâu trên môi trường đặc, khuẩn lạc có màu vàng lục, màu hồng hoặc màu nâu đen (tùy loài *Azotobacter*).

Cho đến nay đã có rất nhiều loài *Azotobacter* đã được miêu tả. Theo nghiên cứu của nhiều tác giả thì phần lớn các loài này không phải là các loài thực sự, mà chỉ là những dạng khác nhau của vài loài mà thôi.

Để phân tập *Azotobacter* người ta có thể sử dụng môi trường thạch Ashby (S.F. Ashby, 1907). Trên môi trường này một số vi khuẩn khác (như *Bacillus oligonitrophilus*, *B. muciliginosus*) cũng có thể phát triển và tạo thành những khuẩn lạc nhảy rất dễ làm cho ta nhầm lẫn với khuẩn lạc của *Azotobacter*. Nhiều khi có một số vi khuẩn chui hẳn vào trong bao nhảy của *Azotobacter* để phát triển. Muốn hạn chế sự phát triển của các vi khuẩn này có thể sử dụng môi trường Ashby nhưng thay thế đường bằng natri benzoat (0,15%) hoặc có thể sử dụng môi trường chứa 1,5% quinoxol và 0,003% levomixetin, cũng có thể sử dụng các bản silica-gel để thay thế cho môi trường thạch.

Phần lớn các chủng *Azotobacter* phân lập được từ thiên nhiên có khả năng cố định được trên 10mg N_2 khi tiêu thụ hết 1g các hợp chất cacbon. Một số chủng *Azotobacter* trong những điều kiện thích hợp có thể đồng hóa được đến 30mg N_2 /1g hợp chất cacbon. Khả năng cố định N_2 của *Azotobacter* không những phụ thuộc từng chủng vi khuẩn mà còn phụ thuộc vào thành phần môi trường nuôi cấy, pH và nhiệt độ nuôi cấy, sự tồn tại của các hợp chất chứa nitơ, tính chất của nguồn thức ăn cacbon, sự có mặt của nguyên tố vi lượng và các chất hoạt động sinh học.

Nhiều nghiên cứu cho biết khi phát triển chung với một số vi sinh vật khác *Azotobacter* sẽ có hoạt động cố định N_2 cao hơn so với khi nuôi cấy riêng. *Azotobacter* sẽ đem một phần nitơ đồng hóa được đưa vào môi trường dưới dạng NH_4 , axit amin hoặc protein.

Ngoài nitơ phân tử *Azotobacter* còn có khả năng đồng hóa muối amon, và ure. Một số chủng *Azotobacter* có khả năng sử dụng nitrit và nitrat. Hai loại axit amin thích hợp nhất đối với nhu cầu dinh dưỡng của *Azotobacter* là axit glutamic và axit asparaginic.

Sự có mặt của muối amon hay nitrat trong môi trường sẽ làm hạn chế sự cố định N_2 của *Azotobacter*.

Về thức ăn cacbon, *Azotobacter* có khả năng đồng hóa, nhiều loại monosaccarit (glucozơ, fructozơ, galactozơ, mannozơ, arabinozơ, xilozơ); disaccarit (saccarozơ, maltozơ, trehalozơ, melibiozơ, lactozơ), trisaccarit (raffinozơ melizitozơ) polisaccarit (tinh bột, dextrin, glicogen, inulin); 2,3 butilenglicol, glixerin, mannit, sorbit, inozit, các oxi axit (lactic, glicolic, saccaric, xuxinic, malic, limonic, glicolic, galactonic, glucuronic, mannonic, glixetinic, piruvic, quinic, butiric, valeric, cepronic); các diaxit (fumaric, maleic, malonic, oxaloaxetic); các hợp chất thơm (benzoic, salixilic, phenol...).

Thực ra thì khả năng đồng hóa các nguồn thức ăn cacbon nói trên không phải là giống nhau ở tất cả các chủng *Azotobacter*. Nhiều tác giả cho biết có không ít các chủng *Azotobacter* không có khả năng đồng hóa lactozơ, mannit hoặc natri benzoat.

Khi đồng hóa glucozơ, *Azotobacter* thường làm tích lũy lại trong môi trường axit piruvic, axit lactic và etanol. Chính vì lí do này cho nên khi phát triển, *Azotobacter* thường làm axit hóa môi trường nuôi cấy.

Azotobacter không có khả năng đồng hóa tốt chất mùn tuy nhiên sự tồn tại của một lượng nhỏ chất mùn trong môi trường sẽ làm kích thích sự phát triển của *Azotobacter*.

Sự phát triển của *Azotobacter* cũng chịu ảnh hưởng rõ rệt của lượng chứa photpho trong môi trường.

Những điều tra tại đất trồng lúa ở nước ta cho thấy khi lượng chứa P_2O_5 của đất 0,06% thì luôn luôn thấy có mật *Azotobacter* trong đất, ngược lại khi lượng chứa P_2O_5 0,02% hầu như không phát hiện thấy sự có mặt của *Azotobacter* trong đất. Bổ sung phân lân vào đất có thể làm tăng cường rõ rệt hoạt động cố định nitơ của *Azotobacter* và do đó làm nâng cao lượng chứa nitơ trong đất (Nguyễn Lân Dũng, 1968).

Một số nghiên cứu cho biết hoạt động cố định nitơ của *Azotobacter* chỉ được bắt đầu xảy ra khi nồng độ PO_4^{3-} đạt đến 4mg trong 100ml môi trường. Ngược lại khi nồng độ PO_4^{3-} đạt tới 800mg/100ml thì quá trình cố định nitơ sẽ bắt đầu bị ngừng lại. Sự mẫn cảm mạnh mẽ của *Azotobacter* với photpho đã cho phép người ta sử dụng chúng như loại vi khuẩn chỉ thị để xác định nhu cầu về photpho của đất.

K cũng rất cần thiết đối với sự phát triển của *Azotobacter* nhưng với số lượng nhỏ hơn nhiều. Nếu đưa vào môi trường một lượng muối kali quá thừa thì chúng sẽ làm ức chế sự phát triển của *Azotobacter*, có thể tác hại này là do gốc anion của các muối này gây ra.

Ca cũng có ảnh hưởng lớn đối với sự phát triển của *Azotobacter*. Những điều tra ở Việt Nam cho thấy trong các đất có lượng chứa CaO cao hơn 0,4% luôn luôn thấy có một số lượng lớn các tế bào *Azotobacter*, ngược lại hầu như không phát hiện thấy chúng trong các mẫu đất có lượng chứa CaO dưới 0,25% (Nguyễn Lan Dũng, 1965).

Khi thiếu canxi, tế bào *Azotobacter* sẽ tạo thành nhiều không bào, ảnh hưởng xấu đối với việc tổng hợp ATP và sự tạo thành các poliphosphat.

Đối với *A. chroococcum* nồng độ CaCl_2 thích hợp nhất là khoảng 0,01%, nếu cao hơn sẽ ảnh hưởng không tốt đối với hoạt động cố định nitơ của chúng. Nhưng có nghiên cứu lại cho biết ngay cả những liều lượng cao của canxi cacbonat cũng không làm ức chế hoạt động cố định nitơ của *Azotobacter*. Ý nghĩa sinh lí của canxi đối với *Azotobacter* thực ra còn chưa được nghiên cứu một cách đầy đủ. Cũng có tác giả đã dùng *A. chroococcum* như một loài vi khuẩn chỉ thị để xác định nhu cầu về với của đất.

Mg được *Azotobacter* đòi hỏi với số lượng cao hơn sắt khoảng 10 lần. Trong các nguyên tố vi lượng cần thiết đối với *Azotobacter* thì đáng chú ý hơn cả là Mo, V, B, Mn,...

Mo có tác dụng làm tăng cường sự phát triển của *Azotobacter* cũng như làm tăng cường quá trình cố định N_2 của chúng. Một số nghiên cứu cho biết nhu cầu về Mo của *A. chroococcum* là 10 - 100mg Na_2MoO_4/l , của *A. agile* và *A. vinelandii* là 5mg Na_2MoO_4/l .

B cũng có tác dụng tương tự như Mo. Một số tác giả cho biết nồng độ B thích hợp nhất đối với sự phát triển của *Azotobacter* là 2mg/l nuôi cấy dịch thể hoặc 3 - 5mg/l (nuôi cấy trong đất).

Mn làm tăng cường sự phát triển của *Azotobacter* (cả trên môi trường có chứa hợp chất nitơ lẫn môi trường không chứa nitơ). Có tác giả cho biết Mn không phải là nguyên tố có liên quan đối với quá trình cố định N_2 . Nhu cầu về Mn của *A. chroococcum*

là vào khoảng 20 - 30mg/l. Nhu cầu về Mn của *A. beijerinckii* và *A. vinelandii* chỉ vào khoảng 10 - 15mg/l. Sự có mặt của Mn có thể thay thế một phần sự có mặt của Mg.

Nhiều ý kiến không giống nhau về nhu cầu của *Azotobacter* đối với Cu. Một số tác giả cho biết ngay cả ở những nồng độ rất nhỏ, Cu đã ảnh hưởng xấu đối với sự phát triển của *Azotobacter*. Trong khi đó nhiều tác giả khác lại cho rằng Cu là nguyên tố vi lượng cần thiết đối với *Azotobacter*. Có tác giả cho rằng Cu rất cần thiết đối với việc tạo thành sắc tố nâu đen của *A. chroococcum*.

Nhu cầu của *A. chroococcum* đối với V thay đổi trong khoảng 0,2 - 15mg $\text{NaVO}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ /l môi trường.

Còn có các tài liệu nhắc đến tác dụng dương tính của các nguyên tố vi lượng khác đối với sự phát triển của *Azotobacter*. Trong số đó có Co.

As ở nồng độ rất nhỏ (10 - 20mg muối As trong 1 kg đất) có tác dụng kích thích sự phát triển của *Azotobacter*.

Nhiều nguyên tố vi lượng khác có ảnh hưởng xấu đối với sự phát triển của *Azotobacter*. Br dẫn đến việc ức chế quá trình cố định N_2 , Al làm ức chế sự phát triển của *Azotobacter*.

Một số nguyên tố phóng xạ (như Rd, Th, U...) ở một nồng độ rất nhỏ có thể kích thích sự phát triển và sự cố định N_2 của *Azotobacter*.

Azotobacter có khả năng tự túc về các chất sinh trưởng khác nhau : tiamin (vitamin B_1), riboflavin (vitamin B_2), xianocobalamin (vitamin B_{12}), axit nicotinic, axit pantotenic, axit folic, biotin, heteroauxin (axit - β -indolaxetic), gibberellin.

Một số chủng *Azotobacter chroococcum* còn có khả năng sinh ra một số chất chống nấm có phổ tác dụng khá rộng (ức chế *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Alternaria*...).

Nhiều nghiên cứu cho biết *Azotobacter* có thể phát triển được trên các môi trường có pH trong khoảng 4,5 - 9,0. Tuy nhiên quá trình cố định nitơ chỉ được thực hiện trong một phạm vi pH khá hẹp, khoảng 5,5 - 7,2 (đôi khi đến 7,7).

Các loài *Azotobacter* khác nhau (thậm chí các chủng khác nhau có thể lẫn lộn) một cách khác nhau đối với pH của môi trường. Nhiều nghiên cứu cho biết pH thấp nhất của môi trường đối với *A. chroococcum* và *A. beijerinckii* là khoảng 5,5 đối với *A. macrocytogenes* là khoảng 4,6.

pH thích hợp nhất đối với *Azotobacter* là 7,2 - 8,2.

Theo một số tác giả thì sinh khối *A. chroococcum*, *A. agile*, *A. vinelandii* đạt tới mức cao nhất khi nuôi cấy ở phạm vi pH = 6,5 - 6,7. *Azotobacter* thường ít thấy có trong các đất có pH thấp hơn 5,6 - 5,8. Cũng có thể phân lập được từ đất chua một số chủng *Azotobacter* nhưng các chủng này thường đã mất khả năng cố định nitơ phân tử.

Các điều tra ở đất Việt Nam (Nguyễn Lân Dũng, 1960, 1964, 1969) cho biết khi pH đất thấp hơn 5,5 sự phát triển của *Azotobacter* bị hạn chế một cách rất rõ rệt. Trong khi đó ở các đất có pH trung tính *Azotobacter* luôn luôn có từ hàng nghìn đến hàng vạn tế bào trong mỗi gam đất khô.

Azotobacter thuộc loại vi khuẩn có khả năng chịu được những nồng độ muối khá cao. Người ta nhận thấy *Azotobacter* có thể phát triển được ngay cả trong các môi trường có chứa 2,5 - 3% NaCl. Có tài liệu cho biết *Azotobacter* có thể phát triển được cả ở những môi trường chứa đến 10,27% $MgSO_4$.

Rất nhiều tác giả đã chứng minh tính chất phổ biến của *Azotobacter* trong các vùng đất mặn.

Người ta đã phân lập được những chủng *Azotobacter* ưa mặn. Nồng độ NaCl thích hợp nhất đối với chúng là 3 - 5%. Chúng có thể chịu đựng được ngay đến cả nồng độ 9% NaCl.

Trong nước biển và bùn biển cũng thường thấy có *Azotobacter* ưa mặn. Chúng có thể cố định N_2 ngay cả ở nồng độ 3% NaCl.

Azotobacter thuộc loại vi khuẩn hiếu khí nhưng chúng có thể phát triển được cả trong các điều kiện vi hiếu khí. Quá trình cố định nitơ của *Azotobacter* bị giảm xuống khi thế oxi hóa khử của môi trường cao quá + 200mV hoặc thấp quá - 200mV. Như vậy là không khí quá mạnh cũng làm ức chế quá trình cố định nitơ phân tử. Có thí nghiệm đã cho biết khi nồng độ oxi trong không khí là 4% thì quá trình cố định nitơ vượt quá gấp ba lần so với khi nồng độ oxi là 10 - 20%.

Để phát triển thuận lợi *Azotobacter* đòi hỏi một độ ẩm khá cao của đất. Nhu cầu về độ ẩm của chúng tương tự như nhu cầu của cây trồng. Tuy vậy bào xác của *Azotobacter* vẫn có thể chịu đựng được rất lâu dài đối với sự khô cạn của đất.

Nhiệt độ thích hợp nhất đối với sự phát triển của *Azotobacter* vào khoảng 26 - 30°C. Ở vùng nhiệt đới người ta nhận thấy *Azotobacter* thích hợp với những nhiệt độ cao hơn nữa. Ví dụ như một số chủng phân lập ở Ấn Độ thích hợp nhất với nhiệt độ 35 - 40°C. Ở nhiệt độ 7°C người ta nhận thấy *Azotobacter* có hoạt động cố định nitơ thấp hơn 5 lần so với ở nhiệt độ 45°C. Tế bào sinh dưỡng của *Azotobacter* không sống được khi xử lý ở 50°C trong 30 phút, ở 80°C sẽ chết rất nhanh.

Sự phát triển và cố định nitơ của *Azotobacter* trong đất còn chịu ảnh hưởng mật thiết của khu hệ các vi sinh vật đất. Bên cạnh các nhóm vi sinh vật có ảnh hưởng tốt đối với sự phát triển của *Azotobacter* (tổng hợp các chất hoạt động sinh học, phân giải các thức ăn hữu cơ bền vững) còn có nhiều nhóm vi sinh vật có khả năng làm ức chế sự phát triển của *Azotobacter* (cạnh tranh thức ăn, sản sinh chất kháng sinh...). Người ta cũng đã phát hiện thấy sự phá hủy tế bào *Azotobacter* của một số loại thực khuẩn thể.

Đã có rất nhiều công trình nghiên cứu đề cập đến mối quan hệ giữa *Azotobacter* và cây trồng. *Azotobacter* thường xuyên có mặt trong vùng rễ cây trồng với số lượng cao hơn nhiều so với ngoài vùng rễ. Số lượng của chúng còn biến đổi phụ thuộc vào từng loài cây, từng giai đoạn phát triển của cây và nhiều yếu tố sinh thái - địa lý khác. Người ta đã chứng minh được rằng *Azotobacter* không phát triển trên bề mặt rễ mà phát triển trong đất xung quanh rễ (vùng rễ).

Azotobacter có tác dụng làm tăng cường thức ăn nitơ cung cấp cho cây trồng. Trung bình khi tiêu thụ hết 1g các chất sinh năng lượng, *Azotobacter* có khả năng đồng hóa được khoảng 10 - 15mg nitơ phân tử. Cây vui rơm rạ hoặc bón phân xanh

vào cho ruộng sẽ góp phần cung cấp nguồn năng lượng cho *Azotobacter* và thông qua hoạt động của *Azotobacter* mà làm giàu thêm nitơ cho đất. Các biện pháp kĩ thuật như bón vôi để trung hòa đất, bón phân lân, tưới nước, làm ải, phơi đất... đều làm tăng cường rõ rệt sự phát triển và hoạt động cố định nitơ của *Azotobacter* trong đất.

Tác dụng của *Azotobacter* đối với cây trồng còn được chứng minh ở khả năng kích thích sinh trưởng của chúng. Những thí nghiệm nhiễm dịch nuôi cấy *Azotobacter* lên hạt cho thấy có khả năng làm nâng cao rõ rệt tỉ lệ nảy mầm cũng như tốc độ phát triển của mầm hạt. Người ta cho rằng sở dĩ có tác dụng này là do *Azotobacter* có khả năng làm tích lũy trong môi trường nuôi cấy nhiều loại chất hoạt động sinh học có giá trị. Một số nghiên cứu cho biết khi trong môi trường tích lũy được khoảng 1g tế bào *Azotobacter* (tính theo chất khô) thì cũng là đã tích lũy được 50 - 100 γ tiamin, 240 - 600 γ axit nicotinic, 600 γ axit pantotenic, khoảng 6 γ piridoxin, 3-12 γ biotin. *Azotobacter* còn có khả năng tổng hợp các chất sinh trưởng loại auxin và gibberelin.

Một số nghiên cứu còn xác định là *Azotobacter* có cả khả năng tổng hợp ra một số chất chống nấm, khả năng này không giống nhau ở các chủng *Azotobacter*.

Trong nhiều năm ở nhiều nước khác nhau, người ta đã sản xuất ở quy mô công nghiệp hoặc thủ công nghiệp những chế phẩm *Azotobacter* và gọi là Azotobacterin. Đó là những dịch nuôi cấy *Azotobacter* được hấp thụ vào than bùn hoặc các loại đất giàu chất hữu cơ đã trung hòa và bổ sung thêm một ít phân photpho, kali... Khác với nitragin, loại phân *Azotobacter* khi dùng để bón cho cây trồng thường đưa đến những hiệu quả không lớn và không ổn định (nếu có làm tăng sản lượng thường cũng không tăng quá 10% so với đối chứng). Đa số các tác giả cho rằng hiệu quả của việc sử dụng *Azotobacter* chỉ tương đối rõ đối với các loại đất giàu chất hữu cơ hoặc trong trường hợp được bón thêm nhiều phân khoáng. Có lẽ tác dụng chủ yếu của chúng không phải ở khía cạnh cố định nitơ mà là ở khía cạnh tổng hợp các chất hoạt động sinh học có tác dụng kích thích sự sinh trưởng của cây trồng.

Trong điều kiện ở nước ta, một số nghiên cứu đã cho biết nhân tố chủ yếu hạn chế sự phát triển của *Azotobacter* trong đất là pH, hàm lượng canxi và hàm lượng photpho. Chỉ cần bón vôi và bón phân lân đã đủ làm tăng nhanh chóng số lượng *Azotobacter* trong đất. Biện pháp sản xuất và sử dụng chế phẩm *Azotobacter* chỉ nên đặt ra trong những điều kiện thâm canh có khả năng đối dào về phân bón.

2.4.2 *Beijerinckia*

Beijerinckia là một vi khuẩn hiếu khí cố định nitơ rất giống với *Azotobacter*. Năm 1939 Stacke (R.J. Starkey) phân lập được từ đất vi khuẩn chịu chua cố định nitơ và gọi là *Azotobacter indicum*. Năm 1950, Decx (H.G. Derx) cũng tìm thấy loại vi khuẩn này nhưng cho rằng chúng thuộc về một chi mới là chi *Beijerinckia*.

Đặc điểm chung của các vi khuẩn thuộc chi *Beijerinckia* là chịu chua cao hơn nhiều so với *Azotobacter* (có thể phát triển được ngay cả trong các môi trường có pH = 3,0). Tế bào của chúng có hình dạng thay đổi (hình cầu, hình trái xoan, hình que), khi già có thể tạo nên những hình thái rất khác thường. *Beijerinckia* thuộc loại vi khuẩn G⁻, khi quan sát dưới kính hiển vi có thể thấy ở hai đầu tế bào có những hạt bất màu với thuốc nhuộm Xudăng III, không sinh bào xác và bào tử. *Beijerinckia* phát triển

chậm trên môi trường nuôi cấy (thời kì dài đến 3 - 15 ngày) khuẩn lạc điển hình thường được tạo thành sau khi nuôi cấy ở 30°C qua ba tuần lễ. Khi phát triển trên các môi trường vô đạm chứa glucoso, *Beijerinckia* thường tạo thành những khuẩn lạc lồi và rất nhảy, khi già mới tạo sắc tố.

Vi khuẩn thuộc chi *Beijerinckia* thường có thể cố định được 16 - 20mg nitơ phân tử khi đồng hóa hết 1g các chất sinh năng lượng. Một số nghiên cứu cho biết năng lực cố định nitơ của *B. indica*, *B. fluminensis* được tăng lên nhiều khi có mặt loài nấm men *Lipomyces starkey*. *Beijerinckia* thuộc loại vi khuẩn hiếu khí bắt buộc. Chúng đồng hóa tốt các loại monosaccarit, disaccarit và tinh bột, ít đồng hóa axit hữu cơ. Khác với *Azotobacter*, *Beijerinckia* không đồng hóa các hợp chất thơm (như benzoat natri, a. benzoic...).

Khả năng đồng hóa N- NH_4 , N - NO_3 và nhiều axit amin ở *Beijerinckia* còn cao hơn cả khả năng đồng hóa nitơ phân tử.

Beijerinckia bắt đầu phát triển được khi nồng độ PO_4^{3-} trong 100ml môi trường có từ 0,2mg trở lên (trong khi *Azotobacter* đòi hỏi 4,0mg PO_4^{3-} trở lên). Để phát triển và cố định nitơ, *Beijerinckia* không đòi hỏi canxi (khác với *Azotobacter*). Một lượng nhỏ canxi (22,5 phần triệu CaCl_2) đã đủ làm ức chế sự phát triển của *Beijerinckia*. pH thích hợp nhất đối với *Beijerinckia* là 4,5 - 6,0, nhiều loài *Beijerinckia* ngay ở pH = 3,0 vẫn phát triển được. Khi pH = 7,0 sự phát triển của *Beijerinckia* bị ức chế một cách rõ rệt (trong khi đó *Azotobacter* thường không phát triển được ở pH thấp hơn 5,5 trừ một vài loại đặc biệt như *A. macrocytogenes* hay *A. beijerinckia acidotolerans*). *Beijerinckia* có thể phát triển được trong phạm vi nhiệt độ 16 - 37°C (đối với *Azotobacter* là 16 - 45°C). Chúng có khả năng giữ sức sống khá lâu ở 0°C hoặc các nhiệt độ thấp hơn nữa. Một số nghiên cứu cho biết thời kì tiềm phát là ngắn nhất khi nuôi cấy *Beijerinckia* ở nhiệt độ 30 - 35°C và ở pH = 4,5 - 5,3.

Vi khuẩn thuộc chi *Beijerinckia* phân bố rộng rãi trong các đất vùng nhiệt đới hoặc á nhiệt đới. Người ta đã phát hiện thấy chúng ở Ấn Độ, ở Malaysia ở Indônêxia, ở Nhật Bản, ở Trung Quốc, ở Madagasca, ở Tangianica, ở Bắc Úc, ở Braxin, ở Bắc Phi và Nam Phi. Ở Việt Nam đã phát hiện thấy sự tồn tại của *Beijerinckia* trong một mẫu đất của vùng Lào Cai, đáng chú ý là loài *Beijerinckia* này mang một số đặc tính khác với các loài *Beijerinckia* thông thường.

Nghiên cứu của J.H. Becking (1961) cho biết trong số 155 mẫu đất thu thập ở châu Âu chỉ có hai mẫu được phát hiện thấy có *Beijerinckia*, nhưng trong số 53 mẫu đất thu thập ở châu Phi có tới 30 mẫu có chứa *Beijerinckia*.

Một số nghiên cứu cho biết sự tồn tại của *Beijerinckia* có thể được coi là một chỉ thị cho quá trình laterit hóa của đất.

So với *Azotobacter*, *Beijerinckia* có nhu cầu nhỏ hơn nhiều đối với Mg (khoảng 20 lần nhỏ hơn) đối với Mo (nồng độ Mo thích hợp nhất chỉ vào khoảng 0,004 - 0,034mg/l).

Beijerinckia có thể chịu đựng được các nồng độ cao của muối sắt (đến 2 g/l) và muối nhôm (đến 80mg/l).

Beijerinckia thường phát triển trong lớp đất cây (0 - 20cm), nhưng cũng có khi phát hiện thấy sự phát triển của *Beijerinckia* ở cả các lớp đất sâu hơn. Nhiều tác giả còn quan sát thấy lối sống biểu sinh (epiphyte) của *Beijerinckia* trên lá nhiều loại cây nhiệt đới.

Ngoài ý nghĩa kinh tế do có khả năng cố định nitơ phân tử, *Beijerinckia* còn đáng chú ý cả ở chỗ chúng có thể tổng hợp ra một số chất hoạt động sinh học có tác dụng kích thích sự sinh trưởng của cây trồng và do đó chúng làm tăng sản phẩm hai pha khác nhau của quá trình lên men. Chẳng hạn *C. acetobutylicum* thường làm tích lũy trong pha đầu axit axetic, axit butiric và trong pha sau butanol, axeton và etanol.

2.4.3. Vi khuẩn kỵ khí sống tự do thuộc chi *Clostridium*

Năm 1893 lần đầu tiên X.N. Vinogradski phát hiện được một loài vi khuẩn kỵ khí sống tự do có khả năng cố định nitơ phân tử. Đó là loài *Clostridium pasteurianum*.

Tế bào của *C. pasteurianum* có kích thước khoảng $2,5 - 7,5 \times 0,7 - 1,3 \mu m$, có thể đứng riêng rẽ, xếp thành đôi hay xếp thành chuỗi ngắn. Khi còn non có tế bào chất đồng đều, có khả năng di động. Khi già, tế bào chất có cấu tạo hạt, tế bào mất khả năng di động. Bào tử thường có hình bầu dục hay hình kéo dài nằm ở giữa hay gần một đầu của tế bào. Bào tử có kích thước lớn hơn bề rộng của tế bào dinh dưỡng do đó khi mang bào tử tế bào thường có hình con thoi. Kích thước của bào tử khoảng $1,3 \times 1,6 \mu m$.

Hiện nay ngoài loài *C. pasteurianum*, người ta còn nhận thấy có nhiều loài *Clostridium* khác cũng có khả năng cố định nitơ phân tử. Đó là các loài *C. butyricum*, *C. butylicum*, *C. beijerinckia*, *C. aceticum*, *C. multifementans*, *C. pectinovorum*, *C. acetobutylicum*, *C. felsineum*,

C. kluyveri, *C. lactoacetophilum*, *C. madisonii*. Sự khác nhau về các đặc điểm hình thái và sinh lý giữa các loài này có thể được thấy rõ trong khóa phân loại của Bergey.

Vi khuẩn thuộc loài *C. pasteurianum* thường có hoạt tính cố định nitơ cao hơn các loài *Clostridium* khác. Khi đồng hóa hết 1g thức ăn cacbon, chúng thường tích lũy được khoảng 5 - 10mg nitơ. Khả năng cố định nitơ của các loài trong chi *Clostridium* còn phụ thuộc rất nhiều vào các điều kiện nuôi cấy.

Clostridium có khả năng đồng hóa các monosaccarit, disaccarit và một số polisaccarit (như tinh bột, dextrin). Chúng có thể đồng hóa cả nhiều rượu bậc cao và một số hợp chất chứa cacbon khác nữa. Khi lên men hydrat cacbon, *Clostridium* thường làm tích lũy axit hữu cơ, butanol, etanol, axeton CO_2 , H_2 Thành phần và tỉ lệ của các sản phẩm lên men phụ thuộc vào từng loài vi khuẩn cũng như phụ thuộc vào hai pha khác nhau của quá trình lên men. Chẳng hạn *C. acetobutylicum* thường làm tích lũy trong pha đầu axit axetic, axit butiric và trong pha sau butanol, axeton và etanol.

C. pasteurianum cũng như nhiều loài *Clostridium* có khả năng cố định nitơ khác có thể phát triển được trong một phạm vi pH khá rộng (pH = 4,7 - 8,5). Tùy từng nghiên cứu mà pH thích hợp nhất đối với sự phát triển của *Clostridium* là 5,9 - 8,3 hay là 6,9 - 7,3. Các nghiên cứu ở Việt Nam cho biết ngay cả ở những vùng đất chua, khi không tìm thấy sự phát triển của *Azotobacter* thì *Clostridium* vẫn có mặt với số lượng đáng kể. Nói chung trong môi trường đất trồng lúa trên miền Bắc nước ta số

lượng vi khuẩn nhóm này thường có từ hàng vạn đến hàng triệu tế bào. Số lượng của chúng trong vùng rễ cây trồng bao giờ cũng nhiều hơn ngoài vùng rễ. *Clostridium* thường tập trung nhiều trong lớp đất cây nhưng ngay ở độ sâu 75cm vẫn có thể thấy có hàng nghìn tế bào trong mỗi gam đất (Nguyễn Lân Dũng, 1960, 1969).

Bào tử của *Clostridium* có sức đề kháng rất cao đối với nhiệt độ cao và sự khô hạn. Một số nghiên cứu cho biết bào tử của loại vi khuẩn này có thể sống được đến 5 giờ ở nhiệt độ 75°C và 1 giờ ở nhiệt độ 80°C. Bào tử của một số chủng *Clostridium* chịu nhiệt ngay ở nhiệt độ 100°C vẫn có thể sống được đến 30 phút.

Đã có rất nhiều thí nghiệm sử dụng chế phẩm *Clostridium pasteurianum* (dịch nuôi cấy, hoặc dịch nuôi cấy trộn với đất đã khử trùng) để bón cho cây trồng. Trong một số trường hợp đã thu được những hiệu quả dương tính khá rõ rệt (nhất là khi phối hợp sử dụng với Azotobacterin). Tuy nhiên hiệu quả này thường không ổn định và cho đến nay người ta vẫn chưa giải thích được một cách dứt khoát là trong các trường hợp có tác dụng dương tính thì chủ yếu là do sự cố định nitơ hoặc là do sự tích lũy các chất có hoạt tính sinh học.

2.5. Vi khuẩn lam sống tự do và vi khuẩn lam cộng sinh trong bèo hoa dâu

Các nhận xét đầu tiên về khả năng cố định nitơ của vi khuẩn lam (B. Frank, 1889 ; Beijerinck, 1901, B. Heize, 1906) chưa được thừa nhận ngay bởi vì khi đó việc tách vi khuẩn lam ra dưới dạng thuần khiết còn gặp nhiều khó khăn.

Năm 1928 nhà khoa học Đức Drius (Von K. Drewes) lần đầu tiên chứng minh một cách xác đáng khả năng cố định nitơ của ba loài vi khuẩn lam đã được phân lập và nuôi cấy một cách thuần khiết. Thí nghiệm này đã mở đầu cho hàng loạt thí nghiệm của rất nhiều các nhà khoa học khác.

Những thí nghiệm với nitơ đồng vị phóng xạ (N^{15}) càng chứng minh chắc chắn cho khả năng cố định nitơ không khí của nhiều loại vi khuẩn lam sống trong nước và trong đất.

Tùy thuộc vào các điều kiện thổ nhưỡng và khí hậu mà loại vi khuẩn lam có khả năng cố định nitơ chiếm ưu thế ở từng vùng khác nhau là không giống nhau. Một số nghiên cứu cho biết loài vi khuẩn lam có khả năng cố định nitơ mạnh nhất ở các ruộng lúa Ấn Độ là *Aulosira fertilissima*, ở các ruộng lúa Nhật Bản là *Tolypothrix tenuis*. Các loài vi khuẩn lam có ý nghĩa nhiều nhất ở các ruộng lúa vùng Trung Á lại thuộc về chi *Cylindrospermum* ở ruộng lúa Trung Quốc là *Anabaena azotica*, trong khi đó loài vi khuẩn lam quan trọng ở các vùng đất phía Nam phần thuộc lãnh thổ Châu Âu của Liên Xô (cũ) lại là *Gloetrichia natans*.

Đa số các loài vi khuẩn lam có khả năng cố định nitơ sống tự do trong đất và trong nước, nhưng cũng có một số ít loại có đời sống cộng sinh với thực vật. Chẳng hạn các dạng cộng sinh với nấm trong một số loài địa y. Một số loài tảo lam cố định nitơ có đời sống nội sinh (endophyte) trong các xoang của Địa tiên (Rêu tản, Hepaticae) hoặc còn gặp ở cả một số loài Dương xỉ (*Polypodium*), một số các loài Tuế (Cycadales).

Đặc biệt đáng chú ý là loài *Anabaena azollae* cộng sinh trong bèo hoa dâu một loại cây dùng làm phân xanh và làm thức ăn gia súc có ý nghĩa kinh tế rất lớn ở nước ta.

Bèo hoa dâu là một loài Dương xỉ thuộc chi *Azolla* (họ Azollaceae, bộ Hydropteridales, lớp Filicineae, ngành Pteropsida). Chi *Azolla* có khoảng 6 loài.

- *Azolla filiculoides* L. (*Azolla japonica*)
- *Azolla caroliniana* Willd
- *Azolla mexicana* Prest
- *Azolla microphylla* Kaulfuss
- *Azolla nilatica* De caisne
- *Azolla pinnata* R. Brauw (*Azolla imbricata* Nakai)

Loài bèo hoa dâu phổ biến ở Việt Nam là thuộc loài cuối cùng nói trên.

Khi cắt một lát mỏng ngang qua mỗi "phiến lá" của bèo hoa dâu rồi đem quan sát dưới kính hiển vi ta sẽ thấy trong khoang khí của chúng có chứa rất nhiều các sợi vi khuẩn lam thuộc loài *Anabaena azollae* trông giống như những chuỗi hạt. Bên cạnh các tế bào hình trụ ngắn xếp nối tiếp nhau thỉnh thoảng thấy có một dị tế bào có kích thước lớn hơn so với các tế bào khác. Về sau dị tế bào sẽ tiêu biến dần nội chất trở thành chỗ để sợi tảo tách ra và phát triển thành những sợi tảo mới.

Ngoài dạng cộng sinh với bèo hoa dâu một số loài vi khuẩn lam (như *Nostoc punctiforme*) còn có thể cộng sinh trong các nốt sần của loài cỏ ba lá *Trifolium alexandrinum*. Có nghiên cứu còn cho biết vi khuẩn *Caulobacter* sp. bản thân không có khả năng cố định nitơ nhưng khi sống trong bao nhầy của *Nostoc* lại có thể làm tăng gấp đôi năng lực cố định nitơ của loài vi khuẩn lam này. Một số vi khuẩn khác (*B. megaterium*, *Agrobacterium radiobacter*...) cũng có khả năng kích thích hoạt động cố định nitơ của *Nostoc*.

Ngược lại, sự phát triển của vi khuẩn lam cũng làm thúc đẩy sự phát triển của nhiều loài vi khuẩn khác sống trong đất, bao gồm cả các vi khuẩn cố định nitơ *Azotobacter*, *Rhizobium*, *C. pasteurianum*...

Đa số các loài vi khuẩn lam có khả năng cố định nitơ thích hợp phát triển trong các môi trường trung tính hoặc kiềm. pH thích hợp nhất đối với *Hapalosiphon fotinalis*, *Anabaena variabilis*, *Calothrix clenkinii* là 7,0 - 8,0, đối với *Anabaena flos-aquae* là 7,0 - 7,5, còn đối với *Microcystis aeruginosa* lại là 9,0.

Vi khuẩn lam là loại vi sinh vật hiếu khí, điều kiện Eh tốt nhất đối với sự phát triển của chúng là trên 400mV. Nhiệt độ thích hợp nhất đối với chúng là khoảng 28 - 30°. Cũng có một số loài vi khuẩn lam làm cố định nitơ thuộc loài chịu nhiệt, chẳng hạn như *Mastigocladus laminosus*, *Anabaena flos-aquae*...

Bổ sung vào đất các chất hữu cơ giàu cacbon (rơm rạ...), phân photpho và phân kali là những biện pháp rất tích cực để đẩy mạnh sự phát triển của vi khuẩn lam và làm tăng cường hoạt động cố định nitơ của chúng. Trong số các nguyên tố vi lượng cần thiết đối với sự phát triển và đối với hoạt động cố định nitơ của vi khuẩn lam đáng chú ý hơn cả Mo, B, Co, Mn, V...

Nhu cầu ánh sáng của các loài vi khuẩn lam khác nhau là không giống nhau. Đối với các loài thuộc giống *Stratonostoc* và *Amorphonostoc* người ta nhận thấy hoạt động cố định nitơ sẽ đạt tới mức cao nhất khi chiếu sáng (12.000 - 24.000 lux) theo chế độ 8 giờ mỗi ngày.

Nồng độ CO₂ thích hợp nhất đối với các loài vi khuẩn lam cố định nitơ phụ thuộc vào nhiệt độ của môi trường. Đối với *Anabaena cylindrica* chẳng hạn, ở 15°C nồng độ CO₂ thích hợp nhất là 0,1%, nhưng ở nhiệt độ 20°C hay cao hơn thì nồng độ CO₂

thích hợp nhất lại là 0,25%. Nếu nâng nồng độ CO_2 lên đến 0,5% trở lên sẽ làm ức chế sự phát triển của vi khuẩn lam cố định nitơ.

Nhờ sự phát triển của vi khuẩn lam trong ruộng lúa mà hàng năm mỗi hecta đất trồng lúa có thể lấy được thêm từ không khí khoảng 15 - 50kg nitơ, trung bình là 20 - 25kg, đôi khi thu được đến 80kg hay hơn nữa.

Ngoài biện pháp bón phân (nhất là phân lân) và trung hòa đất để đẩy mạnh hoạt động của khu hệ vi khuẩn lam cố định nitơ có sẵn trong ruộng, từ lâu người ta đã chú ý đến biện pháp nuôi cấy một số vi khuẩn lam có hoạt tính cố định nitơ cao để bón thêm vào cho đất. Hiệu quả của biện pháp này thường không ổn định, nhưng không ít trường hợp hiệu quả thu được là khá rõ rệt.

Rõ ràng đây là một hướng nghiên cứu rất đáng chú ý đối với một nước trồng lúa là chủ yếu, có khí hậu và mức độ chiếu sáng rất thích hợp như nước ta. Tuy nhiên, để có thể đưa được một số lượng lớn giống vi khuẩn lam vào ruộng và đảm bảo đầy đủ được các điều kiện làm cho chúng trở nên chiếm ưu thế trong ruộng không phải là không có nhiều khó khăn đáng kể.

Biện pháp sử dụng tập đoàn cộng sinh "vi khuẩn lam - bèo hoa dâu" nói chung thuận lợi hơn nhiều. Trong điều kiện nước ta bèo hoa dâu có thể coi là loại cây phân xanh và cây thức ăn gia súc hết sức quý giá.

Bèo hoa dâu phát triển hết sức nhanh chóng mà không cần sử dụng đến các loại thức ăn nitơ có trong ruộng. Các thí nghiệm nuôi cấy bèo hoa dâu trên các môi trường không chứa nitơ cho thấy việc bổ sung nitơ sẽ làm hạn chế tốc độ phát triển cũng như tốc độ tích lũy nitơ trong sinh khối của bèo (Nguyễn Lân Dũng, 1969, Võ Minh Kha, Trần Quang Thuyết 1970).

Bèo hoa dâu có chứa khoảng 0,25% nitơ, trên mỗi hecta đất nếu dùng để nuôi bèo quanh năm có thể thu được tới 200 - 360 tấn chất xanh, và như vậy là tương đương với khối lượng nitơ của 2500 - 4500 kg sunphat amon. Thật khó có loại cây phân xanh nào đạt được như vậy. Bèo hoa dâu có thể sống chung với lúa, có thể khống chế dễ dàng để cho lụi đi khi cần thiết, có thể phân giải nhanh trong đất, ngoài ra còn có cả tác dụng chống cỏ dại, chống hạn, chống nóng cho lúa mùa, chống rét cho lúa chiêm và lúa xuân.

Trên đất dùng để sản xuất thức ăn gia súc nếu dùng để thả bèo hoa dâu và chăm sóc tốt thì mỗi hecta mỗi tháng trung bình có thể cho ta 30 - 40 tấn bèo tươi, tương đương với 4500 - 6000 đơn vị thức ăn (chứa 450 - 720 kg protein tiêu hóa). Khác với tất cả các loài thực vật khác, bèo hoa dâu do cộng sinh với vi khuẩn lam nên chứa một lượng đáng kể vitamin B_{12} khoảng 70γ/kg (tính theo khối lượng khô).

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

- Nhiệt độ : 20 - 30°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 hòa đất.
- Ngăn bèo và san bèo kịp thời để bèo luôn sát cánh mà không đè lên nhau.
- Bảo đảm việc triệt để phòng trừ các loại sâu hại bèo.

CÁC NHÓM VI SINH VẬT KHÁC CÓ KHẢ NĂNG CỐ ĐỊNH NITƠ

Ngoài các nhóm vi sinh vật cố định nitơ chủ yếu nói trên người ta còn phát hiện thấy rất nhiều vi sinh vật thuộc các nhóm phân loại khác, ít nhiều cũng có khả năng đồng hóa nitơ phân tử trong không khí.

Những sinh vật này thuộc về các loài sau đây :

1. Họ Pseudomonadaceae : *Azotomonas insolita* ; *A. fluorescens* ; *Pseudomonas azotocolligans* ; *P. azotogensis* ; *P. methanitificans* ; *P. non-liquefaciens* ; *P. herbicola*. Nhiều loại *Pseudomonas* sp.

2. Họ Spirillaceae

Spirillum lipoferum, *S. azotocolligans*, *S. magnum*, *S. speciosum*, *S. nana*, *Vibrio frequens*, *V. hydrosulfureus*, *V. nonhydrosulfurus*, *Desulfovibrio desulfuricans*, *Desulfovibrio* sp.

3- Họ Azotobacteriaceae :

- *Derxia gummosa*, *D. indica*

4. Họ Rhizobiaceae.

Agrobacterium radiobacter

5. Họ Achromobacteraceae :

- *Achromobacter parbutus*, *A. hartlebii*

6. Họ Enterobacteriaceae :

- *Aerobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella rubiacearum*

7. Họ Corynebacteriaceae :

Một số loại *Arthrobacter* sp.

8. Họ Bacillaceae :

- *Bacillus polymyxa*, *B. megatherium*, *Thermobacillus azotofigens*, *B. trufflei*, *Methanobacterium omelianskii*.

9. Họ Thiobacteriaceae :

Nhiều loài *Chromatium*

10. Họ Athiorhodaceae :

- *Thiodipseudomonas palustris*, *Rhodopseudomonas capsulatus*, *R. gelatinosa*, *R. spheroides*, *Rhodospirillum rubrum*, *Rhodospirillum* sp.

11. Họ Chlorobacteriaceae :

- *Chloropseudomonas ethylicum*, *Chlorobium limicola*, *C. thiosulfatophilum*.

12. Họ Hyphomicrobiaceae :

- *Rhodomicrobium vannielii*

13. Họ Mycobacteriaceae :

- *Mycobacterium roseo-album*, *M. invisible*, *M. azot-absorptum*

14. Họ Actinomycetaceae :

1.11.1963

- *Nocardia calcarea*, *N. cellulans*, *Streptomyces elephanatis primigeni*, *S. denitrificans*, *S. griseo-viridis*, *S. putrificus*, *S. azotophilus*, *S. griseus*, *S. cylindrosporus*, *S. aureofaciens*, *S. ruber*, *S. albidoflavus*, *S. fumosus*, *S. candidus*, *S. miaveolus*, *S. globisporus*, *S. coelicolor*, *S. griseoruber*.

15. Họ Treponemataceae :

Treponema hyponeustoncum

16. Một số đại diện của nấm men và nấm mốc :

- *Saccharomyces apiculatus*, *S. ellipsoideus champagne*, *S. ellipsoideus*, *S. cerevisiae*, *Torula wiesneri*, *Oidium lactis*.

2.6. Cơ chế của quá trình cố định nitơ phân tử

Trong công nghiệp phân hóa học việc chuyển hóa N_2 thành các dạng hợp chất của nitơ (muối amon, ure, nitrat) cần tiêu tốn rất nhiều năng lượng. Số năng lượng cần thiết để tổng hợp ra một tấn NH_3 tương đương với số năng lượng sinh ra khi đốt cháy 5 tấn than đá. Trong khi đó các vi sinh vật cố định nitơ bằng một cơ chế nào đó đã thường xuyên chuyển hóa được N_2 thành các hợp chất chứa nitơ ngay trong các điều kiện bình thường về áp suất và nhiệt độ. Nếu khám phá ra được cơ chế của quá trình cố định nitơ ở vi sinh vật, thì rõ ràng sẽ có thể mở ra một triển vọng hết sức to lớn đối với việc cải tiến toàn bộ các quy trình sản xuất phân nitơ hóa học.

Người ta nhận định rằng trong tế bào các vi sinh vật cố định nitơ có chứa những hệ thống enzym nào đó, nhờ sự xúc tác của các enzym này mà N_2 của không khí có thể thực hiện được các phản ứng liên kết với hidro hoặc oxi trong không khí.

Ngày từ năm 1934 viện sĩ Liên Xô (cũ) A. N. Bakhơ (A. H. Bac) đã viết : "Chúng ta hi vọng rằng bằng con đường nghiên cứu về lí thuyết của tác dụng của các chất xúc tác oxi hóa khử sinh học đã gây nên sự liên kết nitơ trong không khí nhờ vi sinh vật mà chúng ta sẽ có thể biết rõ được những điều kiện thích hợp nhất cần phải có để tổng hợp ra amoniac trong công nghiệp".

Ngày nay người ta đã có thể thu được các dịch chiết vô bào lấy từ tế bào các vi sinh vật cố định nitơ. Những dịch chiết này có chứa một hệ thống enzym phức tạp được gọi chung là nitrogenaza. Vi sinh vật sẽ tiêu tốn một năng lượng đáng kể các hợp chất hữu cơ để tạo ra nguồn năng lượng cần thiết cho hoạt động cố định nitơ của chúng. Bằng cách nào mà năng lượng này được sinh ra và hợp chất đầu tiên được tạo thành từ N_2 của không khí là hợp chất gì ? Đã có nhiều giả thuyết khác nhau về các cơ chế này.

Nitrogenaza là một phức hệ enzym. Chúng cấu tạo bởi hai thành phần, đó là hai protein có phân tử nhỏ.

Một thành phần gọi là *protein sắt*, còn gọi là *nitrogenaza khử* hay thành phần II. Một thành phần khác gọi là *protein sắt - molibden* còn gọi là thành phần I. Thành phần II được nghiên cứu ở *Clostridium pasteurianum* gồm 2 tiểu phần (subunits) đồng nhất, mỗi tiểu phần có khối lượng phân tử là 29000, ở giữa có một trung tâm chứa 4 nguyên tử sắt và 4 nguyên tử lưu huỳnh không ổn định với axit. Thành phần I (Mo-Fe protein) ở *C. pasteurianum* phức tạp hơn, có khối lượng phân tử chung là 220.000 gồm 2 nguyên tử Mo, khoảng 30 nguyên tử Fe và nhiều nguyên tử S không

ổn định với axit. Chúng cấu tạo bởi 4 tiểu phần, gồm 2 loại, một loại có khối lượng phân tử là 50 và một loại có khối lượng phân tử là 60.000. Mỗi loại gồm 2 tiểu phần.

Dùng cột DEAE - xenlulozơ có thể tách ra được thành phần I và thành phần II. Lúc cho chảy ra khỏi cột thì Mo - Fe protein sẽ đi ra trước.

Mo- Fe protein ở *Azotobacter vinelandii* cũng có khối lượng phân tử 220.000, trong cấu tạo có 32 nguyên tử Fe, 2 nguyên tử Mo và 26 nguyên tử S không ổn định với axit. Trong khi đó Fe - protein lại có khối lượng phân tử là 65.000, cấu tạo bởi 2 phần giống nhau, có chứa 4 nguyên tử Fe và 4 nguyên tử S không ổn định với Fe.

Khối lượng phân tử của thành phần I thành phần II của các vi sinh vật cố định nitơ là không giống nhau và còn phụ thuộc cả vào phương pháp phân tích. Số lượng các nguyên tử Mo, Fe, S trong từng phân tử cũng khác nhau tùy từng loài vi sinh vật.

Dưới đây là một số ví dụ :

Phương pháp		Thành phần I (Mo - Fe protein)						Thành phần II (Fe-protein)				
		Av	Ac	Rj	Ca	Kp	Cp	Av	Ac	Ca	Kp	Cp
Khối lượng phân tử (x1000)	Lọc qua gel	221	216	180	235	220	210	64	63	62	62	55
	Li tâm	245		197		200.4	168				68.2	36
	Tính từ phân tử lượng tiểu phần	280	220	210	237	221.8	220	66	61	64-80	69.2	55
	Tính từ thành phần axit amin		227		223.5	229	221.8		67	82.9	67.8	57.4
Số nguyên tử/phân tử	Mo	2	1.9	1.3	2.2	2	2					
	Fe	34-38	22	29	23	32	24	3.4	4	3.8	4	4
	S không ổn định với axit	26-28	20	26	20		24	2.8	3.9	2.4	3.8	4

Chú thích : Av = *Azotobacter vinelandii*

Ac = *Azotobacter chroococcum*

Rj = *Rhizobium japonicum*

Ca = *Corynebacterium tự dưỡng*

Kp = *Klebsiella pneumoniae*

Cp = *Clostridium pasteurianum*

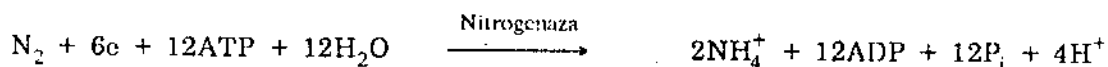
Nitrogenaza không chỉ xúc tác việc khử N_2 thành NH_3 mà còn có thể xúc tác việc khử CH_3CN , HCN , NH_3 , N_2O , C_2H_2 , ... thành các sản phẩm tương ứng. Sau đây là một số ví dụ :

Cơ chất	Phản ứng hóa học	Số electron cần	Hiệu suất tương đối.
N_2	$N_2 + 6H^+ + 6e^- \longrightarrow NH_3$	6	1
NH_3	$NH_3 + 2H^+ + 2e^- \longrightarrow H_2 + NH_3$	2	3
N_2O	$N_2O + 2H^+ + 2e^- \longrightarrow N_2 + H_2O$	2	3
C_2H_2	$C_2H_2 + 2H^+ + 2e^- \longrightarrow C_2H_4$	2	3-4
HCN	$HCN + 6H^+ + 6e^- \longrightarrow CH_4 + NH_3$	6	0.6
	$HCN + 4H^+ + 4e^- \longrightarrow CH_3NH_2$	4	
CH_3CN	$CH_3CN + 6H^+ + 6e^- \longrightarrow C_3H_8 + NH_3$	6	0.2
CH_3CN	$CH_3CN + 6H^+ + 6e^- \longrightarrow CH_3NH_2 + NH_3 + CH_4$	6	0.8
CH_2CHCN	$CH_2CHCN + 6H^+ + 6e^- \longrightarrow C_3H_8 + NH_3$	6	0.2
CH_2CCH_2	$CH_2CCH_2 + 2H^+ + 2e^- \longrightarrow CH_2CHCH_3$	2	0.05
H_3O^+	$2H_3O^+ + 2e^- \longrightarrow H_2 + 2H_2O$	2	3

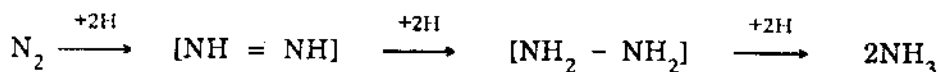
Lúc nitrogenaza tác động lên cơ chất các phản ứng nói trên có thể sinh ra các tác dụng can thiệp. Chẳng hạn ở $30^\circ C$ lúc *Azotobacter vinelandii* tiến hành cố định N_2 thì H_2 có thể ức chế cạnh tranh việc khử N_2 . Người ta thường sử dụng phương pháp khử C_2H_2 thành C_2H_4 để xác định hoạt tính nitrogenaza trong phòng thí nghiệm. Trên lý thuyết để khử 1 phân tử N_2 cần 6 electron còn để khử 1 phân tử C_2H_2 chỉ cần có 2 electron mà thôi, tức là phải khử 3 phân tử C_2H_2 mới tương đương với việc khử 1 phân tử N_2 . Căn cứ vào lượng C_2H_4 sinh ra mà xác định được lượng nitơ cố định được của từng loại vi sinh vật cố định nitơ. Nhiều khi người ta không cần tính toán mà dùng ngay số lượng C_2H_4 sinh ra để biểu thị hoạt tính của nitrogenaza. Thành phần I và thành phần II của nitrogenaza đều rất mẫn cảm với oxi. Chính vì vậy mà việc chiết xuất và phân tích nitrogenaza đều cần tiến hành trong điều kiện hoàn toàn kỵ khí (anaerobic).

Nitrogenaza ở $0^\circ C$ dễ mất hoạt tính hơn so với ở nhiệt độ thường. Nhưng ở điều kiện kỵ khí trong điều kiện lạnh sâu (bảo quản ở nitơ lỏng) thì nitrogenaza lại có thể giữ hoạt tính khá lâu. Ngoài ra việc bổ sung etanol có thể có tác dụng bảo vệ hoạt tính của nitrogenaza.

Phản ứng khử N_2 dưới sự xúc tác của nitrogenaza có thể biểu thị vắn tắt như sau :

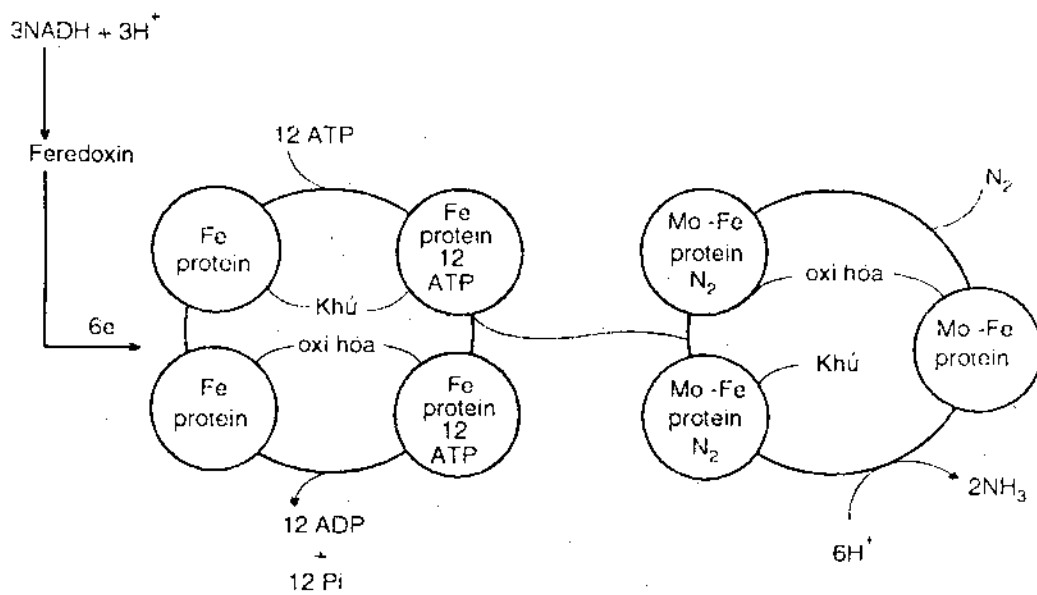


Người ta cho rằng quá trình khử này bao gồm nhiều phản ứng khử kế tiếp nhau :



Tuy nhiên cũng có tác giả cho rằng nitrogenaza có thể khử trực tiếp N_2 thành NH_3 mà không phải qua các sản phẩm trung gian. Hai giả thuyết này còn cần tiếp tục được làm sáng tỏ.

Sơ đồ chung của cơ chế khử N_2 thành NH_3 dưới tác dụng xúc tác của nitrogenaza có thể được biểu thị như sau :

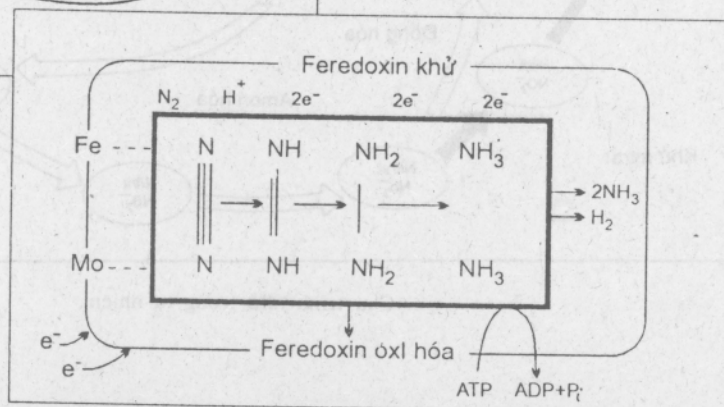
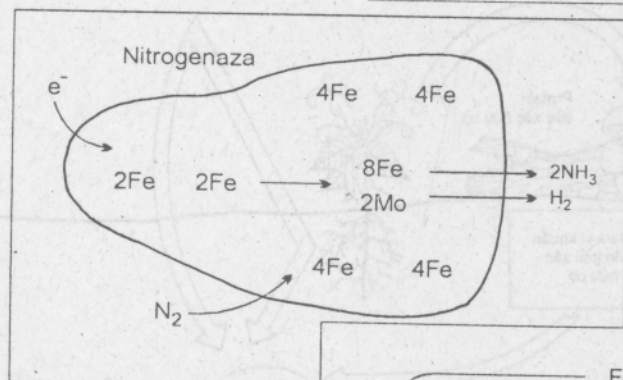
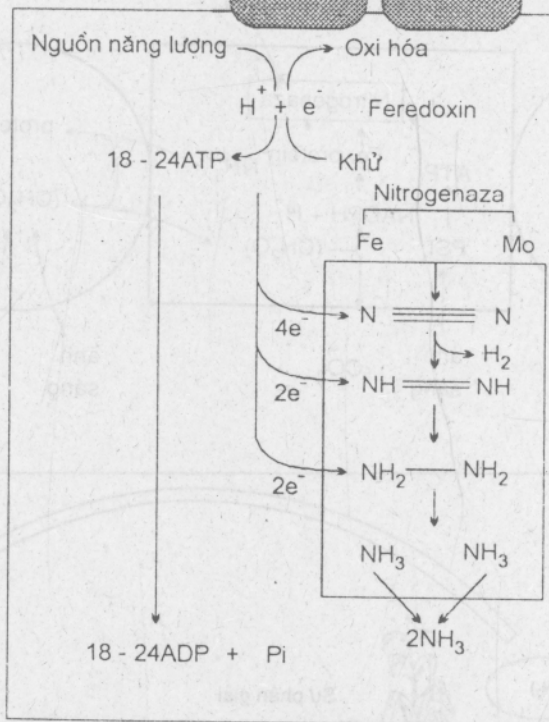
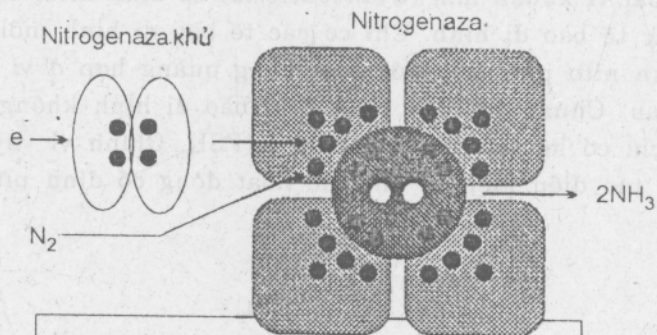


Nitrogenaza (Thành phần II)

Nitrogenaza (Thành phần I)

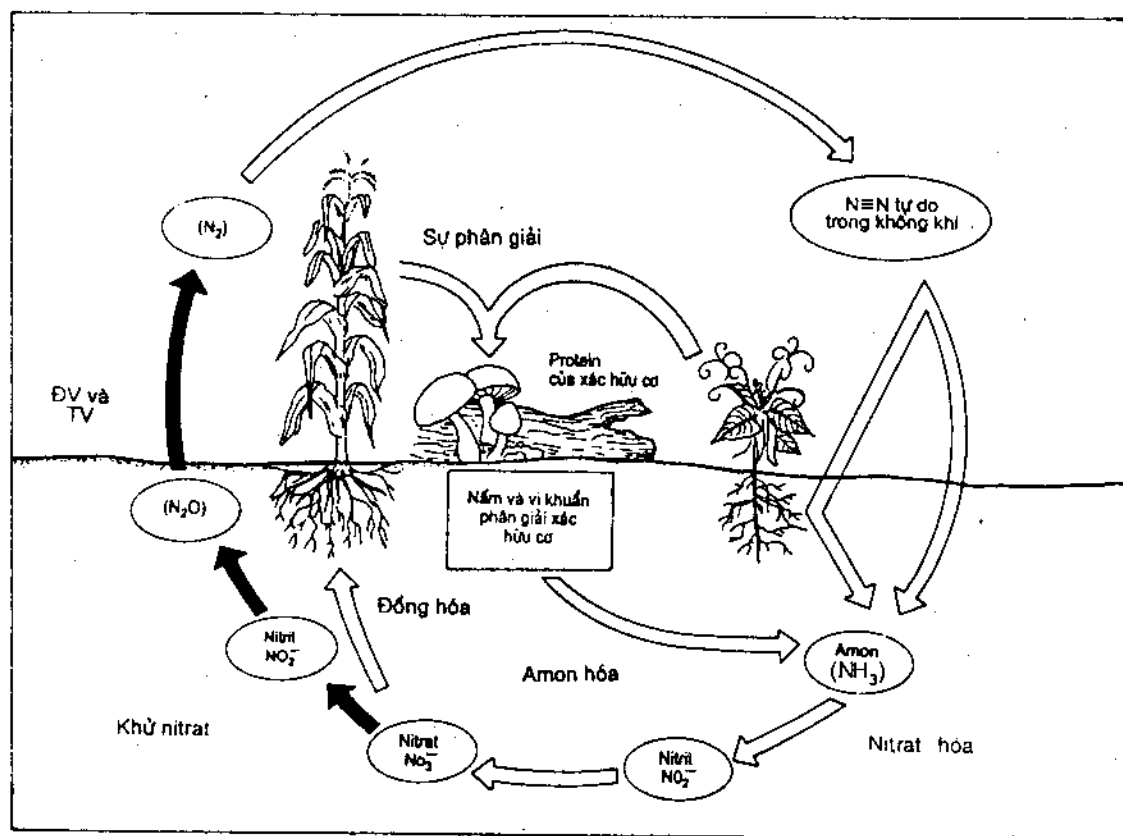
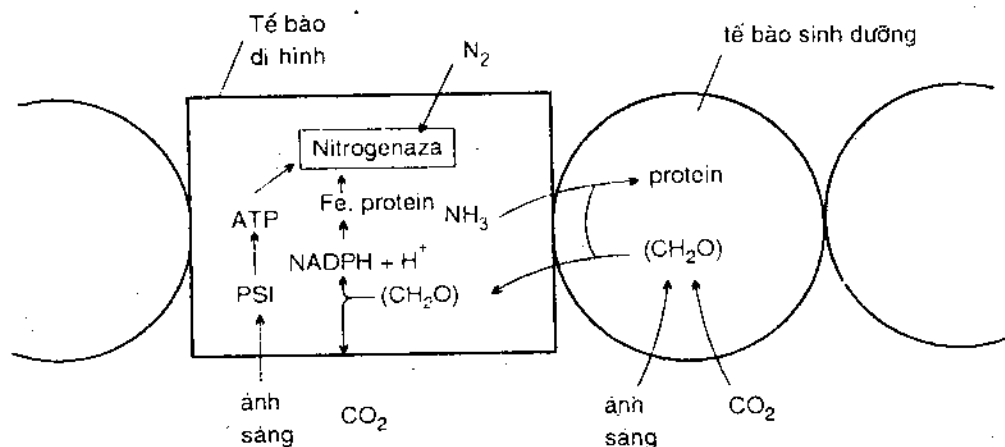
Còn một cách biểu thị khác cơ chế của quá trình khử N_2 thành NH_3 dưới tác dụng xúc tác của thành phần I và thành phần II của nitrogenaza. Ở đây thành phần I được biểu thị là vòng tròn có ghi I còn thành phần II được biểu thị là vòng tròn có ghi II.

Còn có thể biểu thị cơ chế của quá trình cố định nitơ bằng các sơ đồ dưới đây :



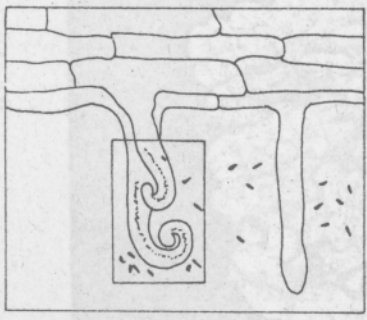
348

Ở các loài vi khuẩn lam (*Cyanobacteria*) cố định nitơ, công việc khử N_2 thành NH_3 xảy ra ở các tế bào dị hình. Chỉ có các tế bào dị hình mới có chứa nitrogenaza. Hoạt động cố định nitơ phối hợp với hoạt động quang hợp ở vi khuẩn lam có thể biểu thị như hình sau. Chúng ta thấy rằng ở tế bào dị hình không có hệ thống quang hợp II (PSII) mà chỉ có hệ thống quang hợp I (PSI). Chính vì vậy mà chúng không làm sản sinh ra O_2 , tạo điều kiện kị khí cho hoạt động cố định nitơ:



Chu trình nitơ trong tự nhiên

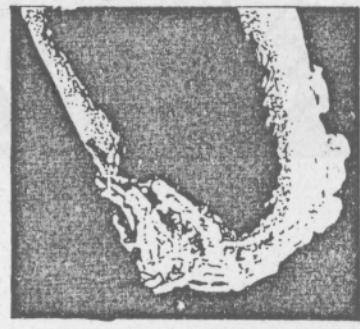
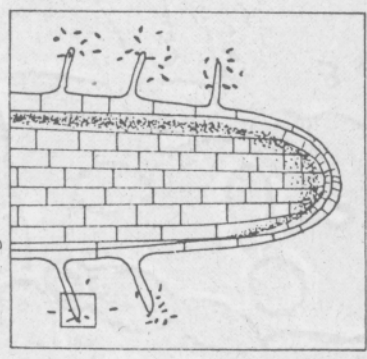
Lông hút ở rễ cây con lại



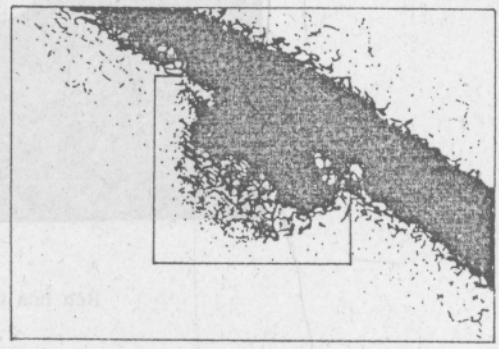
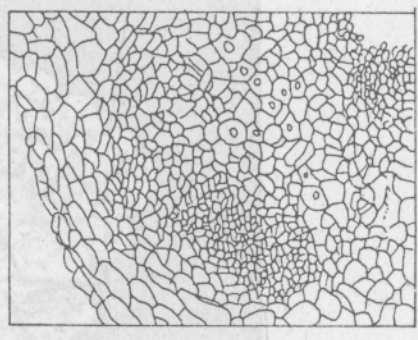
Dây xâm nhập



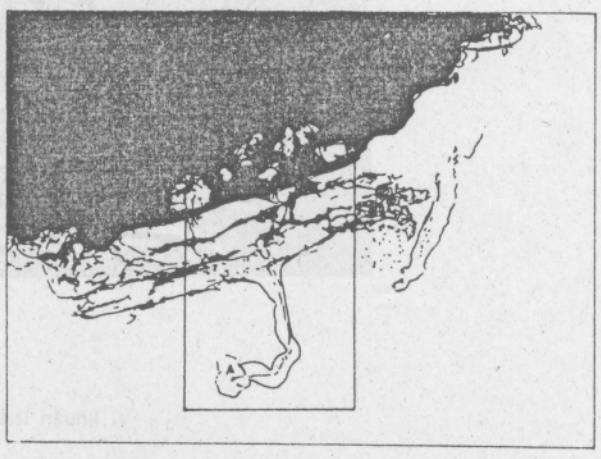
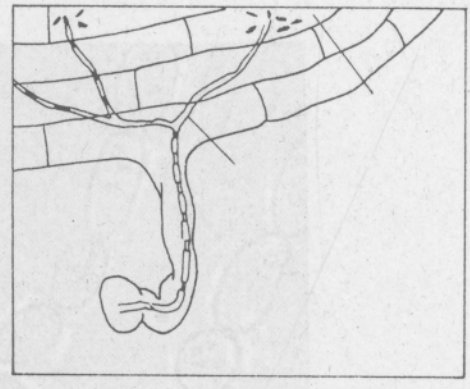
Vị khuẩn nốt sần ở đầu lông hút của rễ



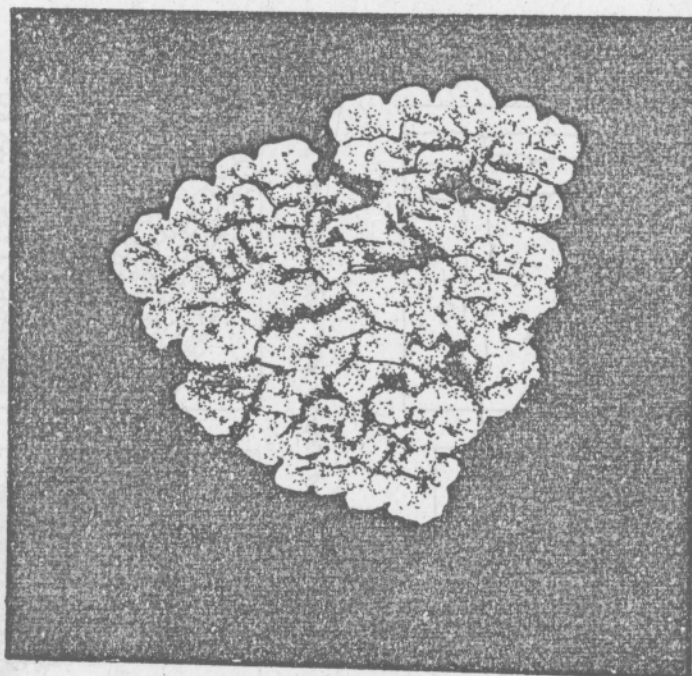
Sự tạo thành nốt sần ở rễ cây bồ đề



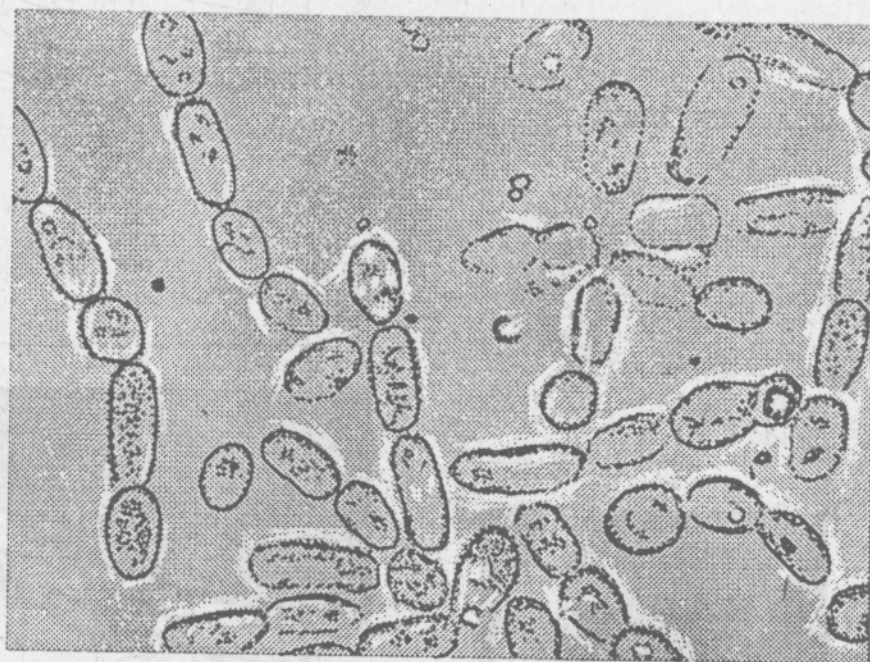
Sự xâm nhập của vi khuẩn nốt sần qua dây xâm nhập vào rễ cây bồ đề



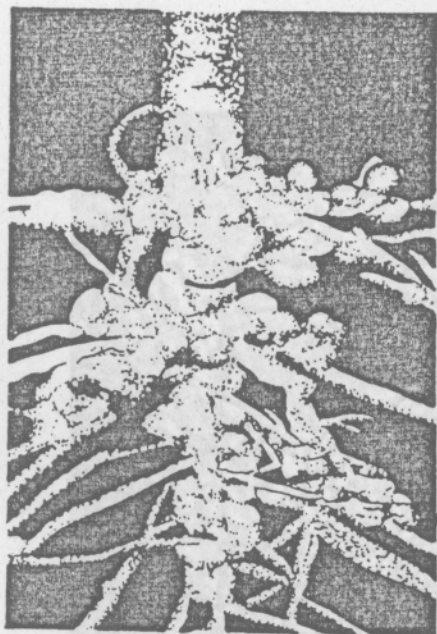
Vị khuẩn kích thích tế bào vùng này phân cắt và tạo rễ nốt sần



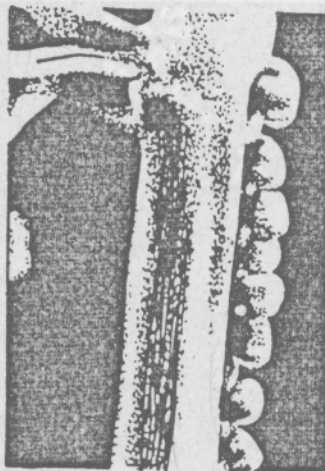
Bèo hoa dâu (*Azolla*)



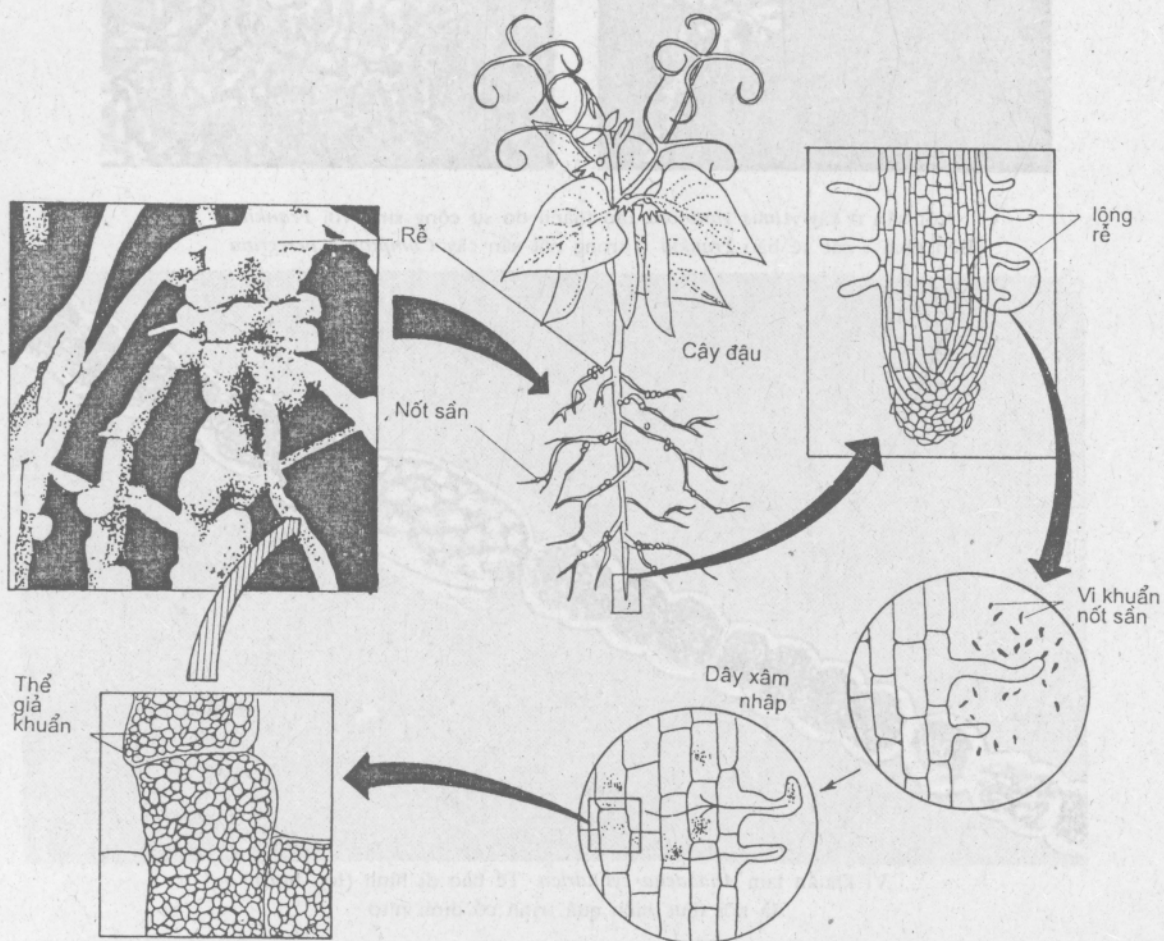
Vi khuẩn lam *Anabaena azollae*



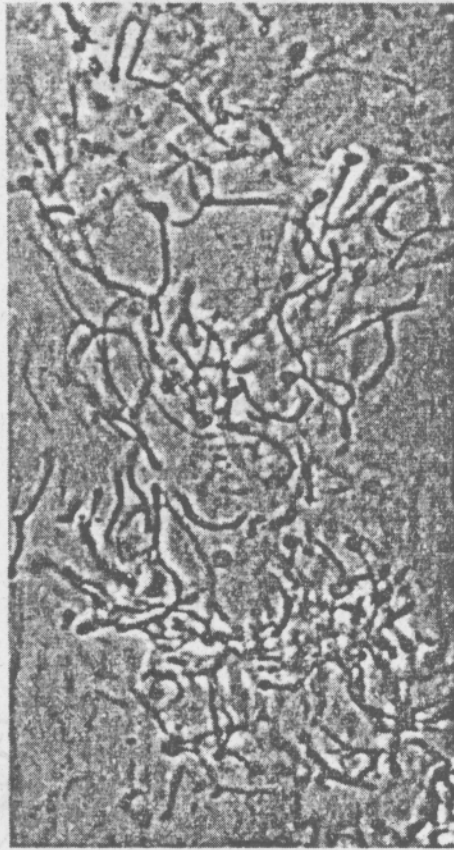
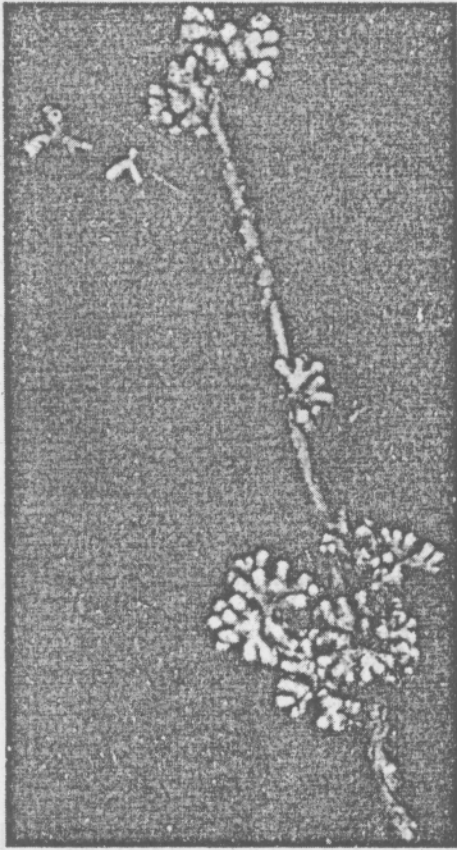
Nốt sẩn ở rễ cây bộ Đậu



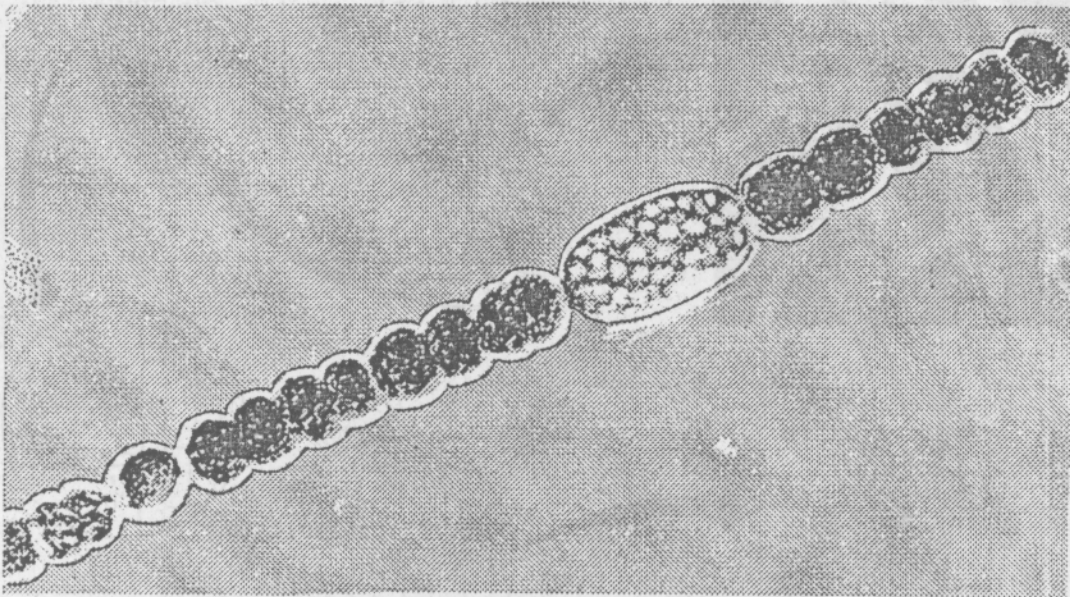
Nốt sẩn ở thân cây diễn thanh (*Sesbania nostrata*)



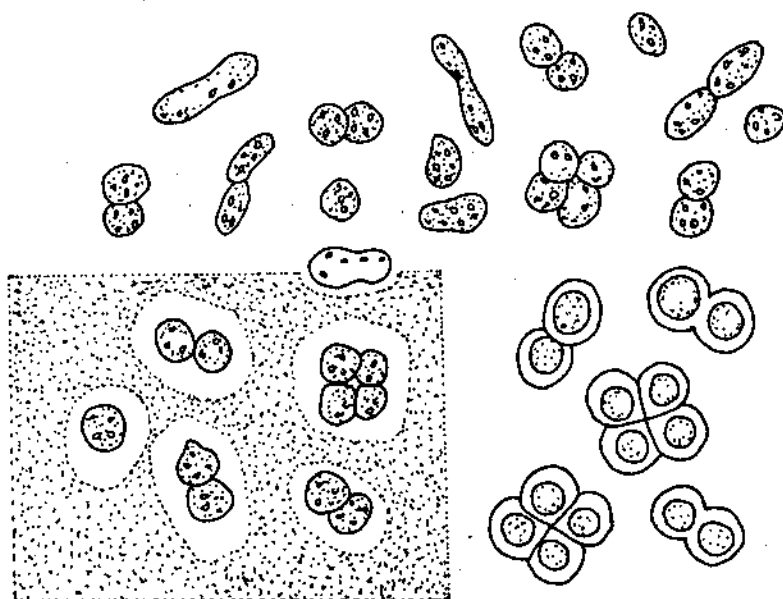
Sự hình thành nốt sẩn ở cây bộ Đậu.



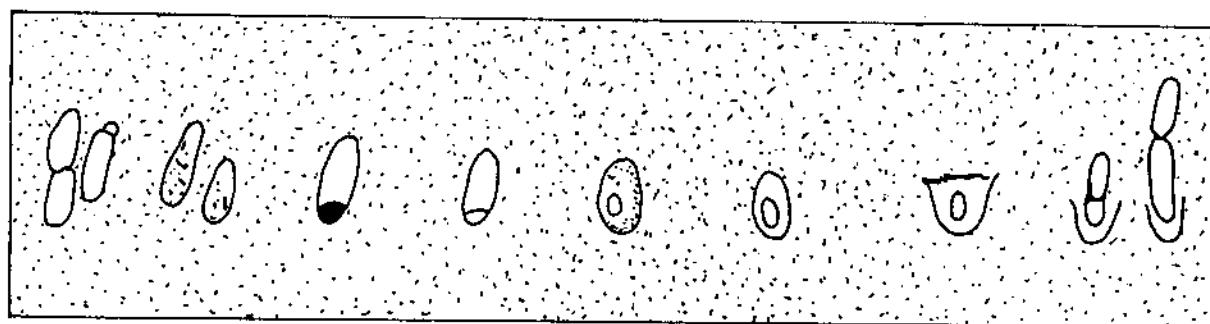
Nốt sần ở cây *Alnus glutinosa* tạo thành do sự cộng sinh với *Frankia*
 Bên phải : các tế bào *Frankia* ở trong nốt sần cây *Comptonia peregrina*



Vi khuẩn lam *Anabaena cylindrica*. Tế bào dị hình (lớn hơn)
 là nơi thực hiện quá trình cố định nitơ



Azotobacter



Chu trình phát triển của *C. pasteurianum*

CHƯƠNG VIII

SINH TRƯỞNG VÀ PHÁT TRIỂN Ở VI SINH VẬT

Sinh trưởng và phát triển là thuộc tính cơ sở của sinh vật. Cũng như động vật và thực vật vi sinh vật cũng sinh trưởng và phát triển. Sinh trưởng là sự tăng kích thước và khối lượng của tế bào, còn phát triển (hoặc sinh sản) là sự tăng số lượng tế bào. Trong chương này chỉ đề cập đến sinh trưởng và phát triển của vi khuẩn, vì ở vi khuẩn vấn đề này đã được nghiên cứu sâu rộng đến mức có thể khái quát hóa dưới dạng toán học. Sinh trưởng và phát triển ở các vi sinh vật khác, chủ yếu là ở vi sinh vật đơn bào, không khác lắm so với ở vi khuẩn, những kiến thức chung về sinh trưởng và phát triển ở vi khuẩn cũng có thể ứng dụng vào các vi sinh vật khác.

Điều cần chú ý là khi nói về sinh trưởng và phát triển của vi khuẩn tức là đề cập đến sinh trưởng và phát triển của một số lượng lớn tế bào của cùng một loại. Rõ ràng, việc nghiên cứu ở một cá thể tế bào vi khuẩn quá nhỏ là rất khó.

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

Vì vậy cần phân biệt các thông số và hằng số khác nhau khi xác định số lượng hoặc khối lượng vi khuẩn.

Các thông số và hằng số dùng khi xác định số lượng và khối lượng vi khuẩn

	Số lượng vi khuẩn	Khối lượng vi khuẩn
Đơn vị thể tích	Nồng độ vi khuẩn (số tế bào/ml)	Mật độ vi khuẩn (sinh khối khô/ml)
Số lần tăng đôi sau đơn vị thời gian	Hằng số tốc độ phân chia C ($h - 1$)	Hằng số tốc độ sinh trưởng $\mu(h - 1)$
Thời gian cần cho sự tăng đôi	Thời gian thế hệ g(h)	Thời gian tăng đôi t _d (h)

Khi xác định số lượng hoặc khối lượng của vi khuẩn ta thường dùng dịch treo đồng đều của các tế bào trong môi trường dịch thể nào đó mà xác định *nồng độ vi khuẩn* (số tế bào trong 1ml) hoặc *mật độ vi khuẩn* (mg/ml). Từ kết quả đó các chỉ số này có thể tính được hằng số tốc độ phân chia tế bào (thể hiện bằng số lần tăng đôi nồng độ vi khuẩn sau 1 giờ) và đại lượng ngược lại, *tức thời gian thế hệ* (thời gian cần cho số lượng tế bào trong một quần thể vi khuẩn tăng gấp đôi).

Trong điều kiện phòng thí nghiệm thường thường ta theo dõi ảnh hưởng của các yếu tố môi trường lên sinh trưởng và phát triển của vi khuẩn nhờ các phương pháp nuôi cấy thích hợp. Tùy theo tính chất thay đổi trong hệ thống vi khuẩn - môi trường ta phân biệt hai phương pháp cơ bản nuôi cấy vi khuẩn : nuôi cấy tĩnh và nuôi cấy liên tục.

Một vi sinh vật trong điều kiện môi trường thích hợp sẽ không ngừng hấp thụ chất dinh dưỡng và tiến hành trao đổi chất. Nếu quá trình đồng hóa lớn hơn quá trình dị hóa thì tổng số nguyên sinh chất (khối lượng, thể tích, kích thước) sẽ không ngừng tăng lên. Đó là hiện tượng sinh trưởng của cá thể. Nếu là quá trình sinh trưởng cân bằng thì các thành phần của tế bào cũng tăng lên theo những tỉ lệ thích hợp, khi đạt đến một mức độ nhất định sẽ hình thành sự sinh sản. Khi đó số lượng cá thể tăng lên. Cá thể ban đầu sẽ phát triển dần lên thành một quần thể, sự tiếp tục sinh trưởng của cá thể trong quần thể tạo ra sự sinh trưởng của quần thể. Do đó :

Sinh trưởng cá thể \rightarrow Sinh sản cá thể \rightarrow sinh trưởng quần thể. Sinh trưởng quần thể = sinh trưởng cá thể + sinh sản cá thể.

Trong vi sinh vật học khi nói đến sinh trưởng là nói đến sự sinh trưởng của cả quần thể (khác với khi nói tới sinh trưởng ở các sinh vật có kích thước lớn).

1. MẪU LÝ THUYẾT VỀ SINH TRƯỞNG VÀ PHÁT TRIỂN CỦA VI KHUẨN

Ta hãy tưởng tượng trong một bình kín chứa một lượng lớn môi trường dinh dưỡng, ta cấy vào đó một tế bào vi khuẩn. Nếu thành phần môi trường hoàn toàn phù hợp với nhu cầu của tế bào, vi khuẩn sẽ sinh trưởng, tăng khối lượng và thể tích, tổng hợp các thành phần của tế bào (thành tế bào, màng tế bào chất, ADN, ARN, protein...) cho đến khi kích thước lớn gấp đôi. Rồi vi khuẩn phân chia cho hai tế bào. Hai tế bào này lại tiếp tục sinh trưởng và phân chia để cho 4 rồi 8, 16... tế bào.

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

$$N = N_0 \cdot 2^n \quad (1)$$

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

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

Từ đó :

$$n = \frac{1}{\log 2} \cdot (\log N - \log N_0) \quad (2)$$

Giả dụ, vi khuẩn phân chia n lần sau thời gian t , khoảng thời gian giữa 2 lần phân chia liên tiếp (hoặc thời gian cần cho việc tăng đôi số tế bào) gọi là *thời gian thế hệ* và biểu thị bằng g :

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

Ở đây $t_2 - t_1$ biểu thị sự sai khác giữa thời gian đầu (t_1) và thời gian cuối (t_2) tính bằng giờ trong đó số tế bào được xác định. Giá trị đảo nghịch của thời gian thế

hệ hay là số lần phân chia sau một đơn vị thời gian (tức sau 1 giờ) gọi là *hàng số tốc độ phân chia C* :

$$C = \frac{1}{g} = \frac{n}{t} = \frac{1}{\log 2} \cdot \frac{(\log N - \log N_0)}{t_2 - t_1} \quad (4)$$

Rõ ràng, thời gian thế hệ càng ngắn, vi khuẩn sinh trưởng và sinh sản càng nhanh.

Vì :

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

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

$$N = N_0 \cdot 2^{Ct} \quad (6)$$

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

a) *Loài vi khuẩn* :

Ví dụ : ở 37°C . $C = 3$ đối với *E. coli* và $C = 0,07$ đối với *Mycobacterium tuberculosis*.

b) *Nhiệt độ nuôi cấy* :

Ví dụ : *E. coli* nuôi cấy trong nước thịt :

Nhiệt độ (°C)	Thời gian thế hệ (phút)	Hàng số tốc độ phân chia C
18	120	0,5
22	60	1
30	30	2
37	20	3
42	20	3
43	-	0

c) *Môi trường nuôi cấy* :

Khi nuôi cấy *B.subtilis* ở 37°C, trong :

- nước thịt $C = 2$
- môi trường khoáng - glucôzơ $C = 0,8$
- môi trường khoáng - xitrat $C = 0,3$
- môi trường khoáng - glucôzơ - xitrat $C = 1,2$

Tuy nhiên đối với một cơ chất đã cho hàng số tốc độ phân chia không phụ thuộc vào nồng độ trong một thời giới hạn rộng. Chẳng hạn đối với *B. subtilis*, khi nuôi cấy trong môi trường chứa glucôzơ, dù nồng độ glucôzơ bằng 0,3 hay 50g/l ta vẫn có $C = 0,8$; C chỉ giảm khi nồng độ đường vượt ra ngoài các giới hạn nói trên.

Nhưng, như trên đã nói, không phải bao giờ sinh trưởng (tăng sinh khối vi khuẩn) cũng diễn ra song song với sinh sản (tăng số lượng vi khuẩn), trường hợp này chỉ gặp trong pha logarit. Vì vậy khi nghiên cứu động học trong các quá trình nuôi cấy liên tục ta thường theo dõi sinh trưởng và sinh sản của quần thể vi khuẩn bằng một tiêu chuẩn khác. Cũng có thể biểu thị bằng số lượng tế bào nhưng phổ biến hơn là biểu thị bằng sinh khối vi khuẩn, bằng chất khô hay bằng mật độ quang học... (cần chú ý rằng mật độ quang học tỉ lệ với số tế bào). Thay cho hàng số tốc độ phân chia (C) ở

đây ta dùng hằng số tốc độ sinh trưởng μ . Như vậy trong một khoảng thời gian là dt đã có một sự tăng dX của sinh khối vi khuẩn tỉ lệ với X và μ . Nghĩa là :

$$\frac{dX}{dt} = \mu \cdot X \quad (7)$$

hay :

$$\frac{1}{\mu \cdot X} dX = dt$$

Tích phân phương trình trong giới hạn (X_0, X) và $(0, t)$ ta có :

$$\begin{aligned} \frac{1}{\mu} \int_{X_0}^X \frac{1}{X} dX &= \int_0^t dt \\ \frac{1}{\mu} (\ln X - \ln X_0) &= t \\ \ln X - \ln X_0 &= \mu t \\ \ln \frac{X}{X_0} &= \mu t \\ \frac{X}{X_0} &= e^{\mu t} \end{aligned} \quad (8)$$

$$X = X_0 \cdot e^{\mu t} \quad (9)$$

Ở đây X_0 là lượng sinh khối ban đầu (số tế bào, chất khô, mật độ quang học...).

Từ phương trình (8) ta có thể tính được μ :

$$\mu = \frac{\ln X - \ln X_0}{t}$$

Và chuyển sang logarit thập phân :

$$\mu = 2,302 \frac{(\lg X - \lg X_0)}{t_2 - t_1} \quad (10)$$

Nếu lượng sinh khối (X_0, X) biểu thị bằng số tế bào (N_0, N) ta sẽ xác định được mối quan hệ qua lại giữa hằng số tốc độ sinh trưởng (μ) , hằng số tốc độ phân chia (C) và thời gian thế hệ (g) .

Kết hợp các phương trình (4) và (10) ta có :

$$\mu = 0,69C = \frac{0,69}{g} \quad (11)$$

Dưới đây xin giới thiệu hai mô hình toán học của Monod và Verlhurst về quá trình nuôi cấy phân dợt (batch culture) hay còn gọi là quá trình nuôi cấy khép kín (closed culture).

Gọi $Y_{x/s}$ là hiệu suất thu hồi vi khuẩn ta có các phương trình vi phân sau đây :

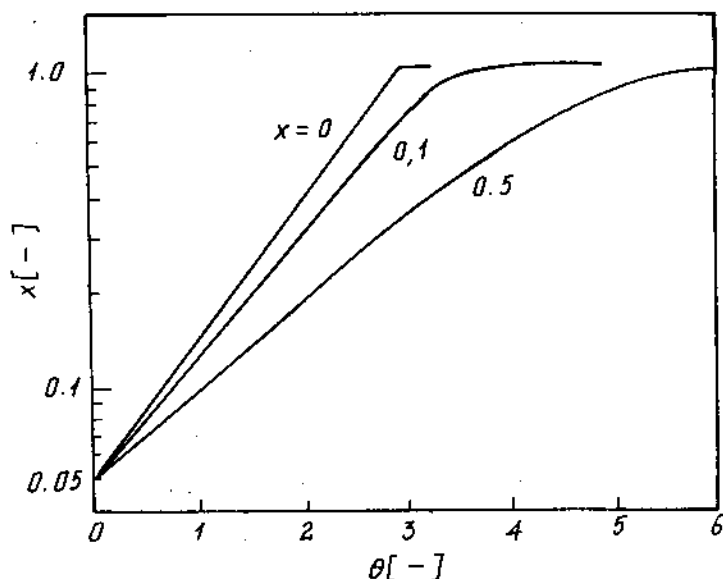
$$\begin{cases} \frac{dx}{dt} = \frac{\mu_{\max} \cdot S}{k_s + S} \cdot x \\ \frac{ds}{dt} = -\frac{1}{Y_{x/s}} \cdot \frac{dx}{dt} \end{cases} \quad (1)$$

(2)

Lúc khởi đầu thì $t = 0$, $x = x_0$, $S = S_0$.

Suy ra x , s tùy theo t biến đổi mà có một quan hệ hàm số. Để đơn giản hóa kết quả có thể biểu thị như sau :

$$\begin{aligned} X &= x(x_0 + Y_{x/s} \cdot S_0) \\ S &= s(s_0 + x_0/Y_{x/s}) \\ \lambda &= k_s(s_0 + x_0/Y_{x/s}) \end{aligned} \quad (3)$$



Giải các phương trình trên ta có :

$$-\lambda \ln \frac{1-X}{1-X_0} + (1+\lambda) \cdot P_n \frac{X}{X_0} = H \quad (4)$$

$$X + S = X_0 + S_0 = 1 \quad (5)$$

Có thể vẽ đường cong sinh trưởng dựa trên công thức (4) khi $x_0 = 0,05$ như đồ thị sau đây :

Nói chung nếu k_s thấp, lúc $S_0 > 10g/l$ thì trị số λ sẽ thu nhỏ.

Do có sự tích lũy của các chất ức chế, cho nên mô hình giảm tốc độ sinh trưởng có thể biểu thị là :

$$\frac{dx}{dt} = kx(1 - ai) \quad (6)$$

đây ta dùng hằng số tốc độ sinh trưởng μ . Như vậy trong một khoảng thời gian là dt đã có một sự tăng dX của sinh khối vi khuẩn tỉ lệ với X và μ . Nghĩa là :

$$\frac{dX}{dt} = \mu \cdot X \quad (7)$$

hay :

$$\frac{1}{\mu \cdot X} dX = dt$$

Tích phân phương trình trong giới hạn (X_0, X) và ($0, t$) ta có :

$$\frac{1}{\mu} \int_{X_0}^X \frac{1}{X} dX = \int_0^t dt$$

$$\frac{1}{\mu} (\ln X - \ln X_0) = t$$

$$\ln X - \ln X_0 = \mu t \quad (8)$$

$$\ln \frac{X}{X_0} = \mu t$$

$$\frac{X}{X_0} = e^{\mu t}$$

$$X = X_0 \cdot e^{\mu t} \quad (9)$$

Ở đây X_0 là lượng sinh khối ban đầu (số tế bào, chất khô, mật độ quang học...).

Từ phương trình (8) ta có thể tính được μ :

$$\mu = \frac{\ln X - \ln X_0}{t}$$

Và chuyển sang logarit thập phân :

$$\mu = 2,302 \frac{(\lg X - \lg X_0)}{t_2 - t_1} \quad (10)$$

Nếu lượng sinh khối (X_0, X) biểu thị bằng số tế bào (N_0, N) ta sẽ xác định được mối quan hệ qua lại giữa hằng số tốc độ sinh trưởng (μ), hằng số tốc độ phân chia (C) và thời gian thế hệ (g).

Kết hợp các phương trình (4) và (10) ta có :

$$\mu = 0,69C = \frac{0,69}{g} \quad (11)$$

Dưới đây xin giới thiệu hai mô hình toán học của Monod và Verlhurst về quá trình nuôi cấy phân đợt (batch culture) hay còn gọi là quá trình nuôi cấy khép kín (closed culture).

Gọi $Y_{x/s}$ là hiệu suất thu hồi vi khuẩn ta có các phương trình vi phân sau đây :

Trong đó, i là nồng độ chất ức chế. Giả dụ giữa nồng độ chất ức chế và việc giảm tốc độ sinh trưởng có quan hệ tuyến tính, và tốc độ sản sinh chất ức chế tỉ lệ với hiệu suất tốc độ sinh trưởng thì :

$$\frac{d_i}{dt} = b \cdot \frac{dx}{dt} \quad (7)$$

Nếu $t = 0$, $i = 0$, lấy điều kiện ban đầu của công thức (7), thực hiện tích phân ta sẽ có :

$i = b(x - x_0)$. Đưa vào công thức (6) ta được :

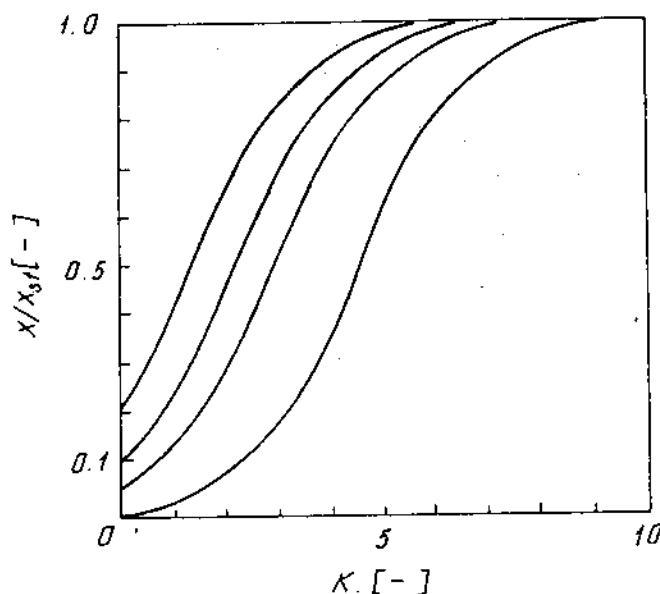
$$\begin{aligned} \frac{dx}{dt} &= kx \{1 - ab(x - x_0)\} \\ &= k(1 + abx_0) \cdot x \left(1 - \frac{ab}{1 + abx_0} \cdot x\right) \end{aligned} \quad (8)$$

Giả thử $k(1 + abx_0) = k_0$, $(1 + abx_0)/ab = x_{st}$ thì :

$$\frac{dx}{dt} = k_0 x \left(1 - \frac{x}{x_{st}}\right) \quad (9)$$

Mô hình Verlhurst được biểu thị bằng công thức và đường cong như sau :

$$\frac{x}{x_{st}} = \frac{\frac{x_0}{x_{st}} \exp(k_0 t)}{\left\{ \left(1 - \frac{x_0}{x_{st}}\right) + \frac{x_0}{x_{st}} \exp(k_0 t) \right\}}$$



Đường cong Verlhurst

31.10.19

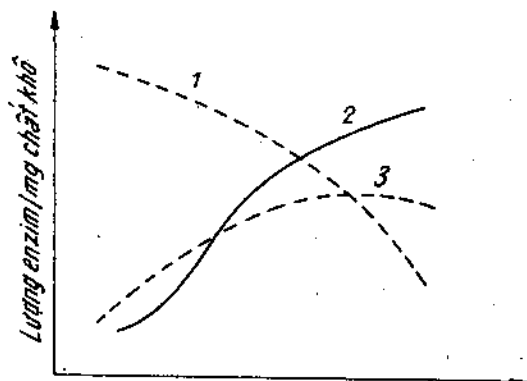
2. SINH TRƯỞNG VÀ PHÁT TRIỂN CỦA VI KHUẨN TRONG ĐIỀU KIỆN NUÔI CẤY TÍNH. ĐƯỜNG CONG SINH TRƯỞNG

Nếu theo dõi sinh trưởng và phát triển của vi khuẩn trong điều kiện phòng thí nghiệm ta nhận thấy số lượng chúng tăng lên rất nhanh. Điều này dễ hiểu, vì với điều kiện thích hợp thời gian thế hệ (hay nói đúng hơn, thời gian tăng đôi) của nhiều loài vi khuẩn chỉ vào khoảng 30 phút. Rõ ràng các quá trình sinh tổng hợp cũng như các quá trình dị hóa (như hô hấp) nhằm cung cấp nguyên liệu và năng lượng cho các phản ứng tổng hợp đã diễn ra trong tế bào với tốc độ rất nhanh, hoàn toàn không thấy ở các sinh vật khác. Chẳng hạn, một tế bào vi khuẩn nếu được cấy vào môi trường thích hợp sẽ có thời gian thế hệ là 30 phút; tế bào có khối lượng khô khoảng $2,5 \cdot 10^{-13} \text{g}$ và thể tích khoảng 10^{-12}cm^3 . Sau 48 giờ ta đã có một quần thể vi khuẩn chừng 10^{29} tế bào, với khối lượng khô chừng 10^{10} tấn và thể tích 10^{11}m^3 . Dĩ nhiên tình hình nói trên không bao giờ xảy ra vì sinh trưởng và sinh sản của vi khuẩn trong một hệ thống đóng chỉ sau một thời gian nhất định, vì nhiều nguyên nhân khác nhau, sẽ bị ngừng lại.

Phương pháp nuôi cấy mà trong suốt thời gian đó ta không thêm vào chất dinh dưỡng cũng không loại bỏ đi các sản phẩm cuối cùng của trao đổi chất gọi là *nuôi cấy tính* (quần thể tế bào bị giới hạn trong một khoảng không gian nhất định). Sự sinh trưởng trong một "hệ thống động" như vậy tuân theo những quy luật bắt buộc không những đối với các cơ thể đơn bào mà cả đối với các cơ thể đa bào.

2.1. Pha lag

Pha này tính từ lúc bắt đầu cấy đến khi vi khuẩn đạt được tốc độ sinh trưởng cực đại. Trong pha lag vi khuẩn chưa phân chia (nghĩa là chưa có khả năng sinh sản) nhưng thể tích và khối lượng tế bào tăng lên rõ rệt do quá trình tổng hợp các chất, trước hết là các cao phân tử (protein, enzym, axit nucleic...) diễn ra mạnh mẽ. Chẳng hạn, một số enzym cần cho quá trình tổng hợp thuộc các endoenzim loại proteinaza, amilaza và các enzym nằm trong quá trình chuyển hóa glucit, đều được hình thành trong pha này (hình A).



Việc hình thành enzym trong môi trường nuôi cấy vi khuẩn

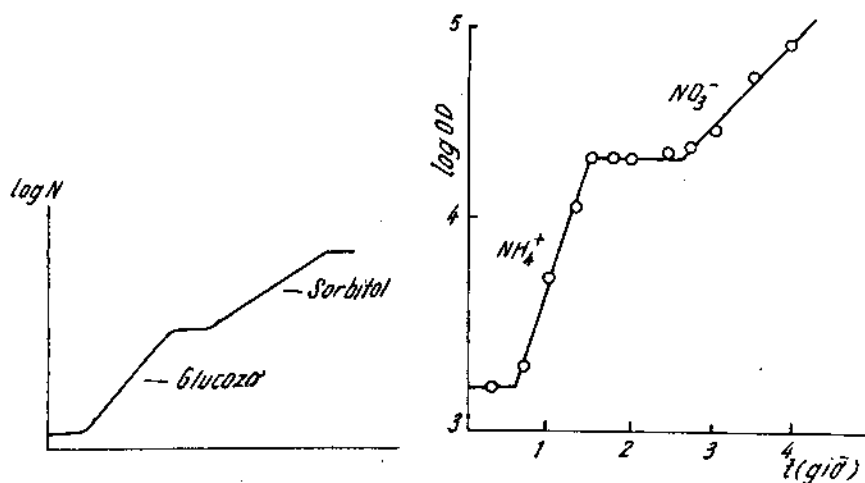
- 1 - Enzim xúc tác quá trình tổng hợp;
- 2 - Enzim xúc tác quá trình phân giải;
- 3 - Chất tế bào (tế bào chất).

Độ dài của pha lag phụ thuộc trước hết vào tuổi của ống giống và thành phần môi trường. Chẳng hạn, pha lag sẽ không có nếu ta dùng ống giống gồm các tế bào đang ở pha sinh trưởng logarit và cấy chúng vào cùng một môi trường dưới những điều kiện nuôi cấy như nhau. Trái lại nếu ta cấy các tế bào ở pha ổn định hoặc các bào tử vào cùng một môi trường dưới những điều kiện nuôi cấy như nhau, pha lag vẫn có. Thường thường tế bào càng già thì pha lag càng dài. Rõ ràng nguyên nhân của pha lag là sự khác biệt giữa các tế bào ở pha ổn định (hoặc bào tử) với các tế bào đang sinh trưởng logarit. Trong pha lag diễn ra việc xây dựng lại các tế bào nghỉ thành các tế bào sinh trưởng logarit (hoặc sinh trưởng theo lũy thừa).

Nhưng ngay khi dùng các tế bào đang sinh trưởng logarit mà cấy vào môi trường mới khác với môi trường trước đây ta vẫn thấy pha lag. Nguyên nhân của pha lag trong trường hợp này chính là sự thích ứng của vi khuẩn với điều kiện nuôi cấy mới; sự thích ứng đó có liên quan tới việc tổng hợp các enzym mới mà trước đây tế bào chưa cần. Các enzym mới này được tổng hợp nhờ sự cảm ứng của các cơ chất mới. Hãy lấy một ví dụ: nếu chuyển các tế bào đang sinh trưởng logarit từ môi trường khoáng với glucosơ sang cùng một môi trường nhưng với mantosơ ta sẽ thấy xuất hiện pha lag; rõ ràng nguyên nhân ở đây là thời gian cần cho việc hình thành enzym maltaza (α - glucosidaza). Một ví dụ khác về tác dụng của cơ chất lên tổng hợp enzym là hiện tượng *sinh trưởng kép*. Đặc trưng của hiện tượng này là đường cong sinh trưởng gồm hai pha lag và hai pha log: sau khi kết thúc pha log thứ nhất tế bào lại mở đầu pha lag thứ hai và tiếp tục pha log thứ hai. Vi khuẩn sinh trưởng kép khi môi trường chứa nguồn cacbon gồm một hỗn hợp của hai chất hữu cơ khác nhau, trước hết là các glucit. Khi sinh trưởng tế bào sẽ đồng hóa trước tiên nguồn cacbon nào mà chúng "ưa thích" nhất. Đồng thời cơ chất thứ nhất này đã kích hoạt các enzym cần cho việc đồng hóa cơ chất thứ hai. Chỉ sau khi nguồn cacbon thứ nhất đã cạn thì nguồn cacbon thứ hai mới có thể cảm ứng tổng hợp nên các enzym cần trong việc chuyển hóa nó. Rõ ràng quá trình tổng hợp này đòi hỏi một thời gian nhất định. Đó là lý do có mặt của pha lag thứ hai. Hiện tượng sinh trưởng kép đã được nghiên cứu kỹ ở *E. coli*. Khi nuôi cấy vi khuẩn này trong môi trường chứa glucosơ và sorbitol, trước hết glucosơ cảm ứng tổng hợp các enzym chuyển hóa đường này đồng thời kiểm chế việc tổng hợp các enzym đồng hóa sorbitol. Sau khi glucosơ đã được sử dụng hết mới đến lượt sorbitol cảm ứng tổng hợp các enzym nằm trong việc chuyển hóa nguồn cacbon thứ hai này (hình B).

Hiện tượng sinh trưởng kép đã được nghiên cứu ở hàng loạt đường khi dùng hỗn hợp với glucosơ. Theo đó người ta chia những đường này thành hai nhóm: nhóm A gồm các đường không cho sinh trưởng kép với glucosơ (glucosơ, fructosơ, mannosơ, mannitol) và nhóm B gồm các đường cho sinh trưởng kép với glucosơ (galactosơ, arabinosơ, xilozơ; ramnosơ, sorbitol, dulxitol, mantosơ, lactosơ).

Hiện tượng sinh trưởng kép không chỉ hạn chế ở các nguồn cacbon và năng lượng mà thấy ở các nguồn nitơ và photpho. Chẳng hạn *Aerobacter aerogenes* có thể sử dụng làm nguồn nitơ các axit amin, muối amon và nitrat. Nếu vi khuẩn nuôi trong nước thịt được cấy truyền sang môi trường chứa muối amon hoặc muối nitrat pha lag sẽ biểu hiện. Nếu từ nước thịt cấy chuyển vi khuẩn sang môi trường chứa hỗn hợp cả hai muối ta sẽ thấy hiện tượng sinh trưởng kép. Các ion NH_4^+ được đồng hóa trước tiên đồng thời kiểm chế việc tổng hợp cảm ứng enzym nitrat - reductaza. Chỉ sau khi muối amon đã cạn muối nitrat mới được sử dụng (hình C).



Sinh trưởng kép của *E. coli* trong hỗn hợp glucôzơ + sorbitol (B)
Sinh trưởng kép của *A. aerogenes* trong hỗn hợp muối amon và nitrat (C)

E. coli có thể chuyển hóa các nguồn photpho khác nhau và thể hiện sinh trưởng kép : trong môi trường chứa hỗn hợp K_2HPO_4 và β -glixerophotphat vi khuẩn sử dụng photpho vô cơ trước và kiểm chế việc tổng hợp cảm ứng photphataza kiềm.

Rõ ràng sinh trưởng kép là một hiện tượng phổ biến và có thể giải thích bằng cơ chế kiểm chế nói chung và đặc biệt bằng hiệu ứng glucôzơ.

Việc tìm hiểu độ dài thời gian của pha lag là cần thiết trong việc phán đoán đặc tính của vi khuẩn và tính chất của môi trường. Cần chú ý rằng để thuận tiện cho việc tính toán, người ta chuyển các phương trình này thành các phương trình đường thẳng bằng cách sử dụng logarit (logarit tự nhiên hoặc logarit cơ số 2) :

$$\ln N = ct \ln 2 + \ln N_0$$

$$= \mu t + \ln N_0$$

Và :

$$\log_2 N = \mu \log_2 e + \log_2 N_0$$

$$= ct + \log_2 N_0$$

Pha lag được coi như là khoảng cách thời gian giữa đường thẳng thực nghiệm (hoặc thực tế) và đường thẳng lý tưởng song song với nó khi mà vi khuẩn, giả dụ không phải trải qua pha lag. Gọi khoảng cách thời gian của pha lag là T_l ta có :

$$T_l = t_r - t_i$$

$$= t_l - t_0$$

Phương trình của đường thẳng lý tưởng là :

$$\log N_i = c t_i + \log N_0$$

Vì :

$$\log N_i = \log N_r$$

ta có thể viết :

$$\log N_r = c t_i + \log N_0$$

$$\log N_r - \log N_0 = c t_i.$$

$$t_i = \frac{\log N_r - \log N_0}{c}$$

thay giá trị của t_i vào phương trình $T_l = t_r - t_i$ ta có :

$$T_l = t_r - \frac{\log N_r - \log N_0}{c}$$

Như vậy trong vùng sinh trưởng logarit ta chỉ cần chọn một giá trị t_r thích hợp và nếu biết được giá trị N_r tương ứng cùng với hằng số tốc độ sinh trưởng c ta có thể tính được độ dài thời gian của pha lag T_l .

Tuy nhiên đại lượng T_l , hay nói cách khác thời gian vật lý với đơn vị là giờ, không phải là độ đo thích hợp của pha lag. Như ta đã biết, pha lag biểu thị sự thích nghi của vi khuẩn với một môi trường đã cho. Trạng thái sinh lý của vi khuẩn càng xa với sinh trưởng logarit trong môi trường mới thì pha lag càng dài. Nhưng yếu tố thứ hai ảnh hưởng đến độ dài thời gian của pha lag là tốc độ của các quá trình diễn ra trong tế bào, trước hết là tốc độ tổng hợp các enzym thích ứng mới. Giả sử, hai tế bào có cùng một trạng thái sinh lý đối với điều kiện nuôi cấy mới nhưng một trong hai tế bào có hoạt tính sinh lý (nghĩa là tốc độ của quá trình trong tế bào) gấp đôi tế bào kia. Ta dễ hiểu pha lag ở tế bào có hoạt động trao đổi chất mạnh mẽ hơn phải ngắn hơn pha lag ở tế bào thứ hai.

Vì vậy người ta thường đo pha lag bằng đơn vị thời gian sinh học (hoặc sinh lý) như thời gian tăng đôi, thời gian thế hệ, hằng số tốc độ sinh trưởng. Biết thời gian thế hệ (g) ta có thể xác định được độ dài thời gian của pha lag (T_l) gấp mấy lần thời gian thế hệ. Đại lượng này được gọi là *lag sinh trưởng*.

Có rất nhiều yếu tố ảnh hưởng đến pha lag. Đáng chú ý nhất đến 3 yếu tố sau đây :

- Tuổi giống cấy : Tuổi của quần thể giống cấy tức là chúng đang ở giai đoạn sinh trưởng nào, có ảnh hưởng rất rõ đến pha lag. Thực nghiệm chứng minh nếu giống cấy ở giai đoạn pha lag (hay pha chỉ số) thì pha lag sẽ ngắn. Ngược lại nếu giống cấy ở pha lag hay pha tử vong thì pha lag ở vật nuôi sẽ kéo dài.

- Lượng cấy giống : Nói chung lượng cấy giống nhiều thì pha lag ngắn và ngược lại. Trong công nghiệp lên men tỉ lệ cấy giống thường ở mức 1/10.

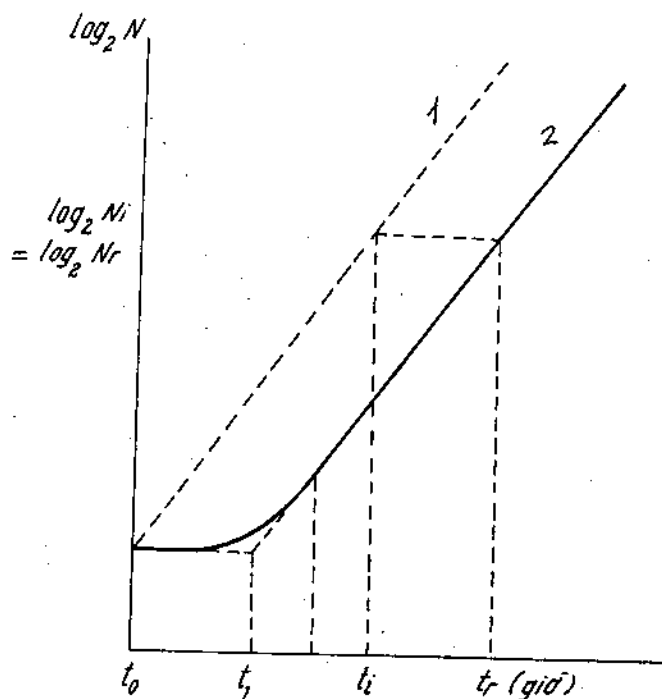
- Thành phần môi trường : Môi trường có thành phần dinh dưỡng phong phú (thường là có môi trường có cơ chất thiên nhiên) thì cho pha lag ngắn. Trong công nghiệp lên men thành phần của môi trường lên men thường tránh sai khác nhiều so với thành phần của môi trường nhân giống.

$$L = \frac{T_l}{g}$$

hoặc :

$$L = T_l \cdot C$$

$$= T_l \cdot \mu \frac{1}{\ln 2}$$



Đồ thị biểu diễn pha lag :

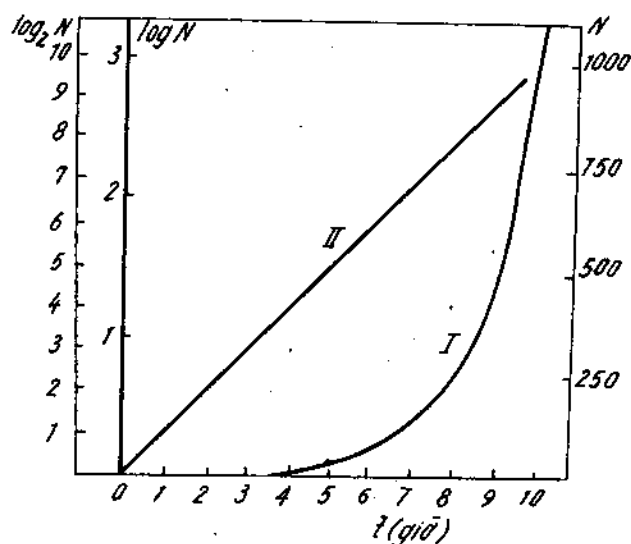
1. Đường thẳng lí tưởng
2. Đường thẳng thực tế.

(r = real = thực tế ; i = ideal = lí tưởng)

2.2. Pha log

Trong pha này vi khuẩn sinh trưởng và phát triển theo lũy thừa, nghĩa là sinh khối và số lượng tế bào tăng theo phương trình $N = N_0 \cdot 2^{ct}$ hay $X = X_0 \cdot e^{\mu t}$. Kích thước của tế bào, thành phần hóa học, hoạt tính sinh lí... nói chung không thay đổi theo thời gian. Tế bào ở trạng thái động học và được coi như là "những tế bào tiêu chuẩn".

Như trên đã nói, nếu ta lấy trục tung là số tế bào, trục hoành là thời gian ta sẽ có đường biểu diễn là đường cong như sau :



Sinh trưởng theo lũy thừa của các vi sinh vật đơn bào

I - Phương pháp thông thường biểu diễn kết quả

II - Thang logarit

N = Số tế bào

Thời gian thế hệ ở một số loài vi khuẩn

Tên loài vi khuẩn	Nhiệt độ nuôi cấy (°C)	Thời gian thế hệ (min)
<i>Escherichia coli</i> (trên nước thịt)	37	17
<i>E.coli</i> (trên sữa)	37	12,5
<i>Enterobacter aerogenes</i> (trên nước thịt)	37	16-18
<i>E.aerogenese</i> (trên MT tổng hợp)	37	29-44
<i>Bacillus mycoides</i> (trên nước thịt)	37	28
<i>B.cereus</i> (trên nước thịt)	30	18
<i>B. thermophilus</i> (trên nước thịt)	55	18,3
<i>B. subtilis</i> (trên nước thịt)	25	26-32
<i>B. megatherium</i> (trên nước thịt)	30	31
<i>Lactobacillus acidophilus</i> (trên sữa)	37	66-87
<i>Streptococcus lactis</i> (trên sữa)	37	26
<i>S. lactis</i> (trên sữa - đường - thịt)	37	48
<i>Salmonella typhi</i> (trên nước thịt)	37	2
<i>Vibrio cholerae</i> (trên nước thịt)	37	21-38
<i>Staphylococcus aureus</i> (trên nước thịt)	37	27-30
<i>Clostridium butyricum</i> (trên nước cao ngô)	30	51
<i>Azotobacter chroococcum</i> (trên glucoso)	25	240
<i>Rhizobium japonicum</i> (trên glucoso)	25	344-461
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> (trên MT tổng hợp)	37	792-932
<i>Nitrobacter agilis</i> (trên MT tổng hợp)	27	1200
<i>Treponema pallidum</i> (trên thỏ nhà)	37	1980

Một đồ thị như vậy rõ ràng không có lợi cho việc tính toán. Cho nên người ta thường lấy trục tung là logarit của số tế bào và đường biểu diễn sinh trưởng theo lũy thừa của vi khuẩn sẽ là đường thẳng. Vì pha sinh trưởng theo lũy thừa của vi khuẩn được biểu diễn bằng sự phụ thuộc theo đường thẳng giữa thời gian và logarit của số tế bào nên pha này được gọi là pha logarit. Hơn nữa, người ta thường dùng logarit cơ số 2 là thích hợp hơn cả vì sự thay đổi một đơn vị của \log_2 trên trục tung chính là sự tăng đôi số lượng vi khuẩn và thời gian cần để tăng một đơn vị của \log_2 lại là thời gian thế hệ.

Ba thông số quan trọng của pha log là thời gian thế hệ (hoặc thời gian tăng đôi) g , hằng số tốc độ phân chia c và hằng số tốc độ sinh trưởng μ . Nếu xác định thời gian thế hệ g theo số tế bào bằng phương pháp nói trên ta sẽ nhận được giá trị trung bình. Trên thực tế, trong một quần thể vi khuẩn luôn luôn có một số tế bào không có khả năng phân chia. Vì vậy các tế bào phân chia mạnh thường có thời gian thế hệ nhỏ hơn giá trị trung bình tìm thấy. Các hằng số c và μ có thể tính được từ phương trình.

$$\mu = \frac{\log_2 X_2 - \log_2 X_1}{\log_2 e(t_2 - t_1)}$$

Các hằng số này thay đổi tùy theo hàng loạt yếu tố môi trường và điều kiện nuôi cấy. Tuy nhiên trong điều kiện thí nghiệm có thể điều chỉnh sao cho tốc độ sinh trưởng của vi khuẩn chỉ mẫn cảm, nghĩa là chỉ phụ thuộc vào một yếu tố, còn các yếu tố khác của môi trường không có ảnh hưởng gì. Trong trường hợp như vậy yếu tố đã cho là *yếu tố hạn chế tốc độ sinh trưởng*. Monod (1942) là người đầu tiên đã chứng minh rằng nếu tất cả các chất dinh dưỡng đều ở nồng độ dư thừa trừ một chất hạn chế thì hằng số tốc độ phân chia (hoặc sinh trưởng) sẽ là hàm số của nồng độ chất dinh dưỡng hạn chế này. Chất dinh dưỡng hạn chế có thể là đường (saccarozơ, glucơ), axit amin (tryptophan, arginin), chất vô cơ (phosphat, CO_2). Nếu biểu diễn các kết quả thu được thành đồ thị (với hằng số c hoặc μ phụ thuộc vào nồng độ chất dinh dưỡng hạn chế) ta sẽ nhận được đường cong tương tự dạng hypebol ứng với phương trình $y = \frac{ax}{x+d}$ nghĩa là gần với đường cong biểu diễn sự phụ thuộc của tốc độ phản ứng enzym vào nồng độ cơ chất :

$$v = V \cdot \frac{[S]}{K_s + [S]}$$

Sinh trưởng theo lũy thừa của một vi khuẩn có thời gian thế hệ là 20 phút

Thời gian (phút)	Số lần phân chia	Số tế bào biểu thị bằng		
		số số học	\log_2	\log_{10}
0	0	1	0	0,000
20	1	2	1	0,301
40	2	4	2	0,602
60	3	8	3	0,903
80	4	16	4	1,204
100	5	32	5	1,505

Vì vậy Monod đã nêu lên một cách tương tự mối quan hệ giữa các hằng số c và μ với nồng độ chất dinh dưỡng hạn chế qua các phương trình :

$$c = c_{\max} \frac{[S]}{K_s + [S]}$$

và

$$\mu = \mu_{\max} \frac{[S]}{K_s + [S]}$$

Ở đây c_{\max} và μ_{\max} lần lượt là hằng số tốc độ phân chia và hằng số tốc độ sinh trưởng cực đại, K_s là *hằng số bão hòa* và $[S]$ là nồng độ chất dinh dưỡng hạn chế. Giống như hằng số Michaelis K_m , hằng số bão hòa K_s biểu thị ái lực của tế bào đối với chất dinh dưỡng : Giá trị của K_s càng nhỏ thì ái lực càng lớn. Đó là nồng độ của chất dinh dưỡng hạn chế mà ở đó μ đạt được nửa giá trị cực đại, tức $\mu = \frac{1}{\mu_{\max}}$. Giá trị của K_s thường rất thấp.

Một số hằng số bão hòa

Vi sinh vật	Chất dinh dưỡng hạn chế	K_s
<i>E. coli</i>	glucozơ	4mg/l
<i>E. coli</i>	mannitol	2mg/l
<i>E. coli</i>	lactozơ	20mg/l
<i>E. coli</i>	glucozơ	7,5mg/l
<i>E. coli</i>	triptophan	0,2 đến 1,0 μ g/l
<i>E. coli</i>	triptophan	0,4 μ g/l
<i>M. tuberculosis</i>	glucozơ	3,9 μ g/l
<i>A. aerogenes</i>	photphat	0,6mmol/l
<i>B.megatherium</i>	O_2	$3,1 \cdot 10^{-8}$ mol/l
<i>E. coli</i>	O_2	$6,0 \cdot 10^7$ mol/l
	O_2	$2,2 \cdot 10^{-8}$ mol/l.

2.3. Pha ổn định

Trong pha này quần thể vi khuẩn ở trạng thái cân bằng động học, số tế bào mới sinh ra bằng số tế bào cũ chết đi. Kết quả : số tế bào và cả sinh khối không tăng cũng không giảm. Tốc độ sinh trưởng bây giờ phụ thuộc vào nồng độ cơ chất. Cho nên khi giảm nồng độ cơ chất (trước khi cơ chất bị cạn hoàn toàn) tốc độ sinh trưởng của vi khuẩn cũng giảm. Do đó việc chuyển từ pha lag sang pha ổn định diễn ra dần dần.

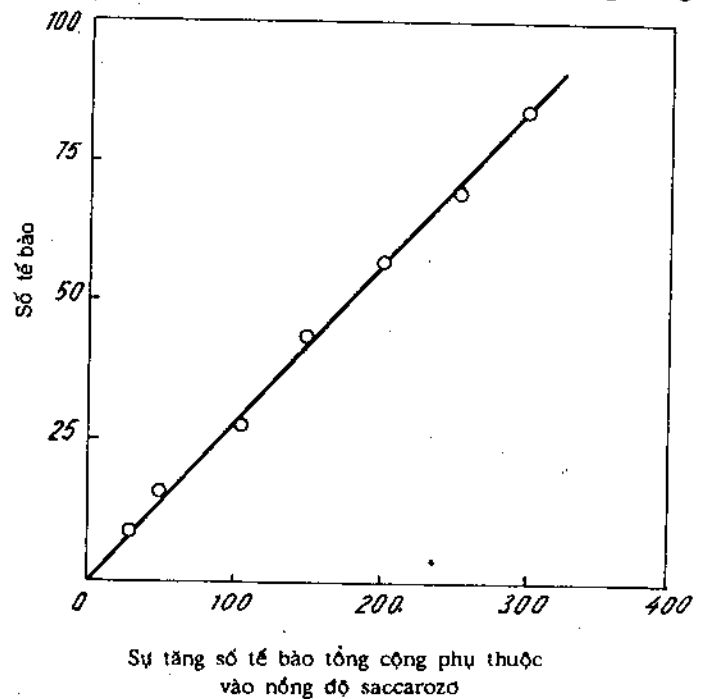
Nguyên nhân tồn tại của pha ổn định rõ ràng là do sự tích lũy các sản phẩm độc của trao đổi chất (các loại rượu, axit hữu cơ) và việc cạn chất dinh dưỡng (thường là chất dinh dưỡng có nồng độ thấp nhất). Nguyên nhân thứ nhất rất phức tạp và khó phân tích : nguyên nhân thứ hai đã được nghiên cứu kĩ hơn. Sự tăng sinh khối tổng cộng tỉ lệ thuận với nồng độ ban đầu của chất dinh dưỡng hạn chế (hình A).

$$G = K \cdot c$$

Ở đây G là độ tăng sinh khối tổng cộng, c là nồng độ ban đầu của chất dinh dưỡng hạn chế. K là hằng số hiệu suất :

$$K = \frac{G}{c}$$

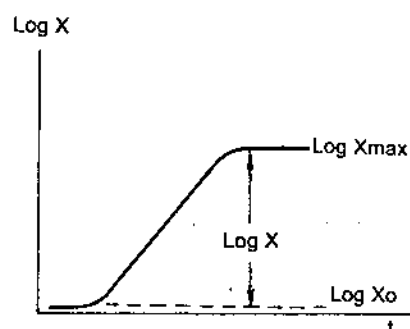
Hằng số hiệu suất K thường được biểu thị bằng số mg chất khô đối với 1 mg chất dinh dưỡng. Đối với các đường K thường dao động khoảng từ 0,20 đến 0,30 nghĩa là từ 100mg đường được tạo thành 20 - 30mg khối lượng khô của tế bào.



Hằng số hiệu suất K (mg/mg) tùy thuộc vào nguồn C và loài vi khuẩn

Đường	Hằng số hiệu suất K (mg/mg)		
	<i>B.subtillis</i>	<i>E. coli</i>	<i>S.typhimurium</i>
Inozitol	0,17	-	-
Mannitol	0,20	0,25	0,25
Dunxitol	-	0,28	0,27
Glucozơ	0,20	0,24	0,23
Arabinozơ	0,23	0,24	0,19

Cần chú ý rằng ngay trong pha ổn định có thể diễn ra các quá trình như sử dụng chất dinh dưỡng, phân hủy một phần riboxom. Những tế bào mẫn cảm sẽ chết trước, những tế bào khác còn tồn tại một thời gian cho tới khi nào năng lượng khai thác được nhờ, việc oxi hóa các chất dự trữ hoặc các protein của tế bào đã cạn. Lượng sinh khối đạt được trong pha ổn định gọi là *hiệu suất* hoặc *sản lượng*. Sản lượng phụ thuộc vào tính chất và số lượng các chất dinh dưỡng sử dụng và vào điều kiện nuôi cấy. Đó là sự sai khác giữa số lượng vi khuẩn cực đại và khối lượng vi khuẩn ban đầu (hình B).



Tính sản lượng của vi khuẩn

$$X = X_{\max} - X_0$$

Đại lượng này được biểu thị bằng gam.

Tỉ lệ của sản lượng tế bào đối với lượng cơ chất tiêu dùng có ý nghĩa rất quan trọng. Nếu biểu thị cả hai đại lượng thành đơn vị khối lượng ta sẽ gọi tỉ lệ này (X/S) là *hệ số kinh tế* (Y). Nếu sản lượng tính ra gam và cơ chất tiêu dùng ra mol ta sẽ gọi là *hệ số kinh tế mol* (Y_m). Cuối cùng, nếu ta biết con đường phân hủy cơ chất đã cho và hiệu suất ATP do kết quả của sự phân hủy này ta có thể tính được sinh khối vi khuẩn (gam) đối với 1 mol ATP. Ta gọi đó là *hệ số năng lượng* (Y_{ATP}).

Lượng ATP được tạo thành trong trao đổi chất kỵ khí tùy theo nguồn cacbon và năng lượng và loài vi sinh vật

Nguồn cacbon	mol ATP/mol nguồn cacbon	Vi sinh vật	Con đường trao đổi chất
Glucozơ	2	<i>Streptococcus faecalis</i>	Embden - Meyerhof
Glucozơ	1	<i>Pseudomonas lindneri</i>	Entner-Doudoroff
Glucozơ	2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Embden-Meyerhof
Acginin	1	<i>Stroptococcus faecalis</i>	Acg → Xit-Orn P ATP

Hệ số năng lượng Y_{ATP} tùy theo nguồn năng lượng và loài vi sinh vật

Vi sinh vật	Cơ chất	mol ATP/mol cơ chất	Y_m	Y_{ATP}
<i>Streptococcus faecalis</i>	Glucozơ	2	22	11
<i>S. faecalis</i>	Glucozơ	2	23	11,5
<i>S. faecalis</i>	Glucozơ	2	18,5	9,3
<i>S. faecalis</i>	Ribozơ	1,67	21	12,6
<i>S. faecalis</i>	Acginin	1	10	10
<i>S. faecalis</i>	Acginin	1	10,5	10,5
<i>Saccharomyces. cerevisiae</i>	Glucozơ	2	21	10,5
<i>Pseudomonas. lindneri</i>	Glucozơ	1	8,3	8,3

Chẳng hạn, *S.cerevisiae* và *S.faecalis* cùng thu nhận năng lượng nhờ lên men. Khi cơ chất là glucozơ, hệ số $Y_m = 20$. Cả hai vi sinh vật đều phân giải glucozơ qua con đường fructozơ-diphosphat (Embden - Meyerhof) ; đối với 1 mol glucozơ tiêu thụ có 2 mol ATP được hình thành, do đó $Y_{ATP} = 10$. Điều đáng chú ý là đối với các quá trình phân giải khác ta cũng nhận được giá trị Y_{ATP} trung bình tương tự.

Hàng số này, $Y_{ATP} = 10,5$, gọi là hàng số Elsdén.

2.4. Pha tử vong

Trong pha này số lượng tế bào có khả năng sống giảm theo lũy thừa (mặc dù số lượng tế bào tổng cộng có thể không giảm). Đôi khi các tế bào bị tự phân nhờ các enzym của bản thân. Ở các vi khuẩn sinh bào tử tình hình phức tạp hơn do quá trình hình thành bào tử.

Thực ra chưa có một quy luật chung cho pha tử vong. Sự chết của tế bào có thể nhanh hay chậm, có liên quan đến sự tự phân hay không tự phân. Do sức sống lớn bào tử bị chết chậm nhất (trong những điều kiện thích hợp như khô và nhiệt độ thấp bào tử có thể duy trì được khả năng sống hàng trăm năm). Nguyên nhân của pha tử vong chưa thật rõ ràng, nhưng có liên quan với điều kiện bất lợi của môi trường. Trong trường hợp môi trường tích lũy các axit (*Escherichia*, *Lactobacillus*) nguyên nhân của sự chết tế bào tương đối dễ hiểu. Nồng độ chất dinh dưỡng thấp dưới mức cần thiết cho hậu quả làm giảm hoạt tính trao đổi chất, phân hủy dần dần các chất dự trữ và cuối cùng dẫn đến sự chết của hàng loạt tế bào. Ngoài đặc tính của bản thân chủng vi khuẩn, tính chất của các sản phẩm trao đổi chất tích lũy lại cũng ảnh hưởng đến tiến trình của pha tử vong.

Một số enzym thể hiện hoạt tính xúc tác cực đại trong pha tử vong như deaminaza, decarboxylaza, các amilaza và proteinaza ngoài bào. Ngoài chức phận xúc tác một số quá trình tổng hợp những enzym nói trên chủ yếu xúc tác các quá trình phân giải.

Tốc độ tử vong của tế bào có liên quan trực tiếp đến thực tiễn vi sinh vật học và kỹ thuật, đó là vấn đề bảo quản các chủng vi sinh vật quan trọng về mặt lý thuyết (các chủng và các biến chủng đặc biệt) và kỹ thuật (các chủng sinh chất kháng sinh, axit amin, vitamin... với sản lượng cao). Ngoài khả năng sống ta còn cần bảo quản cả các đặc tính di truyền của vi khuẩn. Có nhiều phương pháp bảo quản khác nhau, nhưng tất cả đều nhằm làm giảm trao đổi chất đến tối thiểu chủ yếu bằng cách giảm

hiệt độ và độ ẩm. Sau đây là một số phương pháp thường dùng trong việc bảo quản vi sinh vật :

a) Cấy chuyển thường xuyên trên thạch nghiêng hoặc trích sâu vào thạch. Sau khi đã sinh trưởng, vi khuẩn được giữ trong tủ lạnh ở $+4^{\circ}\text{C}$. Phương pháp này đơn giản nhất và thường được dùng, nhưng kém hiệu quả nhất.

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

c) Bảo quản trong cát hoặc đất sét vô trùng : Do cấu trúc lí - hóa cát và đất sét đều là những vật chất tốt mang các tế bào vi sinh vật, chủ yếu là các bào tử. Sau khi làm khô không khí cát (hoặc đất sét) cùng với vi khuẩn có thể bảo quản tế bào rất lâu.

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

e) Bảo quản trong glixerin (10%) và giữ trong tủ lạnh sâu (-60°C hay -80°C) : Đây là phương pháp rất thích hợp nhưng cần mua được loại ống nhựa chịu nhiệt (khí khử trùng).

3. SINH TRƯỞNG CỦA VI KHUẨN TRONG QUÁ TRÌNH NUÔI CẤY LIÊN TỤC

Trong phương pháp nuôi cấy tĩnh nói trên, các điều kiện môi trường luôn luôn thay đổi theo thời gian, mật độ vi khuẩn tăng lên còn nồng độ cơ chất giảm xuống. Vi khuẩn phải sinh trưởng và phát triển theo một số pha nhất định, sinh khối đạt được không cao. Tuy nhiên trong nhiều nghiên cứu và thực tiễn sản xuất ta cần cung cấp cho vi sinh vật những điều kiện ổn định để trong một thời gian dài chúng có thể vẫn sinh trưởng trong pha log. Dĩ nhiên ở một mức độ nào đó có thể cấy chuyển tế bào nhiều lần (qua những khoảng thời gian ngắn) vào môi trường dinh dưỡng mới. Nhưng đơn giản hơn, người ta đưa liên tục môi trường dinh dưỡng mới vào bình nuôi cấy vi khuẩn đồng thời loại khỏi bình một lượng tương ứng dịch vi khuẩn. Đây chính là cơ sở của phương pháp nuôi cấy liên tục trong chemostat và turbidostat.

Giả thử ta có một bình nuôi cấy trong đó vi khuẩn đang sinh trưởng phát triển. Ta cho chảy liên tục vào bình môi trường mới có thành phần không đổi. Thể tích bình nuôi cấy được giữ không đổi, nghĩa là dòng môi trường đi vào được bù bởi dòng môi trường đi ra với cùng tốc độ.

Ta gọi thể tích bình là v (lít) và tốc độ vào của môi trường dinh dưỡng, tốc độ dòng đi vào là f (lít/giờ). Do đó tốc độ pha loãng (còn gọi là hệ số pha loãng) D là f/v . Đại lượng D biểu thị sự thay đổi thể tích sau 1 giờ.

Nếu vi khuẩn không sinh trưởng và phát triển, chúng sẽ bị rút khỏi bình nuôi cấy với tốc độ :

$$v^- = -\frac{dX}{dt} = D.X$$

Ở đây X là sinh khối tế bào (g/l).

Tốc độ sinh trưởng của quần thể vi khuẩn trong bình cho bởi phương trình :

$$v^+ = \frac{dX}{dt} = \mu X$$

Tốc độ thay đổi cuối cùng (tăng hoặc giảm) mật độ vi khuẩn trong nuôi cấy liên tục là sự sai khác giữa tốc độ tăng và tốc độ giảm v^- :

$$v = v^+ - v^- = \frac{dX}{dt} = (\mu - D)X.$$

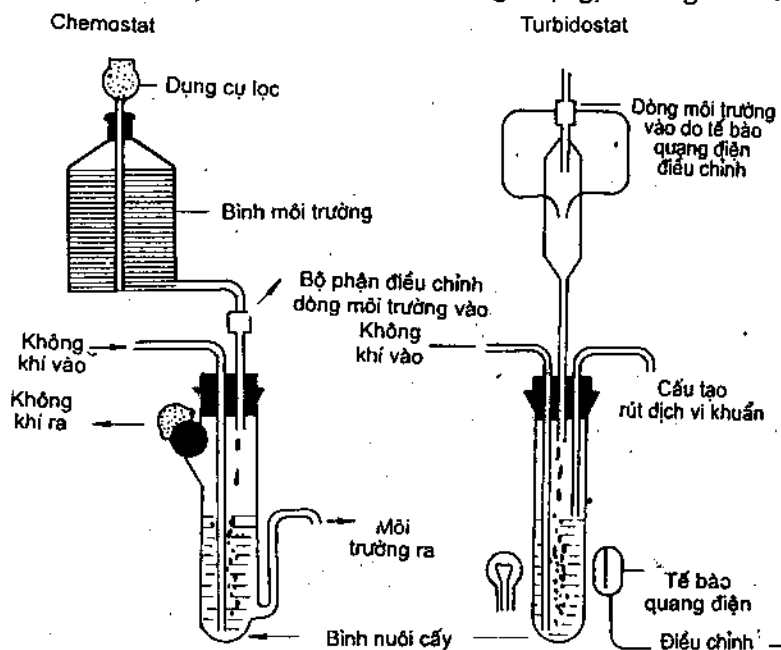
Nếu $\mu > D$ giá trị $v = dX/dt$ có giá trị dương, nghĩa là mật độ vi khuẩn trong bình tăng, ngược lại nếu $\mu < D$, v sẽ có giá trị âm và mật độ vi khuẩn trong bình giảm. Trong trường hợp đặc biệt $\mu = D$ ta có $v = 0$, nghĩa là mật độ tế bào không tăng không giảm theo thời gian, quần thể vi khuẩn ở trong trạng thái cân bằng động học.

Nếu bình thí nghiệm có thiết bị duy trì sao cho μ luôn luôn bằng D ta sẽ thu được quần thể vi khuẩn sinh trưởng và phát triển theo lũy thừa thường xuyên ở một mật độ tế bào không đổi và không phụ thuộc vào thời gian. Trong trường hợp như vậy không những kích thước trung bình của tế bào, trạng thái sinh lý của chúng mà cả môi trường nuôi cấy đều không đổi và không phụ thuộc vào thời gian. Điều này, một mặt tạo điều kiện cho việc nghiên cứu sinh trưởng và sinh lý của tế bào vi khuẩn, mặt khác cải thiện quá trình sản xuất vi sinh vật ở quy mô công nghiệp.

Chemostat và turbidostat là hai thiết bị nuôi cấy trong đó ta có thể duy trì được điều kiện $\mu = D$, (xem hình vẽ).

Chemostat gồm một bình nuôi cấy, dung dịch dinh dưỡng từ một bình dự trữ chảy vào đây với một tốc độ không đổi. Nhờ thông khí và khuấy cơ học bình nuôi cấy được cung cấp đầy đủ oxy và bảo đảm việc phân bố nhanh và đồng đều các chất dinh dưỡng trong dòng môi trường đi vào. Theo mức độ vào của môi trường mà dịch vi khuẩn được rút khỏi bình một cách thích hợp.

Sinh trưởng của vi khuẩn trong chemostat được điều chỉnh bởi nồng độ cơ chất. Chất dinh dưỡng hạn chế này có thể là một thành phần chủ yếu nào đó của môi trường. Phổ biến hơn cả là nguồn cacbon và năng lượng, nhưng thường người ta cũng



Nuôi cấy liên tục trong chemostat và turbidostat

chọn nguồn nitơ, photpho, lưu huỳnh hoặc Mg^{2+} . Như đã nói trên, μ là hàm số của nồng độ chất dinh dưỡng hạn chế.

$$\mu = \mu_{\max} \frac{[S]}{K_s + [S]}$$

Nghĩa là có vô số hàng số μ từ $\mu = 0$ đến $\mu = \mu_{\max}$ (hằng số tốc độ sinh trưởng cực đại đạt được khi bão hòa cơ chất) tùy theo nồng độ chất dinh dưỡng hạn chế miễn sao cho mật độ vi khuẩn trong bình không bị giảm. Như thế sẽ có một tốc độ pha loãng D_m , ở đó sinh khối vi khuẩn đạt được cực đại, nghĩa là $D_m = \mu_{\max}$.

Nói chung vi khuẩn có khả năng sinh trưởng với tốc độ cực đại ngay ở những nồng độ cơ chất thấp (chẳng hạn, 10mg glucosơ trong một lít môi trường). Chỉ ở những nồng độ thấp hơn nữa μ mới phụ thuộc vào $[S]$. Nếu ta chọn một tốc độ pha loãng nào đó $D < D_m$, nghĩa là $D < \mu_{\max}$ ta sẽ có $\mu < \mu_{\max}$ sao cho $D = \mu$. Trong môi trường nuôi cấy, giá trị $\mu < \mu_{\max}$ này sẽ được thiết lập một cách tự động. Giả dụ $D < \mu_{\max}$ và vi khuẩn sinh trưởng với một tốc độ nào đó từ $\mu = 0$ tới $\mu' = \mu_{\max}$. Nếu mật độ tế bào lớn hơn mật độ ở trạng thái ổn định khi $D = \mu$ thì tốc độ tiêu thụ chất dinh dưỡng hạn chế sẽ lớn hơn tốc độ tương ứng trong trạng thái cân bằng và nồng độ cơ chất này trong môi trường sẽ giảm. Kết quả μ cũng giảm, nghĩa là sinh khối và mật độ tế bào cũng giảm. Khi mật độ tế bào giảm xuống dưới mật độ tương ứng với trạng thái ổn định, tốc độ sử dụng chất dinh dưỡng hạn chế lại giảm xuống dưới giá trị tương ứng với trạng thái cân bằng. Do đó nồng độ chất dinh dưỡng hạn chế sẽ tăng, kết quả hằng số tốc độ sinh trưởng μ và mật độ tế bào đều tăng. Như vậy hệ thống phải tự điều chỉnh về trạng thái cân bằng động học để cho mật độ tế bào không tăng không giảm với $D = \mu$ và $DX/dt = 0$. Các chỉ số mật độ vi khuẩn, nồng độ cơ chất, thời gian tăng đôi và sản lượng tế bào đều phụ thuộc vào hệ số pha loãng D . Khi D thay đổi từ 0 đến hệ số pha loãng đột biến D_c (ở hệ số pha loãng này nồng độ cơ chất trong bình nuôi cấy bằng nồng độ cơ chất trong dòng môi trường đi vào và phần lớn vi khuẩn bị rút khỏi bình) mật độ vi khuẩn không thay đổi rõ rệt. Tế bào phản ứng với sự tăng D trong khoảng này bằng cách giảm thời gian tăng đôi g . Nhưng với sự tăng của D và sự giảm của g sản lượng tế bào sẽ tăng. Sản lượng đạt tới cực đại ở D_m . Nếu hệ số D lớn hơn nữa, sản lượng bị giảm nhanh chóng. Ở những giá trị của $D < D_m$ nồng độ cơ chất trong bình nuôi cấy vào do đó cũng trong dịch rút khỏi bình ở một khoảng khá rộng gần tới 0. Chỉ khi hệ số pha loãng gần tới giá trị D_m một phần cơ chất mới bị loại ra ngoài cùng với tế bào. Cuối cùng nồng độ cơ chất trong dòng môi trường đi ra và dòng môi trường đi vào bằng nhau.

Trái với chemostat hoạt động của turbidostat (từ chữ turbidity = độ đục) dựa vào việc duy trì mật độ (hoặc độ đục) vi khuẩn không đổi. Tế bào quang điện đo độ đục điều chỉnh môi trường đi vào bình qua một hệ thống role. Trong bình nuôi cấy tất cả chất dinh dưỡng đều ở nồng độ dư thừa và vi khuẩn sinh trưởng với tốc độ gần cực đại.

Nếu mật độ tế bào tăng quá giá trị cần thiết thì hệ số pha loãng sẽ tăng và phần tế bào thừa bị loại ra ngoài (vì $D > \mu_{\max}$). Ngược lại nếu mật độ tế bào giảm xuống dưới mức chọn lựa hệ số D lại giảm và mật độ tế bào sẽ tăng (vì $\mu_{\max} > D$). Kết quả của sự điều chỉnh là duy trì cho hệ số pha loãng $D = \mu_{\max}$.

Rõ ràng, về mặt kĩ thuật, phương pháp turbidostat phức tạp hơn chemostat.

Tóm lại, những sai khác chính giữa nuôi cấy tĩnh và nuôi cấy liên tục là như sau :

Nuôi cấy tĩnh được xem như hệ thống đóng, quần thể tế bào sinh trưởng trong đó phải trải qua các pha mở đầu logarit, ổn định và tử vong. Mỗi pha sinh trưởng được đặc trưng bởi những điều kiện nhất định. Việc điều khiển tự động khó thực hiện.

Nuôi cấy liên tục, trái lại, là hệ thống mở có khuynh hướng dẫn đến việc thiết lập một cân bằng động học. Yếu tố thời gian ở đây, trong phạm vi nhất định, bị loại trừ. Tế bào được cung cấp những điều kiện môi trường không đổi, nhờ việc điều chỉnh tự động.

Có thể biểu đạt bằng toán học quá trình nuôi cấy liên tục hay nuôi cấy mở một cách đơn giản như sau :

$$V \cdot \left(\frac{dx}{dt} \right) = QX_o - QX + V \left(\frac{dx}{dt} \right)_G$$

V : Thể tích dịch nuôi (l)

Q : Hệ số dòng chảy (l/h)

G (ở dưới) : biểu thị tăng trưởng

$$V \cdot \left(\frac{dx}{dt} \right) = QS_o - QS + V \left(-\frac{ds}{dt} \right)_c$$

c (ở dưới) : biểu thị tiêu hao

$$\text{Bởi vì : } \left(-\frac{ds}{dt} \right)_c = \left(\frac{-1}{\frac{dx}{dt}} \right) \cdot \left(\frac{1}{x} \cdot \frac{dx}{dt} \right) X = \frac{-1}{Y_{x/s}} \mu X$$

$Y_{x/s}$ = g sinh khối/g cơ chất

Thay thế vào và coi $\frac{ds}{dt} = 0$, ta có : $Y_{x/s} = \frac{dx}{ds} = \frac{x}{S_o - S}$. Như vậy là ở trạng thái

ổn định hiệu suất sinh trưởng có thể dùng nồng độ sinh khối X và nồng độ cơ chất S để biểu thị :

Theo mô hình của Monod thì :

$$\mu = D = \mu_m \frac{S}{k_s + S}$$

do đó :

$$S = k_s \left(\frac{D}{\mu_m - D} \right)$$

Thay thế vào công thức tính $Y_{x/s}$ ta có :

$$X = Y_{x/s} (S_o - S) = Y_{x/s} \left[S_o - k_s \left(\frac{D}{\mu_m - D} \right) \right]$$

Suy ra đơn vị thời gian để thu được sinh khối là :

$$D_x = D Y_{x/s} \left[S_o - k_s \left(\frac{D}{\mu_m - D} \right) \right]$$

Đồng thời có thể biết được lúc $D_m = \mu_m \left(1 - \sqrt{\frac{k_s}{k_s + S_o}} \right)$ thì D_x là sinh khối cực đại.

4. LÀM ĐỒNG BỘ SỰ PHÂN CHIA TẾ BÀO

Bình thường quần thể vi khuẩn đang sinh trưởng và phân chia là một hỗn hợp tế bào ở các pha sinh trưởng rất khác nhau của sự phân chia tế bào, nghĩa là vào lúc bất kì, trong môi trường nuôi cấy ta có thể đồng thời gặp các tế bào vừa phân chia xong, sắp phân chia hoặc ở những giai đoạn kế tiếp. Tuy nhiên muốn nghiên cứu các quá trình trao đổi chất trong suốt chu kì phân chia tế bào ta cần có một quần thể vi khuẩn trong đó các tế bào phân chia đồng thời (đồng bộ). Có thể làm đồng bộ sự phân chia tế bào bằng một phương pháp nhân tạo như thay đổi sinh lí tế bào hoặc dựa vào việc chọn lọc cơ học các tế bào có cùng kích thước.

Phương pháp sinh lí làm đồng bộ sự phân chia tế bào phổ biến là phương pháp *gây choáng nhiệt*. Như ta biết, trong những điều kiện nuôi cấy bình thường ở nhiệt độ thích hợp (ở vi khuẩn là 30°C, 37°C) các quá trình tổng hợp phần lớn các cao phân tử (ADN, ARN, protein) diễn ra song song và ở trạng thái cân bằng. Bằng cách giảm nhiệt độ ta sẽ phá hủy cân bằng này. Trong khi tổng hợp ADN còn tiếp tục một thời gian thì việc tổng hợp ARN và protein bị ngừng. Kết quả là sự phân chia tế bào cũng bị ngừng. Nếu phục hồi lại nhiệt độ thích hợp ban đầu thì chỉ sau một thời gian lag ngắn, tế bào sẽ bắt đầu phân chia nhưng bây giờ phân chia đồng bộ tức là phần lớn tế bào đều phân chia trong một khoảng thời gian tương đối ngắn. Sau khi nâng nhiệt độ quá trình tổng hợp ARN và protein được phục hồi còn hàm lượng ADN vẫn ở mức ban đầu tương ứng với chằng kết thúc nhân đôi của nhiễm sắc thể.

Tuy nhiên, sự phân chia đồng bộ, không phải là trạng thái bền vững, chỉ sau vài thế hệ tính đồng bộ lại bị phá hủy và quần thể vi khuẩn lại là một hỗn hợp tế bào ở các pha phân chia khác nhau.

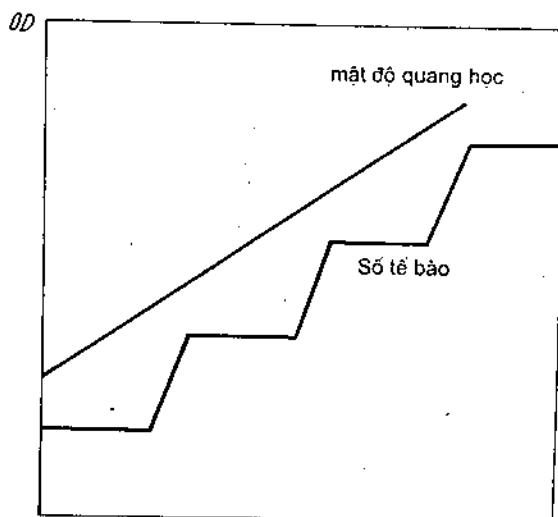
Phương pháp nâng cao nhiệt độ đã được ứng dụng đầu tiên với động vật nguyên sinh (*Tetrahymena*).

Việc phân tích sinh lí các tế bào phân chia đồng bộ chứng minh rằng do sự phá hủy thứ tự bình thường của sự phân chia nhiễm sắc thể và sự phân chia tế bào mà gây nên hiện tượng sinh trưởng mất cân bằng đó là nguyên nhân của sự phân chia đồng bộ. Như ta biết điều kiện để mở đầu việc phân chia tế bào là sự kết thúc quá trình nhân đôi nhiễm sắc thể. Mặt khác, một khi đã ở trong trạng thái nhân đôi nhiễm sắc thể sẽ độc lập với các điều kiện sinh trưởng và chu trình nhân đôi sẽ hoàn thành ngay khi tổng hợp protein bị kìm hãm bởi cloramphenicol hoặc bởi một axit amin chủ yếu.

Trên cơ sở của những kết quả này ta có thể hiểu được nguyên tắc làm đồng bộ không phải chỉ bằng gây choáng nhiệt mà nói chung bằng mọi tác động khác đến trạng thái sinh lí bình thường của tế bào. Nhiệt độ thấp làm ngừng tổng hợp ARN và protein nhưng việc nhân đôi nhiễm sắc thể vẫn được hoàn thành mặc dù với tốc độ chậm. Do tổng hợp ARN và protein bị kìm hãm mà sự phân chia tế bào và sinh trưởng cũng bị ngừng. Bởi vì dễ hiểu rằng, tổng hợp protein là cần không những cho việc mở đầu một chu trình nhân đôi mới của ADN mà cả cho việc tổng hợp các enzym và các cấu trúc cần thiết đối với sự hình thành vách ngăn ngang. Còn sinh trưởng bị ngừng thì có thể hiểu rằng vì protein là thành phần chủ yếu của tế bào và sinh trưởng đòi hỏi có những enzym thường xuyên hoạt động không những tham gia vào các quá trình sinh tổng hợp mà cả vào các quá trình phân giải (quá trình cung cấp năng lượng và các tiền chất cho việc tổng hợp). Nguyên nhân trực tiếp của sự phân chia đồng bộ sau khi phục hồi nhiệt độ thích hợp là trạng thái giống nhau của sự nhân đôi nhiễm

sắc thể. Vào cuối lúc gây choáng lạnh tất cả vi khuẩn đều chứa một nhiễm sắc thể đã nhân đôi, bất kể tế bào đã ở giai đoạn nào của sự nhân đôi khi hạ nhiệt độ. Việc phục hồi nhiệt độ dẫn đến việc hoạt động đồng thời của các quá trình kế tiếp sự nhân đôi : phân li nhiễm sắc thể và hình thành các vách ngang.

Sự phân chia của một quần thể đồng bộ diễn ra theo kiểu bậc thang. Trước mỗi "bậc" biểu thị sự tăng đột ngột số tế bào là bước chuẩn bị cho việc phân chia bao gồm việc nhân đôi nhiễm sắc thể và tổng hợp các protein tế bào. Khoảng cách thời gian giữa hai lần phân chia của quần thể trùng với thời gian thế hệ trong điều kiện nuôi cấy đã cho. Khác với tiến trình của sự phân chia, sinh trưởng diễn ra theo lũy thừa sau khi phục hồi nhiệt độ bình thường. Trên đồ thị, đường biểu diễn tăng sinh khối là đường thẳng (nếu sử dụng \log_2 của mật độ quang học), còn đường biểu diễn số tế bào tăng theo bậc thang như hình sau :



Đường biểu diễn quá trình phân chia tế bào (số tế bào) và sinh trưởng (mật độ quang học) của quần thể vi khuẩn được làm đồng bộ bằng choáng lạnh ; sinh trưởng và phân chia được theo dõi sau khi chuyển sang nhiệt độ thích hợp.

Một phương pháp sinh lý khác làm đồng bộ sự phân chia tế bào là *thay đổi thành phần của môi trường*.

Nếu vào một lúc nào đó ta loại khỏi môi trường nuôi cấy một chất dinh dưỡng hoặc một chất trao đổi chủ yếu nào đó vi khuẩn sẽ sinh trưởng mất cân bằng : sau khi phục hồi nồng độ chất này, tế bào sẽ phân chia đồng bộ. Chẳng hạn, có thể gây đói timin trong thời gian ngắn ở các biến chủng *E. coli* trợ dưỡng đối với timin hoặc gây đói một số axit amin cần thiết cho sinh tổng hợp các protein của tế bào.

Về nguyên tắc làm đồng bộ sự phân chia tế bào bằng gây đói axit amin ta có thể giải thích như sau. Trong trường hợp này tổng hợp ARN và protein bị ngừng ngay nhưng quá trình nhân đôi nhiễm sắc thể, nếu đã mở đầu, vẫn có thể diễn ra cho đến khi hoàn thành. Nguyên nhân ở đây lại là sự sinh trưởng mất cân bằng trong thời gian đói axit amin. Vì bước mở đầu một chu trình nhân đôi mới liên quan chặt chẽ đến tổng hợp protein nên nhiễm sắc thể của tất cả vi khuẩn sau khi đã nhân đôi thì ngừng lại. Việc thêm axit amin sẽ phục hồi tổng hợp ARN và protein, do đó cũng kích thích phản ứng mở đầu chu trình nhân đôi mới sau khi các nhiễm sắc thể nhân đôi

đã được phân li. Như thế làm đồng bộ sự phân chia tế bào là hậu quả của việc làm đồng bộ sự phân chia nhiễm sắc thể.

Nguyên tắc làm đồng bộ bằng gây đói timin, từ quan điểm tổng hợp ADN, vẫn chưa được giải thích. Việc loại bỏ timin cũng đồng thời làm ngừng tổng hợp ADN, nghĩa là các tế bào trong quần thể chứa nhiễm sắc thể ở các giai đoạn khác nhau của sự nhân đôi. Khoảng thời gian gây đói không được quá giới hạn 30 - 45 phút, nếu không sau đó tế bào sẽ chết vì thiếu timin. Đây là quá trình không thuận nghịch, không thể loại bỏ bằng cách thêm đầy đủ timin.

Phương pháp chọn lọc cơ học xuất phát từ thực tế các tế bào cá thể vào thời kì trước khi phân chia đều tăng thể tích. Trong một quần thể vi khuẩn sinh trưởng dưới những điều kiện bình thường, những tế bào nhỏ nhất chính là những tế bào vừa phân chia xong. Nếu chọn lọc riêng những tế bào này ra ta sẽ thu được các vi khuẩn mà sau khi nuôi cấy tiếp sẽ phân chia đồng bộ. Người ta đã dùng các màng lọc có kích thước lỗ tương ứng với các vi khuẩn nhỏ nhất, kết quả cho khá tốt. Ngoài ra cũng có thể chọn lọc bằng cách li tâm các tế bào.

Ý nghĩa của việc làm đồng bộ sự phân chia tế bào là ở chỗ nó cho ta khả năng nghiên cứu một quần thể tế bào đồng nhất, nghĩa là trong đó các đặc tính hình thái và sinh lí của một tế bào tương ứng với của cả quần thể. Nhờ đó ta có thể chứng minh được rằng các thành phần của tế bào vi khuẩn không được tổng hợp với tốc độ như nhau vào thời gian giữa hai lần phân chia. Chẳng hạn, trong quá trình phân chia tế bào *Azotobacter vinelandii* ngừng tổng hợp ADN nhưng tăng cường tổng hợp các axit amin tự do. Trái lại, hàm lượng ARN và protein tăng như nhau trong pha này.

5. CÁC PHƯƠNG PHÁP XÁC ĐỊNH SINH TRƯỞNG VÀ PHÁT TRIỂN CỦA VI KHUẨN

Như đã nói trên, giữa số lượng tế bào và sinh khối mặc dù có mối liên hệ theo tỉ lệ thuận $y = kx$ nhưng mối liên hệ này chỉ đúng trong điều kiện thí nghiệm rất hạn chế, không có ý nghĩa phổ biến. Điều này chính là do kích thước và khối lượng của từng vi khuẩn thay đổi tùy theo loài và chủng, trong quá trình sinh trưởng thì phụ thuộc vào thời gian (ở các pha của đường cong sinh trưởng), vào tốc độ sinh trưởng, thành phần môi trường nuôi cấy và vào điều kiện nuôi cấy. Vì vậy trong việc theo dõi sinh trưởng và phát triển của vi khuẩn cần phân biệt các phương pháp xác định số lượng tế bào và sinh khối.

5.1. Các phương pháp xác định số lượng tế bào

Trong một quần thể vi khuẩn không phải mọi tế bào đều có khả năng sống. Những vi khuẩn gọi là sống phải tạo thành khuẩn lạc trên (hoặc trong) môi trường thạch và phát triển trong môi trường dịch thể. Do đó tùy theo mục đích thí nghiệm ta có thể xác định số lượng tế bào tổng cộng (cả tế bào sống và chết) hoặc số lượng tế bào sống.

Để xác định số lượng tế bào tổng cộng người ta thường dùng phương pháp đếm tế bào trực tiếp dưới kính hiển vi nhờ các "phòng đếm" (phòng đếm Neubauer, Thom hoặc Petrof - Hauser). Nếu chiều dày của lớp dịch chứa vi khuẩn là 0,02mm và cạnh hình vuông là 0,05mm (thể tích $5 \cdot 10^{-8} \text{ cm}^3$) thì muốn xác định số lượng tế bào trong 1ml phải nhân số tìm thấy với $2 \cdot 10^7$.

21.09.198

Cần chú ý là sau khi tể bào vào "phòng đếm" phải đợi một thời gian để vi khuẩn lắng và nằm trong một mặt phẳng quang học. Nếu tể bào chuyển động tích cực phải dùng focmaldehit giết chết trước.

Có thể dùng kĩ thuật nhuộm đặc biệt để phân biệt tể bào sống và tể bào chết. Do tể bào sống có màng sinh chất hoạt động, không thấm thuốc nhuộm nên hai loại tể bào bắt màu không giống nhau. Chẳng hạn Đỏ congo chỉ nhuộm màu tể bào chết, còn tể bào sống không màu.

Cần nhấn mạnh rằng kết quả nhuộm màu phụ thuộc vào nhiều yếu tố : loài vi khuẩn, độ pha loãng của thuốc nhuộm, pH... Ví dụ, các tể bào sống của *C. acetobutylicum* bắt màu xanh và các tể bào chết bắt màu đỏ khi dùng Acridin orange với nồng độ 1 : 10.000. Kết quả sẽ ngược lại nếu dùng Acridin orange 1 : 5000.

Trong trường hợp xác định số lượng tể bào sống người ta thường đếm số khuẩn lạc tạo thành bởi các vi khuẩn sống trong điều kiện sinh trưởng thuận lợi. Dịch treo vi khuẩn được pha loãng và một thể tích nhất định được đưa lên môi trường thạch trong hộp Petri. Sau khi nuôi cấy người ta đếm số khuẩn lạc mọc lên. Nếu giả dụ rằng mỗi tể bào tạo thành một khuẩn lạc thì đếm số khuẩn lạc ta sẽ đếm được số tể bào sống. Tất nhiên điều này không đúng đối với các vi khuẩn mọc thành chuỗi, thành đôi hay thành đám hoặc đối với các dịch treo vi khuẩn không đồng nhất. Ngoài ra cũng cần chọn độ pha loãng vi khuẩn thích hợp sao cho số khuẩn lạc không ít (kém chính xác) không nhiều (khuẩn lạc có thể bị xít vào nhau và hai tể bào có thể cho một khuẩn lạc). Thường trên một hộp thạch số khuẩn lạc từ 40 đến 400 là thích hợp.

Số khuẩn lạc cũng rất phụ thuộc vào thành phần môi trường. Tể bào mọc thành khuẩn lạc trên môi trường này không nhất thiết cũng cho xuất hiện khuẩn lạc trên môi trường khác.

Với một số loại vi khuẩn khó phát triển trên môi trường thạch người ta có thể kiểm tra số lượng bằng phương pháp pha loãng liên tiếp sau đó cấy từ mỗi độ pha loãng 1ml vào từng ống đựng môi trường chỉ thị (nếu có 1 vi khuẩn đưa vào cũng đủ cho phản ứng dương tính sau khi nuôi cấy). Phương pháp này gọi là phương pháp số lượng có khả năng nhất (MPN, Most Probable Number). Có thể cấy vào 5 ống và lấy số liệu ở 3 độ pha loãng cuối (có phản ứng dương tính) rồi tra bảng để tìm ra số lượng gần đúng mật độ vi khuẩn.

Còn có thể lọc chất dịch qua màng lọc vi khuẩn rồi đặt màng lọc lên đĩa môi trường thạch để kiểm tra số khuẩn lạc sẽ mọc và suy ra mật độ vi sinh vật trong chất dịch.

5.2. Các phương pháp xác định sinh khối tể bào

Việc chọn phương pháp để xác định sinh khối vi khuẩn tùy thuộc vào mục đích nghiên cứu. Chẳng hạn, muốn đánh giá sản lượng tể bào thì ta cần sinh khối tươi hoặc khô sau khi đã li tâm tể bào ; muốn xác định cường độ trao đổi chất hay hoạt tính men, người ta lại tính hàm lượng protein hoặc nitơ. Như vậy, trong thực tế có thể sử dụng các phương pháp trực tiếp hoặc gián tiếp.

Các phương pháp trực tiếp gồm có :

1. Xác định sinh khối tươi hoặc sinh khối khô (phương pháp này kém chính xác).

0004
198.196

2. Xác định hàm lượng nitơ tổng số (phương pháp micro - Kjeldal và phương pháp xác định NH_3 hay hàm lượng cacbon tổng số (theo Van Slike-Folch). Các phương pháp này cho độ chính xác cao.

3. Trong thực tế hàng ngày người ta thường xác định hàm lượng protein của vi khuẩn. Có thể dùng phương pháp biure cải tiến hoặc phương pháp so màu khác. Các phương pháp vi lượng dựa vào việc đo số lượng các thành phần đặc trưng của protein như tirozin, triptophan (theo Lowry hoặc Folin-Ciocalteu) cũng cho kết quả tốt.

Có thể nói xác định hàm lượng protein trong sinh khối là phương pháp thích hợp nhất vì một mặt protein là thành phần chủ yếu của chất khô, mặt khác đó là những thành phần hoạt động trong sinh khối (hầu hết protein của tế bào là enzim).

Các phương pháp gián tiếp để đo sinh khối vi khuẩn có thể kể :

1. Đo độ đục của dịch treo tế bào. Đây là phương pháp rất thuận lợi. Trong thực tế ta thường đo mật độ quang học của dịch treo (dịch huyền phù). Trong một số trường hợp người ta cũng xác định sự khuếch tán ánh sáng.

Tuy nhiên sự phụ thuộc theo đường thẳng giữa hai chỉ số này với sinh khối vi khuẩn chỉ thấy trong vùng các giá trị rất thấp của mật độ tế bào. Vì sự khuếch tán ánh sáng phụ thuộc vào đường kính, hình dạng và chỉ số chiết quang của các hạt khuếch tán nên thỉnh thoảng cần kiểm tra lại tương quan giữa các đại lượng quang học và các chỉ số đo như sinh khối khô, hàm lượng nitơ hoặc hàm lượng cacbon.

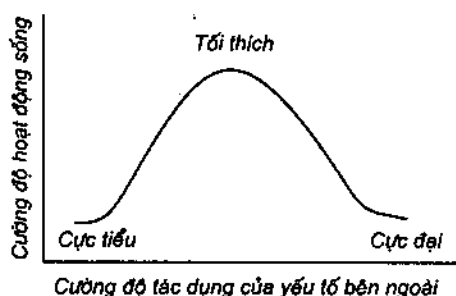
Cũng cần chú ý rằng đối với khí cùng một sinh khối vi khuẩn trong dịch treo nhưng có thể có mật độ quang học khác nhau. Chẳng hạn mật độ quang học đối với 1mg/ml chất khô của *E.coli* trong pha log là 1,54 còn trong pha ổn định là 2,38. Giá trị của mật độ quang học (O.D)/mg chất khô cũng thay đổi theo tốc độ sinh trưởng. Hơn nữa mật độ quang học của một số vi khuẩn Gram âm (*P.aeruginosa*, *E.coli*) phụ thuộc mạnh mẽ vào nồng độ các chất có hoạt tính thẩm thấu như NaCl, saccarozo, do đó áp suất thẩm thấu tăng mà kích thước tế bào giảm dẫn đến tăng O.D.

2. Đo các chỉ số cường độ trao đổi chất như hấp thụ O_2 , tạo thành CO_2 hay axit, vì các chỉ số này liên quan trực tiếp với sinh trưởng. Dĩ nhiên ta chỉ dùng các phương pháp này trong trường hợp không sử dụng được các phương pháp khác, ví dụ khi mật độ sinh khối rất nhỏ.

Để đo các chỉ số nói trên có thể dùng các phương pháp chuẩn độ, manomet, điện hóa...

6. TÁC DỤNG CỦA CÁC YẾU TỐ BÊN NGOÀI LÊN SINH TRƯỞNG VÀ PHÁT TRIỂN CỦA VI KHUẨN

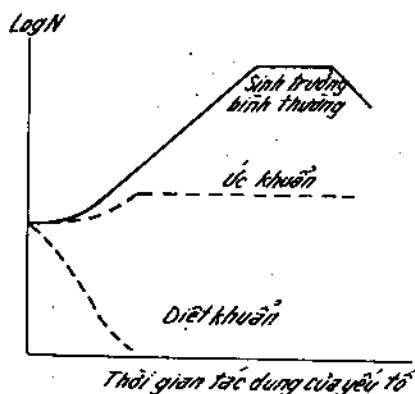
Sinh trưởng và trao đổi chất của vi khuẩn liên quan chặt chẽ với các điều kiện của môi trường bên ngoài. Các điều kiện này bao gồm hàng loạt các yếu tố khác nhau, tác động qua lại với nhau. Đa số các yếu tố đó đều có một đặc tính tác dụng chung biểu hiện ở ba điểm hoạt động : tối thiểu, tối thích và cực đại.



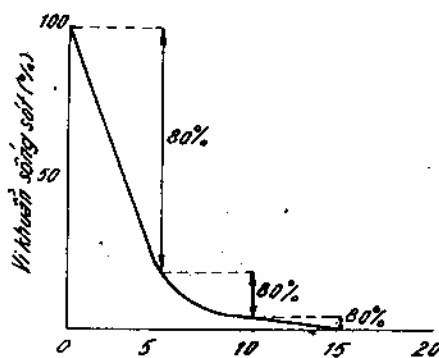
Đồ thị biểu diễn tác dụng của yếu tố bên ngoài lên vi khuẩn

Với tác dụng tối thiểu của yếu tố môi trường vi khuẩn bắt đầu sinh trưởng và mở đầu các quá trình trao đổi chất, với tác dụng tối thích vi khuẩn sinh trưởng, với tốc độ cực đại và biểu hiện hoạt tính trao đổi chất, trao đổi năng lượng lớn nhất, với tác dụng cực đại vi khuẩn ngừng sinh trưởng và thường chết.

Ảnh hưởng của các yếu tố môi trường lên vi khuẩn có thể là thuận lợi hoặc bất lợi. Ảnh hưởng bất lợi sẽ dẫn đến tác dụng *ức khuẩn* hoặc *diệt khuẩn*. Do tác dụng ức khuẩn của yếu tố môi trường, tế bào ngừng phân chia, nếu loại bỏ yếu tố này khỏi môi trường vi khuẩn lại tiếp tục sinh trưởng và phát triển. Khi có mặt chất diệt khuẩn, trái lại vi khuẩn ngừng sinh trưởng, phát triển và chết nhanh chóng. Sự chết của tế bào thường không xảy ra ngay một lúc trong cả quần thể và diễn ra dần dần, có thể biểu diễn bằng đường cong từ vong logarit (hình A và B).



A
Tác dụng ức khuẩn và diệt khuẩn của yếu tố bên ngoài



B
Tốc độ chết của vi khuẩn tùy theo thời gian tác dụng của chất diệt khuẩn (đường cong từ vong logarit)

Một số yếu tố, chủ yếu là các hóa chất, có thể hiện tác dụng ức khuẩn hoặc diệt khuẩn tùy theo nồng độ.

Tác dụng kháng khuẩn của các yếu tố bên ngoài chịu ảnh hưởng của một số điều kiện như *tính chất và cường độ tác dụng của bản thân yếu tố* (nhiệt độ hoặc liều lượng tia chiếu tăng giảm, nồng độ hóa chất cao thấp), *đặc tính của cơ thể* (đặc tính loài, trạng thái sinh lý của tế bào, tế bào sinh trưởng hay bào tử) và *tính chất của môi trường* (ví dụ : môi trường có độ nhớt cao hoặc môi trường chứa các chất hữu cơ làm yếu tác dụng của yếu tố bên ngoài, còn nhiệt độ tăng hoặc pH thay đổi thì ảnh hưởng ngược lại).

6.1. Cơ chế tác dụng của các yếu tố bên ngoài lên vi khuẩn

Các yếu tố của môi trường bên ngoài tác dụng lên tế bào thuộc ba loại : yếu tố vật lý (độ ẩm, nhiệt độ áp lực, tia bức xạ...), yếu tố hóa học (pH môi trường, thể oxi hóa khử, các chất diệt khuẩn)... và yếu tố sinh học (chất kháng sinh). Dù là yếu tố nào nhưng khi đã tác dụng bất lợi lên tế bào thì thường trước hết gây tổn hại đến các cấu trúc quan trọng cho sự sống của tế bào. Những tổn hại đó dẫn đến phá hủy chức phận hoạt động của các cấu trúc và làm tế bào chết. Chứng nào tế bào có thể sống sót chính là do chúng đã thích ứng với yếu tố đã cho bằng những thay đổi về sinh lý hoặc di truyền.

Tác dụng có hại của các yếu tố bên ngoài tế bào vi khuẩn thể hiện chủ yếu ở những biến đổi sau đây :

1. *Phá hủy thành tế bào.* Một số chất như lizozim (chứa trong lá lách, bạch cầu, lòng trắng trứng, thành tế bào vi khuẩn, đuôi thực khuẩn thể...) có khả năng phân hủy thành tế bào vi khuẩn dẫn đến tạo thành các nguyên lập chủ yếu ở vi khuẩn G^+ , và các cấu lập ở vi khuẩn G^- (1).

Trong sự có mặt của penixilin, các cấu lập được hình thành và dễ phân hủy. Ở vi khuẩn G^- , do tác dụng của chất kháng sinh này, tế bào tạo thành các dạng hình cầu mất cảm với áp suất thẩm thấu tương tự với các dạng L của vi khuẩn.

2. *Biến đổi tính thấm của màng tế bào chất.* Một số chất không nhất thiết phải xâm nhập tế bào, nhưng vẫn gây tác dụng kháng khuẩn. Do tác dụng lên một hoặc một số chức phận sinh lý của màng tế bào chất này làm vi khuẩn mất khả năng sinh sản. Rất có thể, trong trường hợp như vậy, hàng rào thẩm thấu tồn tại trong màng tế bào chất đã bị hư hại.

Tác dụng kháng khuẩn của các chất oxi hóa và các chất khử (H_2O_2 , các halogen...) là do ảnh hưởng của chúng lên các thành phần của màng tế bào chất. Cũng có thể xếp vào nhóm các hợp chất này, các rượu, phenol, các chất tẩy rửa tổng hợp, các muối mật và một số kháng sinh (polimixin, tiroxin, xirculen, nistatin).

3. *Thay đổi đặc tính keo của nguyên sinh chất.* Các yếu tố vật lý cũng như hóa học đều có thể gây nên tác dụng này. Chẳng hạn, nhiệt độ cao làm biến tính protein, và làm chúng đông tụ. Do khả năng khử nước ancol cũng làm đông tụ protein.

4. *Kìm hãm hoạt tính.* Một số chất tác động vào các hệ thống sinh năng lượng của tế bào xianit kìm hãm enzym xitocrom - oxidaza, fluorit ngăn cản quá trình đường phân, các hợp chất hóa trị ba của acsenic bao vây chu trình xitric, dinitrophenol kìm hãm quá trình photphoryl - oxi hóa. Các chất oxi hóa mạnh (H_2O_2 , halogen) phá hủy các hệ thống tế bào làm tổn hại đến chức phận trao đổi chất. Các enzym khác có thể bị bất hoạt khi liên kết với các yếu tố kim loại như thủy ngân.

(1) Các nguyên lập bị mất hoàn toàn thành tế bào, các cấu lập còn chứa trên bề mặt những mảnh nhỏ của thành tế bào.

5. *Hủy hoại các quá trình tổng hợp.* Trong sự có mặt của một số chất tương tự về mặt cấu trúc với các chất trao đổi tự nhiên, gọi là các chất antimetabolit quá trình sinh tổng hợp có thể bị ức chế. Cơ chế tác dụng của các chất antimetabolit không giống nhau. Một số gắn với trung tâm hoạt động của enzym nhưng không tham gia vào phản ứng khiến enzym mất hoạt tính phân hủy cơ chất; một số khác có thể tham gia vào phản ứng enzym và được lắp vào sản phẩm của phản ứng nhưng sau đó không được sử dụng trong trao đổi chất với cùng mức độ như trong trường hợp của cơ chất thực.

6.2. Các yếu tố vật lý

Độ ẩm. Hầu hết các quá trình sống của vi khuẩn có liên quan đến nước do đó độ ẩm là một yếu tố quan trọng của môi trường. Đa số vi khuẩn thuộc các sinh vật ưa nước nghĩa là chúng cần nước ở dạng tự do, dễ hấp thụ. Chỉ một số xạ khuẩn có thể xếp vào bọn ưa khô (xerophilic) vì chúng sử dụng được cả nước hygroscopic gắn trên bề mặt các hạt đất ở dạng các phân tử. Khi thiếu nước sẽ xảy ra hiện tượng loại nước khỏi tế bào vi khuẩn, trao đổi chất bị giảm và tế bào chết. Một số đơn cầu khuẩn G^- rất mẫn cảm với sự khô hạn, bị chết trong môi trường thiếu nước sau vài giờ. Trong điều kiện như vậy, các loài *Streptococcus* có thể chịu được hàng tuần. Đặc biệt, vi khuẩn thuộc giống *Mycobacterium* có sức đề kháng cao với không khí khô (ví dụ trực khuẩn lao *M. tuberculosis*). So với tế bào sinh dưỡng các bào tử chịu đựng được khô hạn hơn rất nhiều. Nếu làm lạnh tế bào đồng thời làm khô trong chân không ta có thể bảo quản được sức sống của tế bào trong một thời gian dài. Đây là nguyên tắc của phương pháp làm đông khô vi khuẩn.

Do vi khuẩn cần độ ẩm nhất định để sinh trưởng nên bằng cách phơi khô hoặc sấy khô ta có thể bảo quản được lâu dài nhiều loại sản phẩm (hoa quả khô, cỏ khô, ruốc thịt khô).

Nhiệt độ. Hoạt động trao đổi chất của vi khuẩn có thể coi là kết quả của các phản ứng hóa học. Vì các phản ứng này phụ thuộc chặt chẽ vào nhiệt độ nên yếu tố nhiệt độ rõ ràng ảnh hưởng sâu sắc đến các quá trình sống của tế bào. Tế bào thu được nhiệt chủ yếu từ môi trường bên ngoài, một phần cũng do cơ thể thải ra do kết quả của hoạt động trao đổi chất.

Như đã nói trên, hoạt động của vi sinh vật bị giới hạn trong môi trường chứa nước ở dạng có thể hấp thụ. Vùng này của nước nằm từ 2° đến khoảng 100° gọi là vùng *sinh động học*. Hầu hết tế bào sinh dưỡng của vi sinh vật bị chết ở nhiệt độ cao protein bị biến tính, một hoặc hàng loạt enzym bị bất hoạt. Các enzym hô hấp đặc biệt là các enzym trong chu trình Krebs rất mẫn cảm với nhiệt độ. Sự chết của vi khuẩn ở nhiệt độ cao cũng có thể còn là hậu quả của sự bất hoạt hóa ARN và sự phá hoại màng tế bào chất (nói chung, các axit nucleic ít mẫn cảm với nhiệt độ so với các enzym).

Nhiệt độ thấp (dưới vùng sinh động học) có thể làm bất hoạt quá trình vận chuyển các chất hòa tan qua màng tế bào chất do thay đổi hình không gian của một số permeaza chứa trong màng hoặc ảnh hưởng đến việc hình thành và tiêu thụ ATP cần cho quá trình vận chuyển chủ động các chất dinh dưỡng.

Vi khuẩn thường chịu đựng được nhiệt độ thấp. Ở nhiệt độ dưới điểm băng hoặc thấp hơn chúng không thể hiện hoạt động trao đổi chất rõ rệt. Nhiệt độ thấp có thể coi là yếu tố ức khuẩn nếu làm lạnh khá nhanh. Trong trường hợp làm lạnh dần dần xuống dưới điểm băng cấu trúc của tế bào bị tổn hại do các tinh thể băng được tạo thành nhưng kích thước nhỏ, do tế bào không bị phá hủy. Nếu làm lạnh trong chân không các tinh thể băng sẽ thăng hoa. Đó là phương pháp đông khô để bảo quản vi sinh vật.

Giới hạn giữa nhiệt độ cực tiểu và nhiệt độ cực đại là vùng nhiệt sinh trưởng của vi sinh vật. Giới hạn này rất khác nhau giữa các loài vi khuẩn : tương đối rộng ở các vi khuẩn hoại sinh, nhưng rất hẹp ở các vi khuẩn gây bệnh. Tùy theo quan hệ với vùng nhiệt có thể chia vi khuẩn thành một số nhóm :

a) *Vi khuẩn ưa lạnh* (psychrophilic) sinh trưởng tốt nhất ở nhiệt độ dưới 20°C, thường gặp trong nước biển, các hồ sâu và suối nước lạnh, chẳng hạn vi khuẩn phát quang, vi khuẩn sắt. Hoạt tính trao đổi chất ở các vi khuẩn này thấp. Trong điều kiện phòng thí nghiệm nhiều vi khuẩn ưa lạnh dễ dàng thích ứng với nhiệt độ cao hơn.

b) *Vi khuẩn ưa ấm* (mesophilic) chiếm đa số, cần nhiệt độ trong khoảng 20°C - 40°C. Ngoài các dạng hoại sinh ta còn gặp các loài kí sinh, gây bệnh cho người và động vật, chúng sinh trưởng tốt nhất ở 37°C ứng với nhiệt độ của cơ thể người và động vật.

c) *Vi khuẩn ưa nóng* (thermophilic) sinh trưởng tốt nhất ở 55°C. Một số không sinh trưởng ở nhiệt độ dưới + 30°C. Nhiệt độ sinh trưởng cực đại của các vi khuẩn ưa nóng dao động giữa + 75° và + 80°C.

Các vi sinh vật ưa nóng gồm chủ yếu là các xạ khuẩn, các vi khuẩn sinh bào tử, thanh tảo và nấm mốc. Thường gặp chúng trong suối nước nóng, trong phân ủ.

Các giới hạn nhiệt độ cực tiểu, cực đại và tối thích của các nhóm vi khuẩn ưa ấm và ưa nóng được trình bày trong bảng sau đây :

Nhóm vi khuẩn	Nhiệt độ sinh trưởng (°C)		
	Cực tiểu	Tối thích	Cực đại
Ưa lạnh	0 - 5	5 - 15	15 - 20
Ưa ấm	10 - 20	20 - 40	40 - 45
Ưa nóng	25 - 45	45 - 60	60 - 80

Các loài *Bacillus* sống trong đất thường có nhiệt độ sinh trưởng khá rộng (15 - 40°C). Vi khuẩn *E.coli* có nhiệt độ sinh trưởng 10 - 47,5°C. Vi khuẩn gây bệnh lậu (*Neisseria gonorrhoeae*) phát triển ở nhiệt độ 36 - 40°C. Năm 1983 J.A.Baross đã phát hiện được dưới đáy biển Thái Bình Dương có một loài vi khuẩn ưa nhiệt, sinh trưởng thích hợp ở 250 - 300°C.

Có tác giả chia nhóm vi khuẩn ưa ấm ra làm 2 nhóm : nhóm ưa nhiệt độ phòng (khoảng 25°C), nhóm ưa thân nhiệt (khoảng 37°C).

Đáng lưu ý là cùng một loài vi sinh vật tùy theo quá trình sinh lí khác nhau mà đòi hỏi những nhiệt độ tối thích khác nhau. Dưới đây là một số ví dụ :

Nhiệt độ tối thích phù hợp với các quá trình sinh lí khác nhau

Vi sinh vật	Nhiệt độ sinh trưởng (°C)	Nhiệt độ lên men (°C)
<i>Streptococcus thermophilus</i>	37	47
<i>S. lactis</i>	34	40
<i>Streptomyces griseus</i>	37	28
<i>Corynebacterium pekinense</i>	32	33 - 35
<i>Clostridium acetobutylicum</i>	37	33
<i>Penicillium chrysogenum</i>	30	25

Ngoài ra cũng cần kể đến nhóm *vi sinh vật chịu nhiệt* (thermotolerent) thường sinh trưởng thích hợp ở nhiệt độ trung bình nhưng có thể chịu được nhiệt độ cao hơn. Chẳng hạn vi khuẩn *Methylococcus capsulatus* sinh trưởng thích hợp ở 37°C nhưng còn sinh trưởng được ở +55°C.

Áp lực, áp suất thẩm thấu và áp suất thủy tĩnh có thể ảnh hưởng đến cấu trúc của tế bào vi khuẩn.

Màng tế bào chất của vi khuẩn là bán thấm do các hiện tượng thẩm thấu và việc điều chỉnh thẩm áp qua các hệ thống permeaza đều có liên quan đến màng này. Trong môi trường ưu trương tế bào mất khả năng rút nước và các chất dinh dưỡng hòa tan bao quanh : tế bào chịu trạng thái *khô sinh lí*, bị co sinh chất và có thể bị chết nếu kéo dài. Trong thực tế người ta ứng dụng tác dụng co sinh chất của các nồng độ muối cao (10 - 15%) hoặc đường cao (50 - 80%) để bảo quản thực phẩm (muối dưa, cà, ướp thịt cá) hoa quả (làm mứt) vì đa số vi sinh vật rất mẫn cảm với thẩm áp cao của môi trường. Ngược lại khi vi khuẩn vào dung dịch nhược trương nước sẽ xâm nhập tế bào, áp lực bên trong sẽ tăng lên. Tuy nhiên do có thành tế bào cứng ở vi khuẩn không xảy ra hiện tượng vỡ sinh chất như ở tế bào thực vật.

Đa số vi khuẩn sinh trưởng tốt trong môi trường chứa ít hơn 2% muối, nồng độ cao hơn có hại cho tế bào. Nhưng cũng có một số vi khuẩn lại sinh trưởng tốt nhất trong môi trường chứa tới 30% muối. Ta gọi là các vi khuẩn *ưa muối* (halophilic). Nhiều vi khuẩn ở biển thuộc nhóm này, chúng không có khả năng phát triển ở những nồng độ đường cao gọi là vi khuẩn *ưa đường* (saccharophilic) hoặc *ưa thẩm áp* (osimophilic).

Trong hoạt động sống của mình, vi khuẩn thường chịu ảnh hưởng của những thay đổi áp lực thủy tĩnh. Ở nhiệt độ bình thường áp lực cao có thể làm chậm hoặc làm mất khả năng di động, làm ngừng sinh trưởng, làm yếu động lực và làm thay đổi trao đổi chất nhưng không làm chết vi khuẩn. Tuy nhiên nhiều vi khuẩn ở đáy biển và các mỏ dầu có thể chịu áp suất thủy tĩnh tới 200 - 300atm. Ta gọi đó là các vi khuẩn *ưa áp* (barophilic).

Về cơ chế tác dụng của áp suất thủy tĩnh cao lên vi khuẩn vẫn chưa có ý kiến dứt khoát. Có lẽ do áp suất cao mà thể tích tế bào bị giảm, độ nhót của nội thất tế bào tăng lên, từ đó dẫn đến làm bất hoạt một số enzym, nhất là các enzym nằm trong quá trình phân chia tế bào và làm giảm tốc độ hoặc làm ngừng các phản ứng sinh hóa. Cũng có thể, do áp lực thủy tĩnh cao mà chức phận của màng tế bào chất bị tổn thương.

Âm thanh. Sóng âm thanh, đặc biệt trong vùng siêu âm (trên 20kHz), có ảnh hưởng lớn đến sinh trưởng của vi khuẩn. Các tế bào sinh dưỡng bị chết nhanh chóng, tế bào non mẫn cảm hơn nhiều so với tế bào già. Mẫn cảm nhất đối với tác dụng của siêu âm là các vi khuẩn hình sợi, ít mẫn cảm hơn là các trực khuẩn và có sức đề kháng cao nhất là các cầu khuẩn. Đặc biệt, siêu âm hầu như không ảnh hưởng gì lên bào tử vi khuẩn và các vi khuẩn kháng axit.

Do tác dụng của siêu âm mà độ nhớt của môi trường tăng lên, xuất hiện các chất nâng cao sức căng bề mặt và trong chất nguyên sinh hình thành các bọt khí nhỏ. Kết quả là tế bào bị hủy hoại.

Hiện nay người ta ứng dụng siêu âm để thu nhận các chế phẩm vỏ bào hoặc để tách các enzym nội bào, phân lập một số thành phần của tế bào như riboxom, thành tế bào và màng tế bào chất.

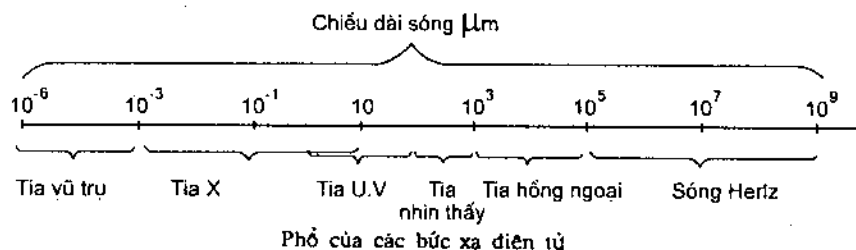
Sức căng bề mặt. Khi sinh trưởng trong môi trường dịch thể vi khuẩn chịu ảnh hưởng của sức căng bề mặt của môi trường. Đa số các môi trường dịch thể dùng trong phòng thí nghiệm có sức căng bề mặt khoảng 0,57 - 0,63 mN/cm. Những thay đổi mạnh mẽ sức căng bề mặt có thể làm ngừng sinh trưởng và làm tế bào chết. Khi sức căng bề mặt thấp, các thành phần của tế bào chất bị tách khỏi tế bào. Điều này chứng tỏ màng tế bào chất bị tổn thương. Các chất nâng cao sức căng bề mặt đa số là các muối vô cơ. Các chất làm giảm sức căng bề mặt chủ yếu là các axit béo, ancol, saponat và các chất khác với chuỗi cacbon dài, thẳng và thơm. Các chất nói trên được gọi là *các chất có hoạt tính bề mặt*. Tác dụng của chúng thể hiện trong việc làm thay đổi các đặc tính bề mặt của vi khuẩn, trước hết là nâng cao tính thấm của tế bào. Trong thực tế người ta sử dụng hiện tượng này trong việc nuôi cấy các vi khuẩn kháng axit. Khác với các vi khuẩn khác, vi khuẩn kháng axit có bề mặt kỵ nước và giảm sức căng bề mặt của môi trường sẽ kích thích sinh trưởng của chúng. Sức căng bề mặt thấp còn ngăn cản vi khuẩn gắn vào bề mặt cứng, tránh cho chúng khỏi cạnh tranh sinh trưởng. Việc thêm một lượng nhỏ chất có hoạt tính bề mặt như Tween 80 vào môi trường nuôi cấy giúp cho vi khuẩn khuếch tán đồng đều trong dung dịch. Các chất có hoạt tính bề mặt cũng được dùng để sát trùng, tẩy uế. Vi khuẩn Gram dương mẫn cảm với các chất này hơn vi khuẩn Gram âm. Điều này có thể là do sự sai khác về loại và về hàm lượng của các photpholipit trong hai nhóm vi khuẩn.

Các tia bức xạ. Ánh sáng có thể gây ra những biến đổi hóa học và do đó những tổn thương sinh học nếu được tế bào hấp thụ. Mức độ gây hại tùy thuộc vào mức năng lượng trong lượng tử ánh sáng được hấp thụ và mức năng lượng trong lượng tử lại phụ thuộc gián tiếp vào chiều dài sóng của tia chiếu. Các lượng tử bức xạ gây nên những biến đổi hóa học của các phân tử và nguyên tử có chiều dài sóng khoảng 10.000 Å. Thuộc vào đây có ánh sáng Mặt Trời, tia tử ngoại, tia X, tia gamma và tia vũ trụ. Các tia vũ trụ, tia gamma và tia X có năng lượng rất lớn. Khi được vật chất hấp thụ chúng có thể làm bắn ra các electron từ các nguyên tử của vật chất đó. Vì vậy các tia nói trên được gọi là *các bức xạ ion hóa*. Những bức xạ với chiều dài sóng lớn hơn có năng lượng quá nhỏ, không đủ gây nên những biến đổi hóa học và tác dụng biểu hiện trước hết ở dạng nhiệt, chẳng hạn tia hồng ngoại.

Ánh sáng Mặt Trời là nguồn tia chiếu tự nhiên nhất có tác dụng phá hủy tế bào vi khuẩn (ngoại lệ: các vi khuẩn quang hợp lại sử dụng ánh sáng Mặt Trời làm nguồn năng lượng). Tác dụng này bị yếu đi nếu tế bào chứa sắc tố hay có các vỏ nhậy.

Ánh sáng Mặt Trời cũng có thể gián tiếp tác động lên tế bào do làm biến đổi môi trường. Chẳng hạn, các tụ cầu khuẩn (*Staphylococcus*) không sinh trưởng được trên môi trường thạch đã bị chiếu tia sáng Mặt Trời vài giờ. Có lẽ trong môi trường bị chiếu đã xuất hiện các chất độc thuộc loại peroxit có tác dụng diệt khuẩn.

Ảnh hưởng của tia sáng Mặt Trời lên vi khuẩn được tăng cường khi xử lí tế bào bằng một số thuốc nhuộm (metilen, eritrozín, xanh toluidin). Người ta gọi hiện tượng này là tác dụng quang động học của ánh sáng.



So với các bức xạ ion hóa thì tia tử ngoại (10 ~ 300nm) có năng lượng nhỏ hơn. Khi bị vật chất hấp phụ, tia tử ngoại không gây nên hiện tượng ion hóa nhưng kích thích các phân tử, nghĩa là chuyển các điện tử đến một mức năng lượng cao hơn. Tác dụng mạnh nhất của tia tử ngoại là ở vùng có chiều dài sóng khoảng 260nm nghĩa là vùng hấp thụ cực đại của các axit nucleic và nucleoprotein. Dưới ảnh hưởng của tia tử ngoại vi khuẩn bị chết hoặc bị đột biến tùy theo loài vi khuẩn và liều lượng chiếu, bào tử của mốc có sức đề kháng cao.

Do tác dụng của tia tử ngoại giữa các nhánh timin trong chuỗi ADN xuất hiện các liên kết cộng hóa trị. Quá trình dime - hóa timin như vậy một phần hoặc hoàn toàn ức chế sự nhân đôi của ADN.

Điều đáng chú ý là những hư hại do tia tử ngoại gây nên trong tế bào phần nào có thể đảo ngược. Nếu sau khi chiếu tia tử ngoại ta lại cho vi khuẩn chịu tác dụng của ánh sáng ban ngày thì nhiều vi khuẩn có khả năng sống sót và tiếp tục sinh trưởng, phân chia. Hiện tượng này được gọi là *quang tái hoạt* (photoreactivation). Trong quá trình quang tái hoạt một số enzym gọi là *enzim sửa chữa* được tổng hợp hoặc được hoạt hóa (chúng 25 phân tử enzym trong một tế bào vi khuẩn *E.coli*). Enzym xúc tác việc phân hủy các liên kết trong các dimetimin xuất hiện trong thời gian chiếu tia tử ngoại. Ánh sáng nhìn thấy có tác dụng hoạt hóa enzym.

Hiện tượng sửa chữa ADN bị tổn hại sau khi chiếu tia tử ngoại cũng xảy ra trong bóng tối. Trước hết các endonucleaza tách rời các dime timin nguyên vẹn ra, sau đó enzym ADN-polimeraza tiến hành sửa chữa bằng cách tổng hợp đoạn ADN bị thiếu; cuối cùng enzym polinucleotidylgaza liên kết các đoạn ADN vừa được tổng hợp lại⁽¹⁾.

Tia tử ngoại cũng ảnh hưởng đến các axit nucleic (đặc biệt là ARN thông tin) trong tế bào vi sinh vật. Xistein và các hợp chất chứa nhóm - SH gắn với nó có khả năng hấp phụ tia tử ngoại, do đó bảo vệ vi sinh vật khỏi tác hại của các tia này.

Tia sáng Mặt Trời tuy có chứa một phần tia tử ngoại nhưng phần lớn những tia này bị khí quyển (ozon, mây...) giữ lại. Vì vậy ánh nắng có tác dụng diệt khuẩn nhỏ hơn so với tia tử ngoại dùng trong phòng thí nghiệm. Tia Ronghen, tia gamma và tia vũ trụ (chiều dài sóng nhỏ hơn 10nm) là những bức xạ ion hóa có thể gây chết hoặc gây đột biến ở vi sinh vật. Những hư hại gây nên là do tác động trong tế bào hoặc do ảnh hưởng gián tiếp của các phản ứng hóa học diễn ra với sự tham gia của các gốc tự do tạo thành khi chiếu. Những hư hại nói trên chịu ảnh hưởng của một số yếu tố môi trường. Chẳng hạn khi có oxi vi sinh vật sẽ nhạy cảm đặc biệt với tác dụng

(1) Hệ thống enzym sửa chữa trong tối sửa chữa cả những đoạn ADN bị hư hại do các tác nhân hóa học.

của các tia chiếu, các hợp chất chứa nhóm - SH lại bảo vệ tế bào. ADN là đối tượng tác động của các bức xạ ion hóa. Cũng như trong trường hợp với tia tử ngoại, sau khi bị chiếu, tế bào có khả năng phục hồi lại ADN nhờ hệ thống enzym sửa chữa (endonucleaza, ADN-polimeraza).

Hiện nay các bức xạ ion hóa được ứng dụng trong việc khử trùng thực phẩm, dược phẩm... và để gây đột biến ở vi sinh vật, (các vi khuẩn sinh bào tử có sức đề kháng rất cao với bức xạ ion hóa).

6.3. Các yếu tố hóa học

Trong số các yếu tố hóa học ảnh hưởng đến chức phận sống của tế bào trước hết phải kể nồng độ ion hidro (pH), thế oxi hóa khử (Eh) của môi trường, các chất sát trùng và các chất hóa trị liệu.

Ảnh hưởng của pH môi trường :

pH của môi trường có ý nghĩa quyết định đối với sinh trưởng của nhiều vi sinh vật. Các ion H^+ và OH^- là hai ion hoạt động lớn nhất trong tất cả các ion, những biến đổi dù nhỏ trong nồng độ của chúng cũng có ảnh hưởng mạnh mẽ. Cho nên việc xác định thích hợp ban đầu và việc duy trì pH cần thiết trong thời gian sinh trưởng của tế bào là rất quan trọng.

Các giá trị pH (cực tiểu, tối thích, cực đại) cần cho sinh trưởng và sinh sản của vi khuẩn tương ứng với các giá trị pH cần cho hoạt động của nhiều enzym. Giới hạn pH hoạt động đối với vi sinh vật ở trong khoảng 4 - 10. Đa số vi khuẩn sinh trưởng tốt nhất ở pH trung bình (7,0) như nhiều vi khuẩn gây bệnh (môi trường tự nhiên là máu và bạch huyết của cơ thể động vật có pH khoảng 7,4). Các vi khuẩn nitrat hóa, vi khuẩn nốt sần, xạ khuẩn, vi khuẩn phân giải ure lại ưa môi trường hơi kiềm. Một số vi khuẩn chịu axit (vi khuẩn lactic, *Acetobacter*, *Sarcina ventriculi*), một số khác ưa axit như *Acetobacter acidophilus*, *Thiobacillus thiooxydans* (oxi hóa lưu huỳnh thành H_2SO_4) có thể sinh trưởng ở pH < 1. Nấm sợi và nấm men ưa pH axit (pH : 4 - 6).

Phạm vi pH ở một số loài vi sinh vật

Vi sinh vật	Phạm vi pH		
	Thấp nhất (cực tiểu)	Tốt nhất (tối thích)	Cao nhất (cực đại)
<i>Thiobacillus thiooxydans</i>	0,5	2,0 - 3,5	6,0
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	4,0 - 4,6	5,8 - 6,6	6,8
<i>Rhizobium japonicum</i>	4,2	6,8 - 7,0	11,0
<i>Azotobacter chroococcum</i>	4,5	7,4 - 7,6	9,0
<i>Nitrosomonas</i> sp.	7,0	7,8 - 7,6	9,4
<i>Acetobacter aceti</i>	4,0 - 4,5	5,4 - 6,3	7,0 - 8,0
<i>Staphylococcus aureus</i>	4,2	7,0 - 7,5	9,3
<i>Chlorobium limicola</i>	6,0	6,8	7,0
<i>Thermus aquaticus</i>	6,0	7,5 - 7,8	9,5
<i>Aspergillus niger</i>	1,5	7,0 - 8,0	0
Phần lớn xạ khuẩn	5,0	7,0 - 8,0	10,0
Phần lớn nấm men	3,0	5,0 - 6,0	8,0

**Phạm vi pH tốt nhất để sinh trưởng và lên men ở một số loài
vi sinh vật sinh chất kháng sinh**

Vi sinh vật	pH tối thích	
	dễ sinh trưởng	dễ sinh chất kháng sinh
<i>Sireptomycetes griseus</i>	6,3 - 6,9	6,7 - 7,3
<i>S. erythreus</i>	6,6 - 7,0	6,8 - 7,3
<i>Penicillium chrysogenum</i>	6,5 - 7,2	6,2 - 6,8
<i>Streptomycetes aureofaciens</i>	6,1 - 6,6	5,9 - 6,3
<i>S. rimosus</i>	6,0 - 6,6	5,8 - 6,1
<i>P. griseofulvum</i>	6,4 - 7,0	6,2 - 6,5

pH của môi trường không những ảnh hưởng mạnh mẽ đến sinh trưởng, mà còn tác động sâu sắc đến các quá trình trao đổi chất.

Màng tế bào chất của vi sinh vật tương đối ít thấm đối với các ion H^+ và OH^- . Vì vậy, mặc dù pH của môi trường bên ngoài dao động trong giới hạn rộng, nồng độ của hai ion nói trên trong tế bào chất nói chung vẫn ổn định. Ảnh hưởng của pH môi trường lên hoạt động của vi sinh vật có thể là do kết quả tác động qua lại giữa ion H^+ và enzym (kể cả các permeaza) chứa trong màng tế bào chất và thành tế bào.

Để duy trì pH thích hợp đối với vi sinh vật trong thời gian nuôi cấy, nhất là đối với các vi khuẩn sinh axit nhưng lại không chịu được axit (*Lactobacillus*, *Enterobacteriaceae*, nhiều *Pseudomonas*), người ta thường thêm vào môi trường chất đệm hoặc dùng các cơ chất oxi hóa hoàn toàn. Dung dịch đệm thường dùng là muối của các axit yếu (photphat, axetat, cacbonat).

Thế oxi hóa khử (Eh) :

Để biểu thị mức độ thoát khí của môi trường người ta dùng đại lượng rH. Theo định nghĩa : $rH = -\log (H_2)$, ở đây (H_2) là áp lực của hidro trong khí quyển (dùng nhầm với $pH = -\log (H^+)$).

Dung dịch nước bão hòa hidro có $rH = 0$, bão hòa oxi có $rH = 41$. Thang từ 0 đến 41 xác định mức độ thoát khí của môi trường. pH có ảnh hưởng đến giá trị rH của môi trường, sự phụ thuộc này được biểu thị bởi phương trình :

$$rH = \frac{Eh}{0,03} + 2pH \quad (Eh = \text{thế oxi hóa khử tính ra volt}).$$

Các vi sinh vật kỵ khí bắt buộc có thể sinh sản ở những giá trị rH rất thấp (không quá 8 - 10), các vi sinh vật hiếu khí hoặc kỵ khí tùy tiện ở giới hạn khá rộng rH từ 0 đến 30 còn các vi sinh vật hiếu khí bắt buộc rH từ 10 đến 30. Các giá trị rH > 30 không có lợi cho sự sinh sản của ngay các vi sinh vật hiếu khí bắt buộc.

Các vi khuẩn kỵ khí có thể sinh trưởng nuôi cấy có giá trị Eh khá thấp. Bằng cách thêm một số chất nhất định (như axit tioglicolic, xixtein, axit ascorbic...) vào môi trường có thể giảm giá trị Eh. Trong môi trường đã được điều chỉnh như vậy, dù có mặt oxi, những vi khuẩn kỵ khí bắt buộc như *C. tetani* và *C. perfringens* cũng sinh trưởng được. Có lẽ, hệ men của các vi khuẩn kỵ khí chứa các nhóm chỉ hoạt động được ở trạng thái khử.

Oxi có vai trò hết sức quan trọng trong hoạt động sống của vi sinh vật. Trong không khí O_2 chiếm 20,95% thể tích và 23,14% khối lượng.

Tùy thuộc vào nhu cầu đối với oxi mà người ta chia vi sinh vật thành các nhóm sau đây :

- *Hiếu khí bắt buộc* :

Thuộc nhóm này là các vi sinh vật chỉ có thể sinh trưởng được khi có mặt oxi phân tử (O_2). Chúng có chuỗi hô hấp hoàn chỉnh, dùng O_2 làm thể nhận hidro cuối cùng. Trong tế bào có chứa enzym SOD (superoxid dismutaza) và peroxidaza. Tuyệt đại đa số vi nấm và số đông vi khuẩn thuộc nhóm này.

- *Hiếu khí không bắt buộc* : Thuộc nhóm này là các vi sinh vật có thể sinh trưởng được cả trong điều kiện có oxi lẫn trong điều kiện không có oxi. Trong tế bào có chứa SOD và peroxidaza. Có oxi chúng sinh trưởng tốt hơn. Phần lớn nấm men và nhiều vi khuẩn thuộc nhóm này. Có thể kể đến các loài như *Saccharomyces cerevisiae*, *E.coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Proteus vulgaris*.

- *Vi hiếu khí* :

Thuộc nhóm này là các vi sinh vật chỉ có thể sinh trưởng được ở điều kiện áp lực oxi rất thấp (khoảng 0,01 - 0,03 Ba). Chúng cũng thông qua chuỗi hô hấp và dùng làm oxi làm thể nhận hidro cuối cùng. Có thể kể đến các loài như *Vibrio cholerae*, *Hydrogenomonas* spp. *Zymomonas* spp. *Bacteroides* spp. ...

- *Kị khí chịu đựng* : Đó là những vi khuẩn kị khí nhưng lại tồn tại được khi có mặt oxi. Chúng không sử dụng oxi, không có chuỗi hô hấp nhưng sự có mặt của oxi không có hại đối với chúng. Trong tế bào có SOD, có peroxidaza nhưng thiếu hydrogenperoxidaza. Thuộc về nhóm này có thể kể đến *Streptococcus lactis*, *S.faecalis*, *Lactobacillus lactis*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Butyribacterium rettgeri*...

- *Kị khí* : Với các vi sinh vật thuộc nhóm này sự có mặt của oxi phân tử là có hại. Chúng không sinh trưởng được trên môi trường đặc hoặc bán đặc khi để trong không khí hay trong không khí có chứa 10% CO_2 . Chúng chỉ sinh trưởng được ở lớp dịch thể sâu, ở nơi không có oxi, quá trình lên men, quá trình photphoryl hóa quang hợp quá trình metan. Trong tế bào của các vi sinh vật này không có SOD, xitocromoxidaza, phần lớn không có hydrogen peroxidaza. Có thể kể đến rất nhiều loài trong các chi *Clostridium*, *Fusobacterium*, *Bifidobacterium*, *Eubacterium*, *Peptococcus*, *Butyriovibrio*, *Desulfovibrio*, *Veillonella*...

Các chất diệt khuẩn (sát trùng) : Các chất diệt khuẩn thường dùng nhất là phenol và các hợp chất của phenol, các ancolol, halogen, kim loại nặng, H_2O_2 các thuốc nhuộm, xà phòng và các chất rửa tổng hợp của các muối amon bạc bốn.

Phenol được dùng ở dạng dung dịch nước để sát trùng các dụng cụ bị nhiễm bẩn. Tùy theo nồng độ mà phenol có tác dụng diệt khuẩn hay ức khuẩn. Hoạt tính của phenol bị giảm trong môi trường kiềm và có mặt chất hữu cơ, trái lại tăng lên khi có mặt muối. Bào tử của vi sinh vật kháng với tác dụng của phenol.

Một số dẫn xuất của phenol như crezol và các hợp chất của nó và exaclorofen có hoạt tính mạnh hơn phenol. Hexaclorofen dùng phối hợp với xà phòng để sát trùng da.

Phenol và crezol tác dụng chủ yếu lên các lớp màng tế bào, phá hoại tính bán thấm của màng tế bào chất và làm biến tính protein...

Etanol thường dùng để sát trùng da. Nhưng cũng như phenol, etanol không có tác dụng với bào tử. Chẳng hạn, bào tử của *B.subtilis* có thể sống trong etanol 9 năm, bào tử của *B.anthraxis* - 20 năm. *Metanol* có tác dụng diệt khuẩn kém hơn etanol. Các ancolol cao hơn (propylancolol butyl ancolol) lại tác dụng mạnh hơn. Nói chung,

tác dụng diệt khuẩn của ancolol tăng theo sự tăng khối lượng phân tử. Các ancolol có khối lượng phân tử cao hơn nửa thường khó hòa tan với nước, do đó không dùng để sát trùng. Propylancolol và izopanolol ở nồng độ 40 - 80% được dùng để sát trùng da.

Ancolol tác dụng bằng cách gây đông tụ protein. Nhưng ancolol với nồng độ cao khử nước mạnh, do đó rút nước khỏi tế bào, cản trở sự xâm nhập của ancolol vào tế bào vì vậy chỉ có tác dụng ức khuẩn (etanol 70% có tác dụng sát trùng mạnh hơn etanol 90%).

Các *halogen* tác dụng độc đối với vi khuẩn. Khí clo được dùng để sát trùng nước. Các hợp chất của clo như clorin và cloramin cũng đều có tác dụng diệt khuẩn.

Tác dụng diệt khuẩn của clo và các hợp chất của clo là do việc hình thành axit clohidric và oxi. Oxi ở trạng thái vừa sinh ra là một chất oxi hóa mạnh, do tác dụng của oxi các thành phần tế bào bị phá hủy. Cấu trúc tế bào cũng có thể bị ảnh hưởng do tác dụng trực tiếp của clo với một số thành phần tế bào.

Một chất diệt khuẩn quan trọng khác thuộc nhóm halogen là iot. Iot dễ hòa tan trong ancolol và trong các dung dịch nước của iotua kali hoặc natri (teinture d'iodo). Iot ở dạng liên kết với các hợp chất hữu cơ cũng có tác dụng diệt khuẩn. Những hợp chất này không nhuộm màu vật thể, không kích thích da và không có mùi.

Iot có tác dụng sát trùng lên tất cả các loài vi khuẩn và bào tử, thường được dùng để sát trùng da, tẩy uế nước và không khí.

Đa số các kim loại nặng, dù ở dạng nguyên chất hay hợp chất, đều độc đối với vi khuẩn. Đáng kể nhất trong số này là bạc, thủy ngân, đồng và arsen.

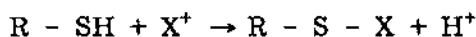
Bạc có tác dụng diệt khuẩn mạnh do giải phóng ion vào môi trường (tác dụng oligodynamic) do đó được dùng để làm sạch nước uống và để điều chế các chế phẩm kháng khuẩn. Người ta cũng dùng $AgNO_3$ làm chất sát trùng.

**Tác dụng của các chất khử trùng lên vi sinh vật (+ : hoạt động ;
- : không hoạt động)**

Loại	Ví dụ	Nồng độ %	Vi khuẩn	Bào tử vi khuẩn	Nấm bậc cao	Virút
Rượu	Etilic	70	+	-	+	+
	Izopropilic	70 - 90	+	-	+	-
Aldehyt	Fomaldehyt	1 - 8	+	+	+	+
	Glutaraldehyt	2	+	+	+	+
Bisguanidin	Clorhexidin	0,1 - 1,0	+	-	+	-
β - Propiolacton	β - Propiolacton	1	+	+	+	+
Crezol		1 - 5	+	-	+	+
Epoxit	Oxit etilen	1	+	+	+	+
	Oxit propilen	1	+	+	+	+
Halogen	Hợp chất hữu cơ và vô cơ halogen	0,005 - 0,02	+		+	
Peraxit	Axit peraxetic	1	+	+	+	+
Phenol	Phenol và dẫn xuất	0,5 - 5,0		-	-	
Chất hoạt động bề mặt					+	+
- anion	Sunphonat alkyl aryl (2)	0,1 - 0,25	+	-	-	-
- cation	Muối amon bậc 4 (3)	0,02	+	-	+	-
lượng phân	Glixin alkyl diaminoetyl	1 - 5	+	-	+	-

(1) Chỉ phenol ; (2) pH, axit (<3) ; (3) pH kiềm

Tác dụng của bạc (cũng như của nhiều ion kim loại nặng khác Cu^{2+} , Pb^{2+} , Hg^{2+}) là do khả năng làm bất hoạt các nhóm -SH trong phân tử enzym và permeaza tạo thành mercaptit :

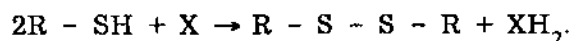


Thủy ngân là chất có tác dụng mạnh nhất trong số các kim loại nặng. Để sát trùng người ta thường dùng sublimat (HgCl_2) có thể giết chết các tế bào sinh dưỡng ở nồng độ 1 : 1000. Đối với bào tử cần xử lý thời gian lâu hơn. Điều đáng chú ý là các hợp chất hữu cơ của thủy ngân tương đối với các cơ thể bậc cao, nhưng lại có tác dụng diệt khuẩn mạnh do đó được dùng làm chất sát trùng (các chế phẩm quan trọng : mectiolat, mercurocrom, famosept...). Tác dụng chủ yếu của thủy ngân là kìm hãm các enzym chứa nhóm - SH và kết tủa protein tế bào.

Đồng và các muối đồng cũng có tác dụng diệt khuẩn mạnh. Các muối CuSO_4 và CuCl_2 gây đông tụ protein. Đồng kim loại có tác dụng oligodinamic tương tự như bạc.

Arsen được dùng làm chất diệt khuẩn chủ yếu ở dạng các chất hữu cơ, các hợp chất này ít độc đối với sinh vật bậc cao. Các chế phẩm quan trọng nhất của arsen hóa trị ba là saliaccsan và neosalvaccsan. Các chế phẩm này dùng điều trị bệnh giang mai (tác dụng lên xoắn thể *Treponema pallidum*). Các arsenat làm bất hoạt nhóm - SH trong protein bằng cách tạo thành mercaptit.

Peroxit hidro (H_2O_2) và permanganat kali (KMnO_4) là những chất oxi hóa mạnh, có tác dụng kìm hãm các nhóm - SH trong phân tử enzym (Iot sunphit cũng có tác dụng này) :



Hiện nay ngoài việc dùng một số hóa chất để sát trùng da, các dụng cụ được phẩm, thực phẩm, nước uống... người ta còn dùng các dung dịch như nước brom 1%, HgCl_2 0,1%, cồn, AgNO_3 0,05%, hipoclorit canxi (1% Cl_2) để sát trùng bề mặt hạt. Hạt được ngâm trong các dung dịch tương ứng khoảng 5 - 30 phút, trước đó cần xử lý hạt bằng xà phòng và các chất có hoạt tính bề mặt khác để đảm bảo cho bề mặt hạt thấm hoàn toàn, xử lý xong phải rửa hạt nhiều lần bằng nước vô trùng. Đa số các chất dùng làm thuốc nhuộm vi khuẩn đều là chất kìm hãm chúng. Các thuốc nhuộm bazơ tác dụng mạnh nhất ở pH thích hợp, chúng có ái lực với các nhóm photphat của nucleoprotein lớn hơn là đối với các nhóm cacboxyl của protein. Một số thuốc nhuộm, chủ yếu là acridin bị ion hóa mạnh, do đó dễ dàng tạo thành phức hợp với các kim loại quan trọng trong tế bào. Hàng loạt chất khác thể hiện tác dụng chọn lọc đối với vi khuẩn. Chẳng hạn cristal violet kìm hãm đa số vi khuẩn G^+ nhưng không ảnh hưởng đến vi khuẩn G^- , vert malachite và vert brillant cũng có tác dụng chọn lọc nên các vi khuẩn G^- , acriflavin trái lại, tác dụng chủ yếu lên các vi khuẩn G^+ .

Cơ chế kìm hãm vi khuẩn của các thuốc nhuộm còn chưa rõ ràng. Có lẽ, ngoài tác dụng chelat hóa, các thuốc nhuộm đã gây nên những chelat hóa, các thuốc nhuộm đã gây nên những biến đổi có hại cho tế bào qua việc liên kết với các protein.

Xà phòng (muối kali hoặc natri của các axit béo bậc cao) có tác dụng diệt khuẩn yếu. Các *Pneumococcus* và một số *Streptococcus* tương đối mẫn cảm với xà phòng ; trái lại các trực khuẩn Gram âm, vi khuẩn axit, tụ cầu khuẩn, có khả năng kháng với xà phòng.

Ý nghĩa chủ yếu của xà phòng là dùng để loại bỏ một cách cơ học các vi sinh vật khỏi bề mặt của da. Xà phòng làm giảm sức căng bề mặt, hòa tan và tẩy trừ các vết bẩn, dầu mỡ, do đó cũng loại đi các vi sinh vật.

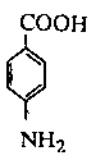
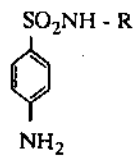
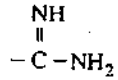
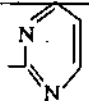
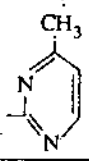
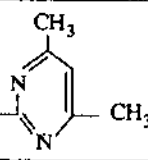
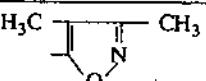
Với mục đích trên, ngày nay người ta còn dùng các chất *tẩy rửa tổng hợp*. Ưu điểm của các chất này so với xà phòng là chúng không kết tủa và không tạo thành cặn trong nước cứng. Một số có tác dụng diệt khuẩn cao.

Trong số các chất sát trùng cũng cần kể đến một số *muối amon bậc bốn*. Tương tự như xà phòng, những muối này cũng làm giảm sức căng bề mặt và tăng tính thấm của tế bào vi khuẩn. Chúng tác dụng chủ yếu lên các vi khuẩn G^+ , nhưng ảnh hưởng lên cả vi khuẩn G^- . Ở nồng độ thấp chúng tác dụng ức khuẩn. Do tác dụng kháng khuẩn và độ độc tương đối thấp đồng thời cũng do độ hòa tan và tính bền mà các muối amon nói trên được sử dụng rộng rãi trong việc tẩy uế, sát trùng. Các chế phẩm thường gặp là Azalin, Zephirol, Phanerol...

Các muối amon bậc bốn có lẽ tác dụng bằng cách phá hủy thành tế bào và màng tế bào chất, từ đó dẫn đến làm vỡ tế bào. Mặt khác do ảnh hưởng của các muối này protein trong sinh chất bị biến tính, hàm lượng các chất chứa nitơ và photpho bị giảm.

Các chất hóa trị liệu. Đó là các chất hóa học có tác dụng độc lên vi khuẩn nhưng không gây hại cho cơ thể bậc cao (khác với các chất sát trùng). Nói chung thành phần hóa học của các chất này đã được biết, do đó ta có thể điều chế bằng con đường nhân tạo.

Cơ chế tác dụng của các chất hóa trị liệu rõ ràng dựa vào sự tương tự về cấu trúc của các chất này với các hợp chất mà vi khuẩn cần để tạo thành các coenzim, protein và các axit nucleic. Các chất hóa trị liệu cạnh tranh vị trí gắn với các hợp

Kết cấu gốc tương tự APAB	Nhóm R	Tên thuốc
 APAB  Sunfonamit	-H	Sunphanilamic
		Sunphaguanidin
		Sunphadiazin
		Sunphamerazin
		Sunphamctazin
		Sunphisoxazol

Cấu tạo phân tử của một số thuốc sunphonamit.

chất đó trên phân tử enzym và kìm hãm nhiều phản ứng sinh hóa quan trọng. Đa số các chất hóa trị liệu được sử dụng để điều trị các bệnh khác nhau.

Các chất hóa trị liệu quan trọng nhất là các sunphonamid dẫn xuất từ axit p-aminosunphonic. Đó là những chất đối kháng của axit p-aminobenzoic (APAB). Do cạnh tranh vị trí gắn trên phân tử enzym với PAB các sunphonamid kìm hãm việc tạo thành axit folic là tiền chất của coenzim tham gia vào quá trình tổng hợp một số axit amin và purin.

Đặc tính chữa bệnh của các chế phẩm khác nhau tùy theo tính chất gốc R gắn vào nguyên tử N của nhóm sunphohidryl :

Sunphadiazin và sunphamerazin có phổ kháng khuẩn rộng mà không gây phản ứng độc ở người bệnh do đó được sử dụng phổ biến nhất. Các sunphonamid đặc biệt thích hợp khi dùng chữa các bệnh do cấu khuẩn viêm não và *Shigella* gây nên, các bệnh ở đường hô hấp (do *Staphylococcus* và *Streptococcus*) và các bệnh ở cơ quan niệu (do các vi khuẩn Gram âm). Sunphonamid cũng được dùng để ngăn ngừa sự nhiễm trùng sau khi mổ.

Tác dụng của sunphonamid là ức khuẩn và có thể bị loại trừ khi nồng độ APAB dư thừa.

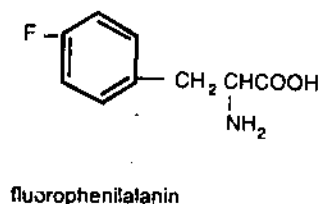
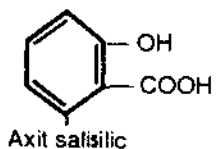
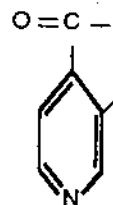
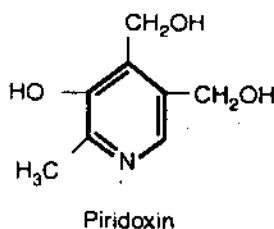
Ngoài sunphonamid, hidrazit của axit izonicotinic cũng có tác dụng kìm hãm cạnh tranh. Đây là chất có cấu trúc tương tự với vitamin B₆ (piridoxin) xúc tác phản ứng khử cacboxyl và chuyển amin của một số axit amin. Trong y học hidrazit của axit izonicotinic được dùng để chữa bệnh lao (*M. tuberculosis*). Để điều trị bệnh này người ta còn dùng axit p-aminosalixilic (PAS). PAS chính là chất đối kháng của axit salixilic - yếu tố sinh trưởng của trực khuẩn lao.

Các chất tương tự về cấu trúc không những ảnh hưởng đến việc tổng hợp các coenzim mà còn kìm hãm tổng hợp protein và axit nucleic.

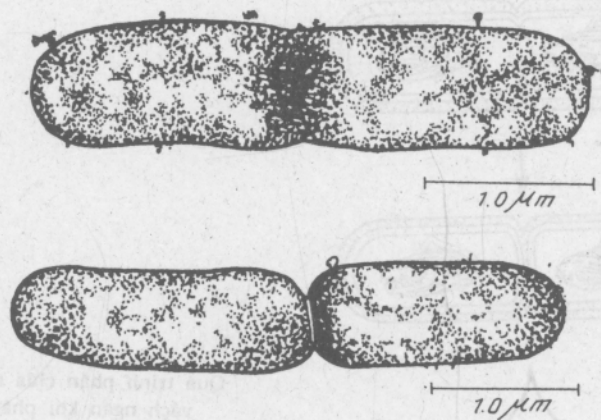
Chẳng hạn, 7-azatriptophan và p-fluoropheninalanin và p-fluorophenylalanin có thể lắp vào phân tử protein và làm mất chức năng của chất này (7 - azatriptophan có thể chiếm tới nửa hàm lượng axit amin tương ứng trong protein của vi khuẩn). Một số chất khác, như 5-metyltryptophan, ức chế sinh trưởng của tế bào nhưng không tham gia vào thành phần của protein⁽¹⁾. Các chất như 5-bromuraxin và 2-aminopurin có thể lắp vào ADN của vi khuẩn. ADN chứa 5 - bromuraxin sẽ mất cảm hơn với tác dụng của các chất gây đột biến.

6.4. Các yếu tố sinh học

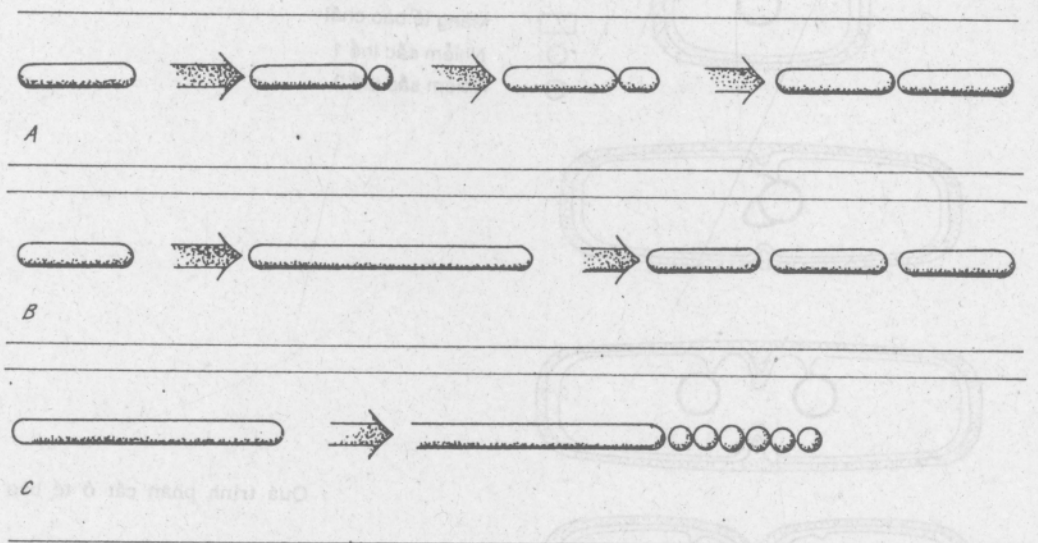
Trong số các yếu tố sinh học có ảnh hưởng có hại lên các quá trình sống của vi khuẩn cần kể đến *kháng thể và chất kháng sinh*. Các đặc tính tác dụng của kháng thể được trình bày trong chương 10.



(1) L-5-metintriptophan ngăn cản phản ứng liên kết của L-triptophan vào Tri-ARNv ở *E.coli*.



Sự phân cắt ở vi khuẩn *E.coli*

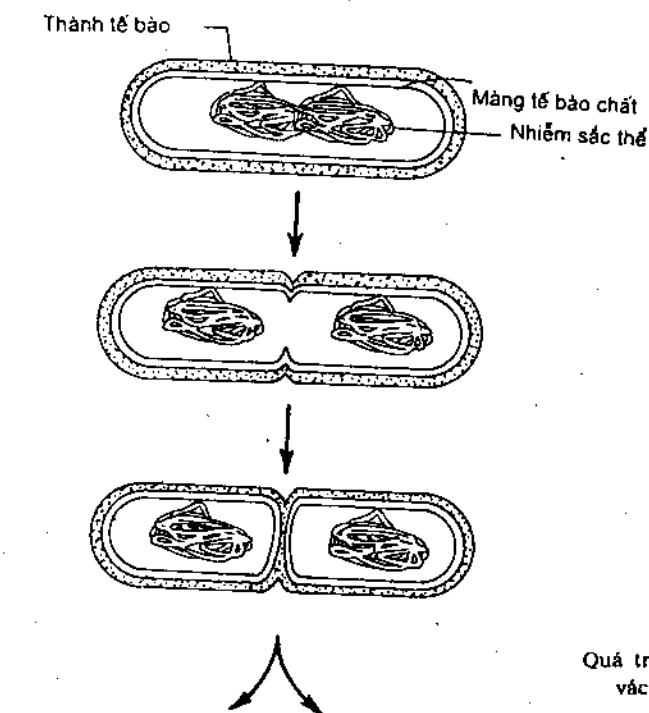


Ba hình thức sinh sản khác ở vi khuẩn và xạ khuẩn

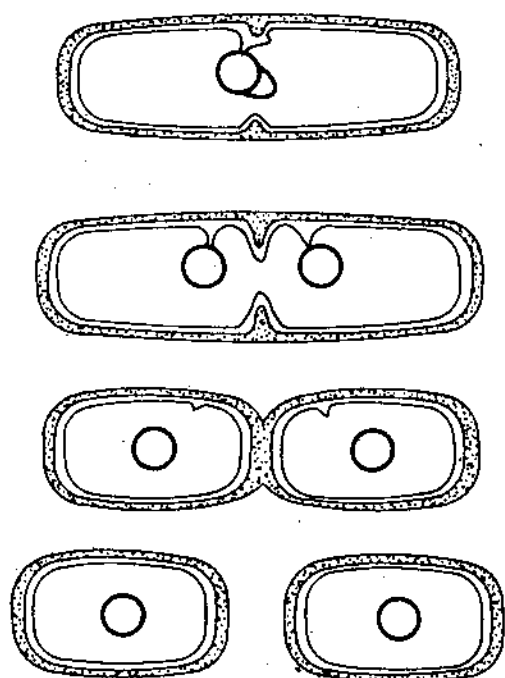
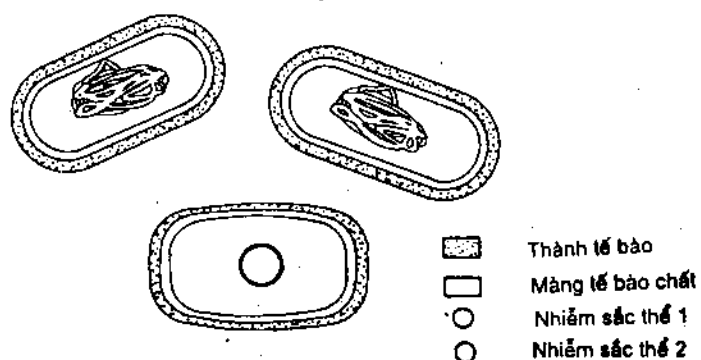
A : Nảy chồi

B : Cắt đoạn

C : Hình thành ngoại bào tử

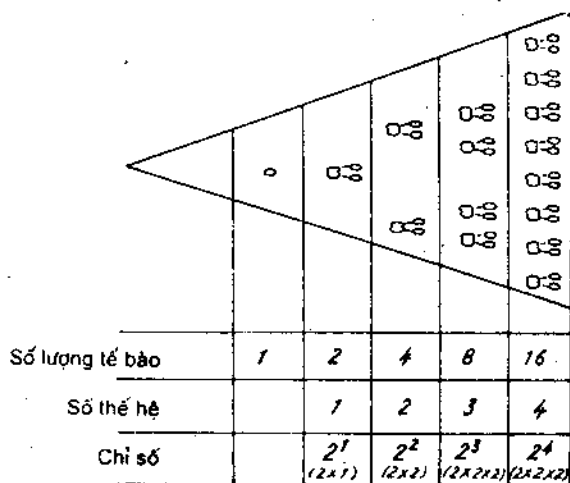


Quá trình phân chia nhiễm sắc thể và hình thành vách ngăn khi phân cắt tế bào ở vi khuẩn

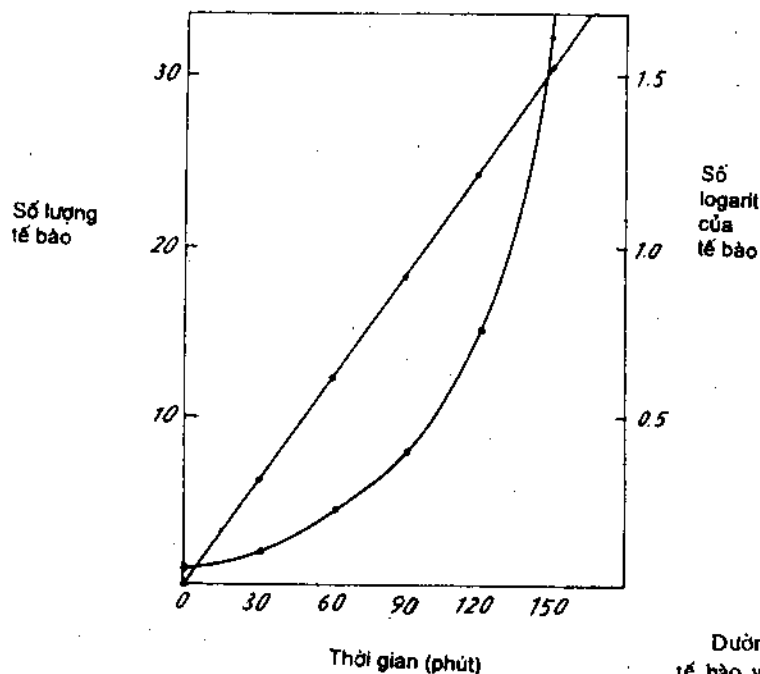
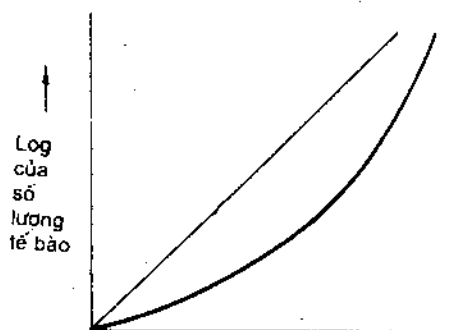


Quá trình phân cắt ở tế bào vi khuẩn

841.041.
1200
1980.12

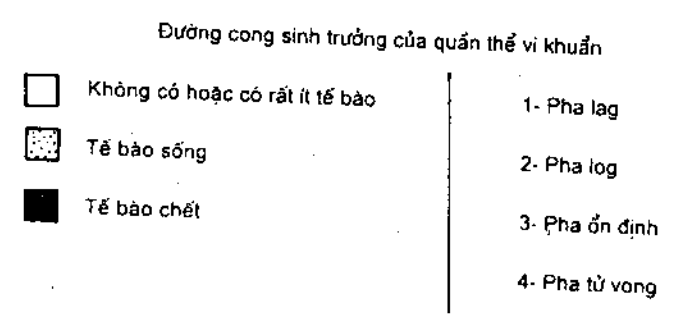
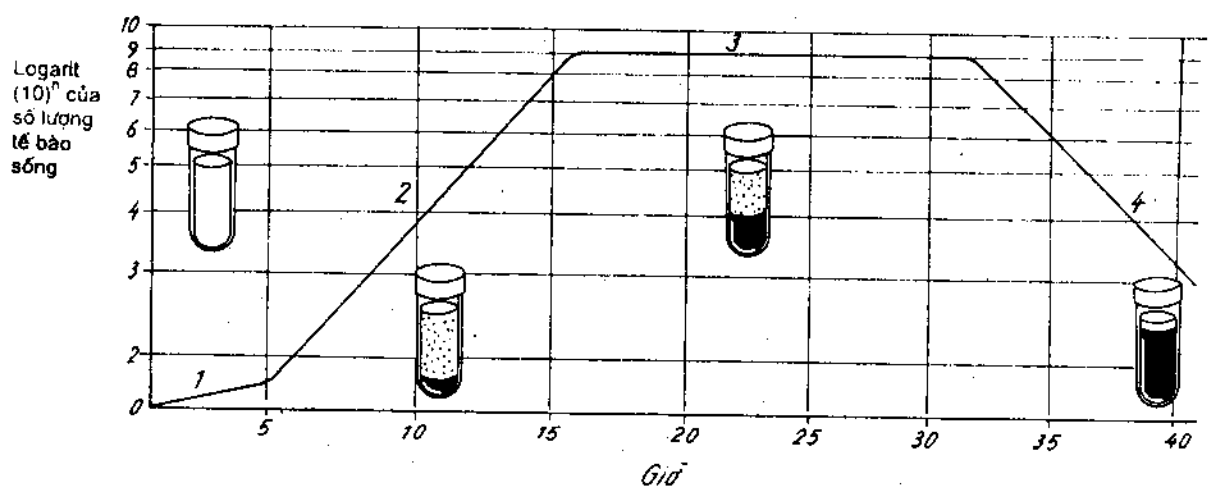


Cách biểu thị sự tăng trưởng số lượng của vi khuẩn trong quần thể

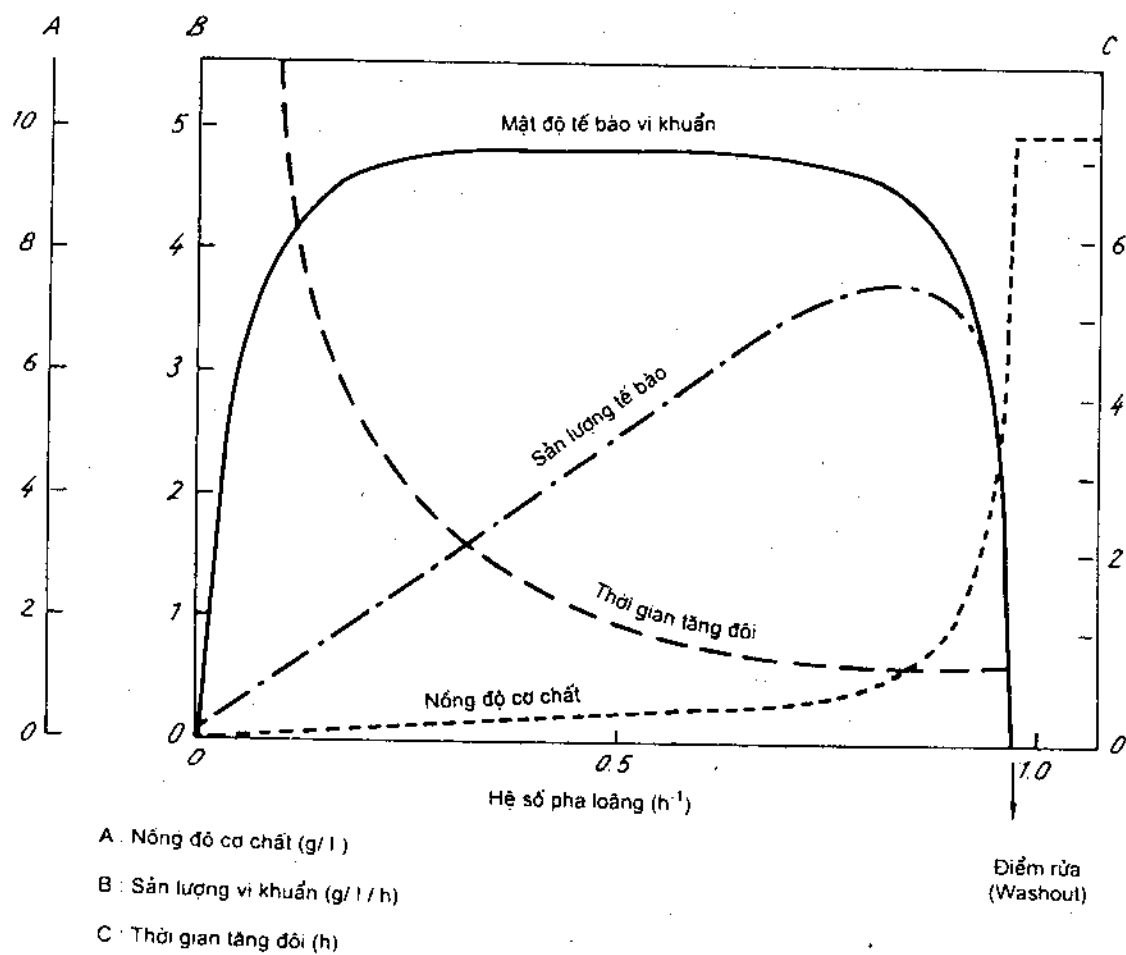


Đường cong sinh trưởng giả thiết từ một tế bào vi khuẩn có thời gian thế hệ là 30 phút

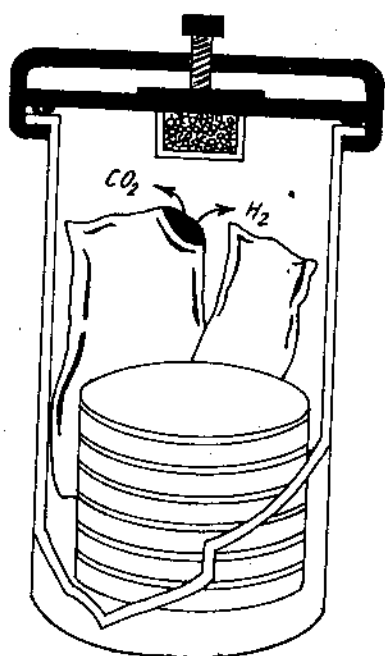
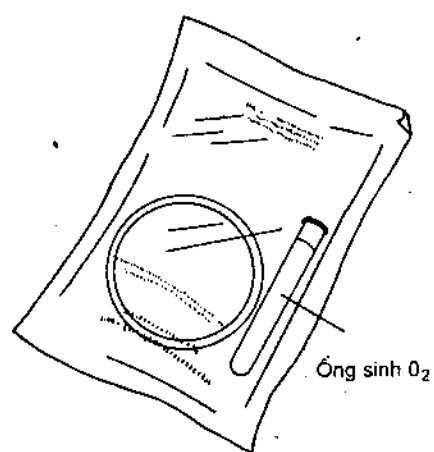
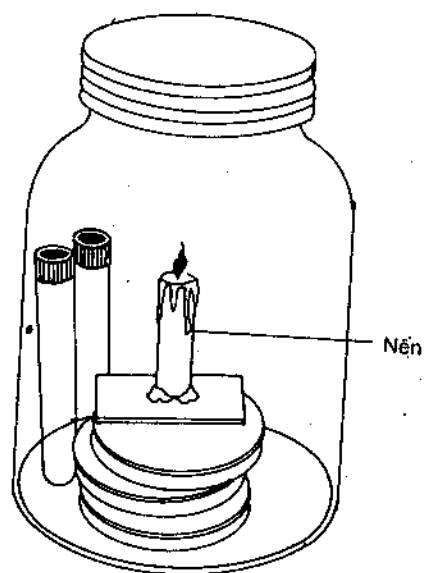
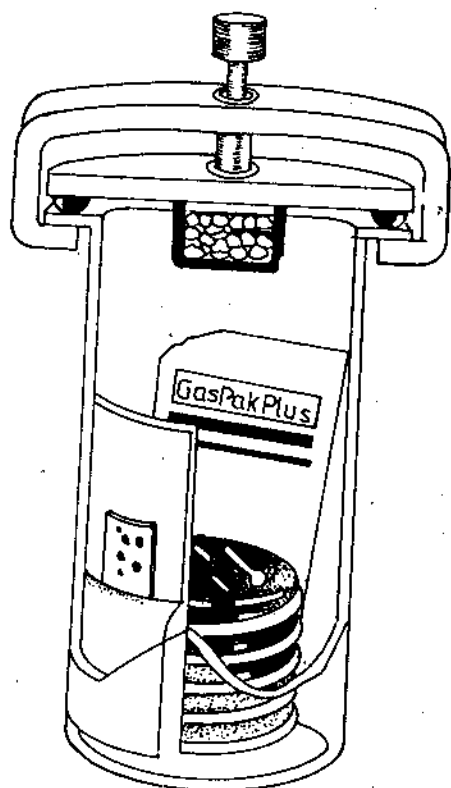
110.136



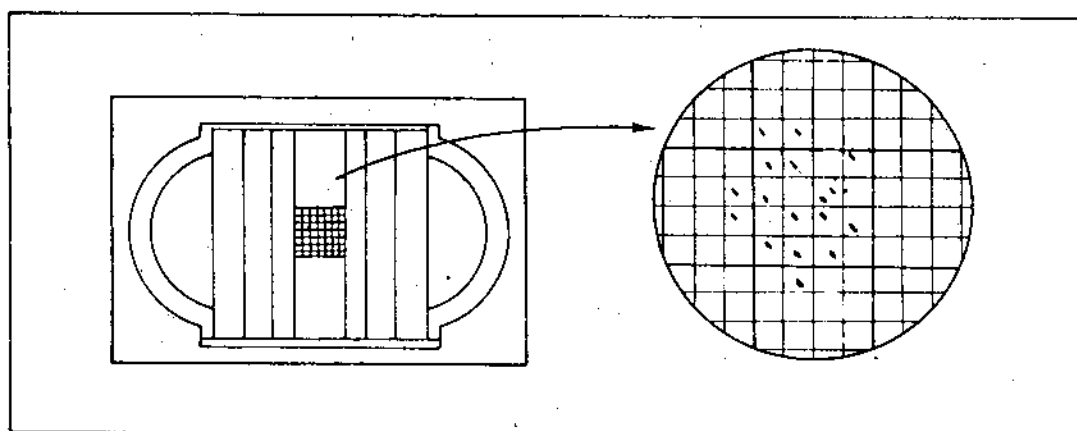
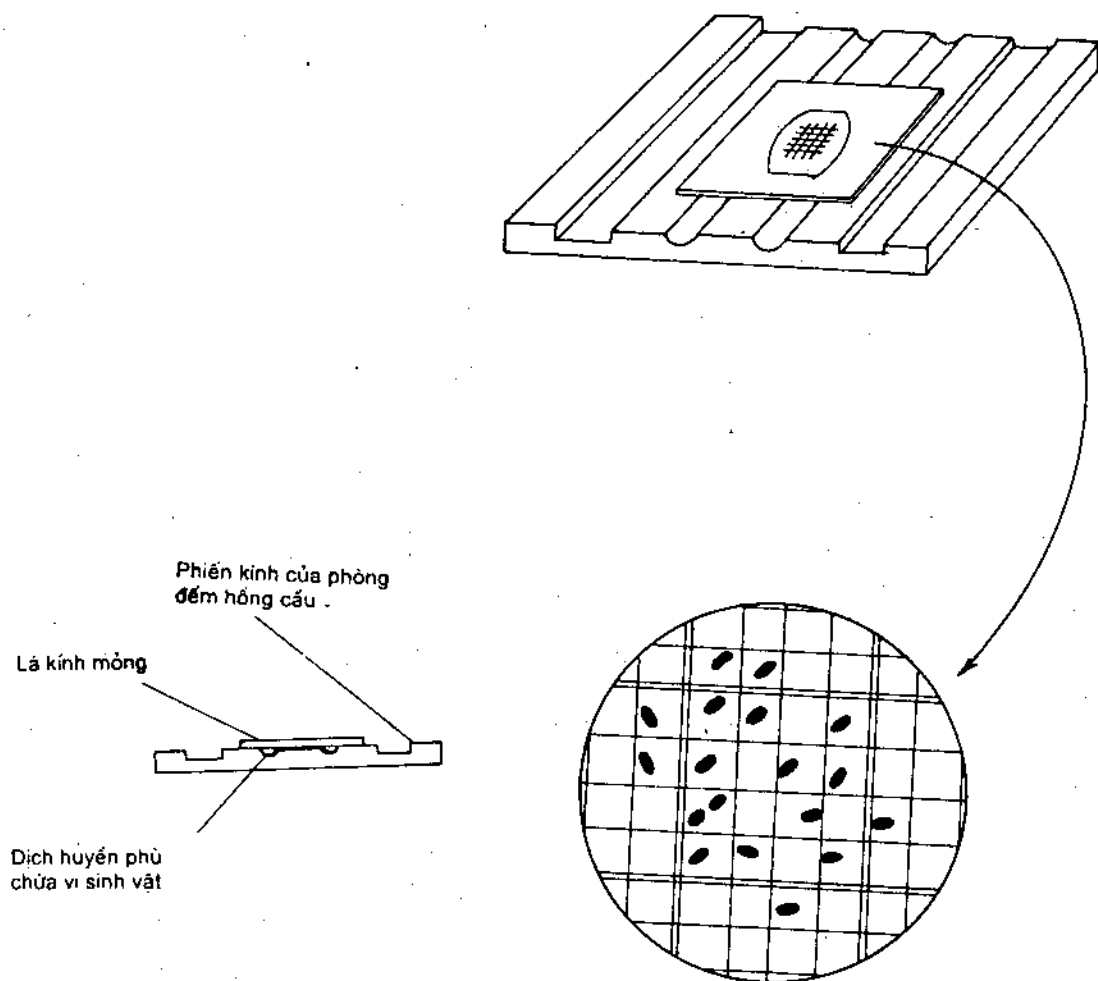
Mối quan hệ giữa số lượng tế bào và số log của chúng



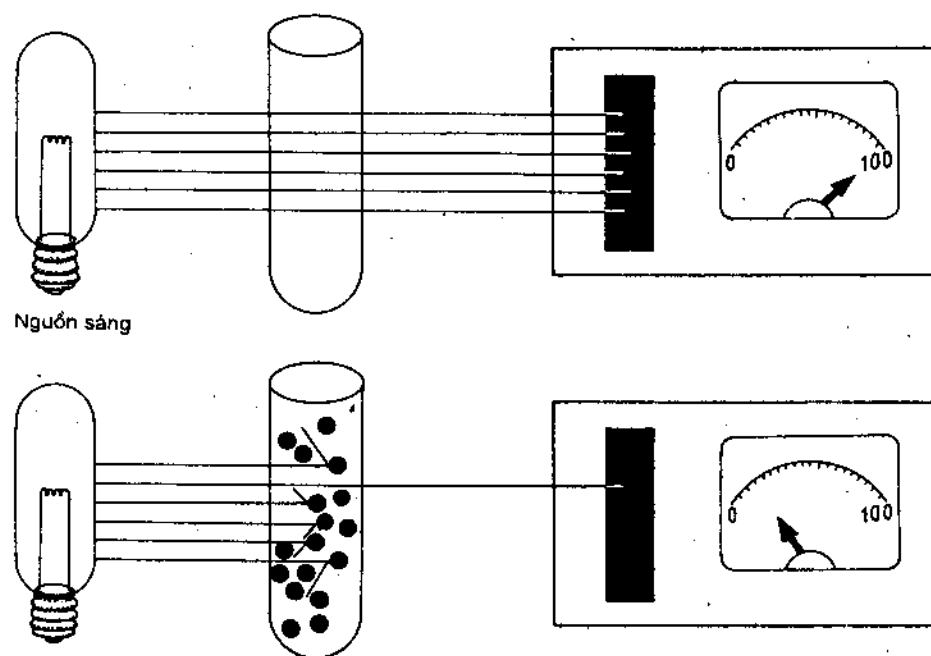
Quan hệ giữa mật độ tế bào vi khuẩn, nồng độ cơ chất, thời gian tăng đôi và sản lượng tế bào trong những điều kiện của cân bằng động học ở các hệ số pha loãng khác nhau trong chemostat



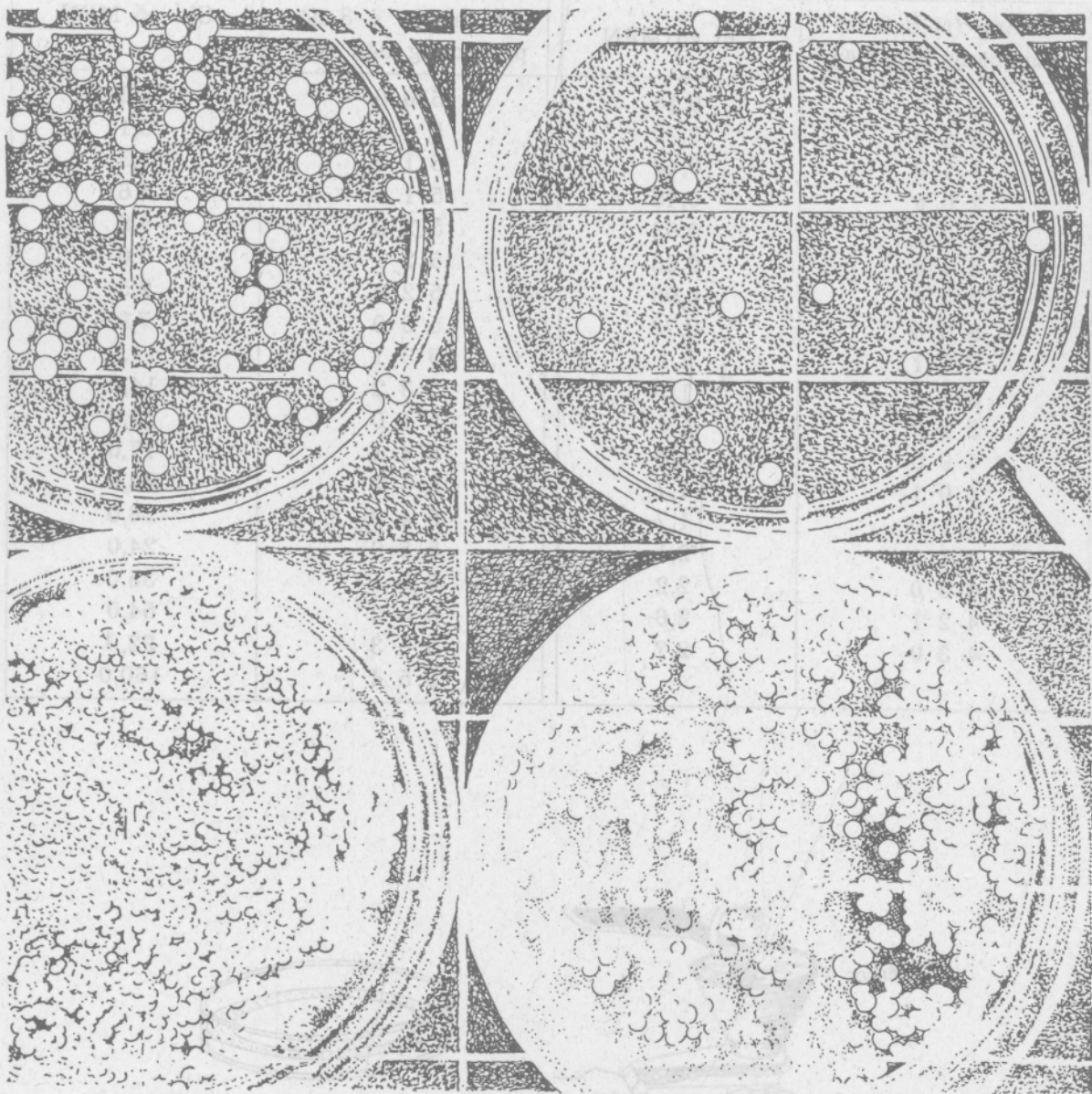
Các thiết bị dùng để nuôi cấy vi sinh vật kỵ khí



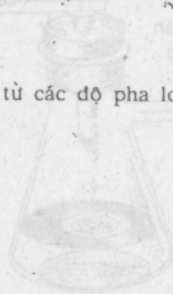
Kiểm tra số lượng tế bào vi sinh vật bằng phòng đếm hồng cầu (quan sát dưới kính hiển vi)



Xác định mật độ vi sinh vật bằng phương pháp đo độ đục

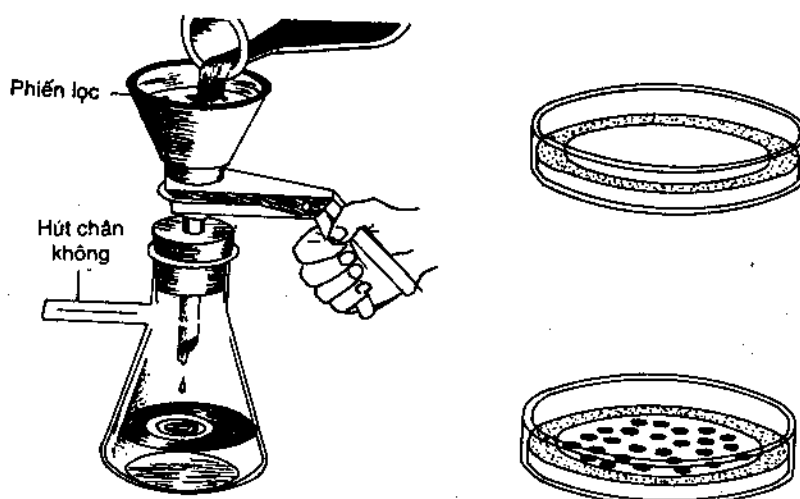


Sự phát triển của khuẩn lạc trên môi trường thạch khi cấy từ các độ pha loãng khác nhau

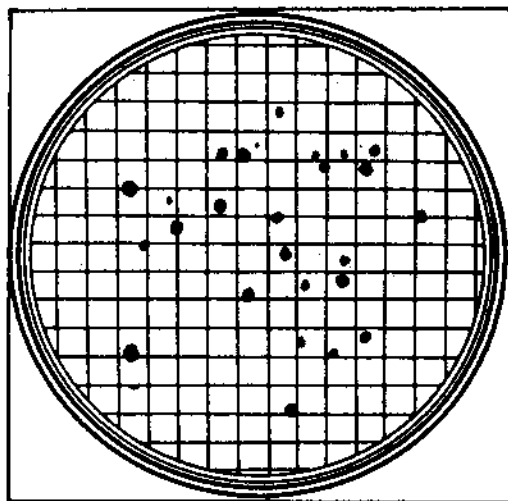


Bảng chỉ số khả năng tối đa (MPN)

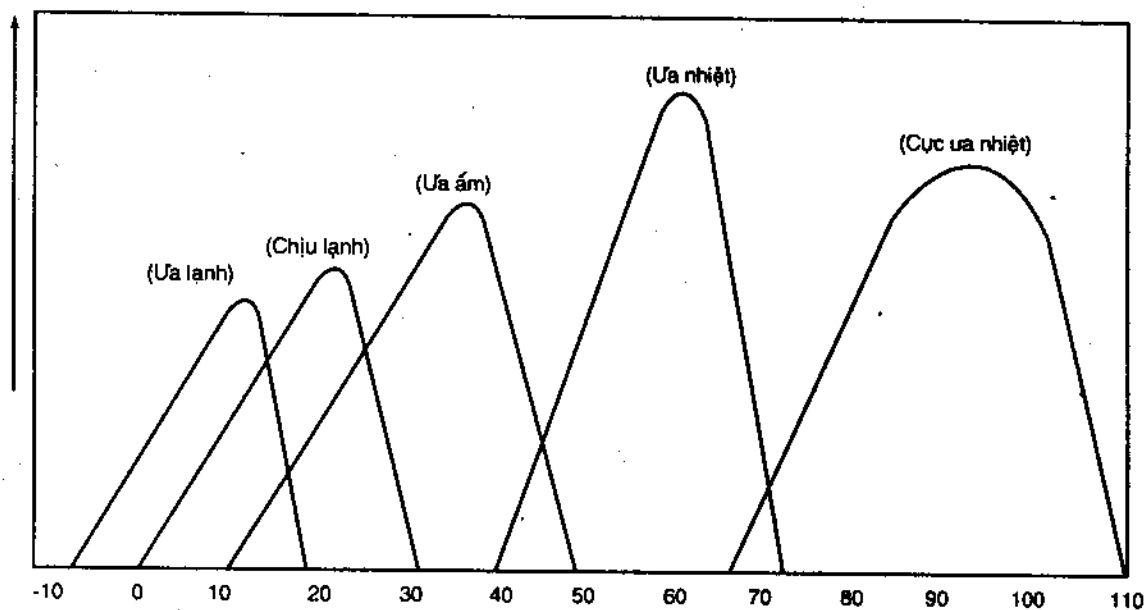
Số ống (t) ở 3 độ pha loãng liên tiếp	Chỉ số MPN	Số ống (t) ở 3 độ pha loãng liên tiếp	Chỉ số MPN
0 1 0	0,18	5 0 0	2,3
1 0 0	0,20	5 0 1	3,1
1 1 0	0,40	5 1 0	3,3
2 0 0	0,45	5 1 1	4,6
2 0 1	0,68	5 2 0	4,9
2 1 0	0,68	5 2 1	7,0
2 2 0	0,93	5 2 2	9,5
3 0 0	0,78	5 3 0	7,9
3 0 1	1,1	5 3 1	11,0
3 1 0	1,1	5 3 2	14,0
3 2 0	1,4	5 4 0	13,0
4 0 0	1,3	5 4 1	17,0
4 0 1	1,7	5 4 2	22,0
4 1 0	1,7	5 4 3	28,0
4 1 1	2,1	5 5 0	24,0
4 2 0	2,2	5 5 1	35,0
4 2 1	2,6	5 5 2	54,0
4 3 0	2,7	5 5 3	92,0
		5 5 4	160,0



Phương pháp kiểm tra số lượng vi sinh vật bằng cách lọc qua phiến lọc Millipore rồi đặt phiến lọc lên môi trường thạch đĩa và kiểm tra số lượng khuẩn lạc sau khi đã nuôi cấy ở nhiệt độ thích hợp.



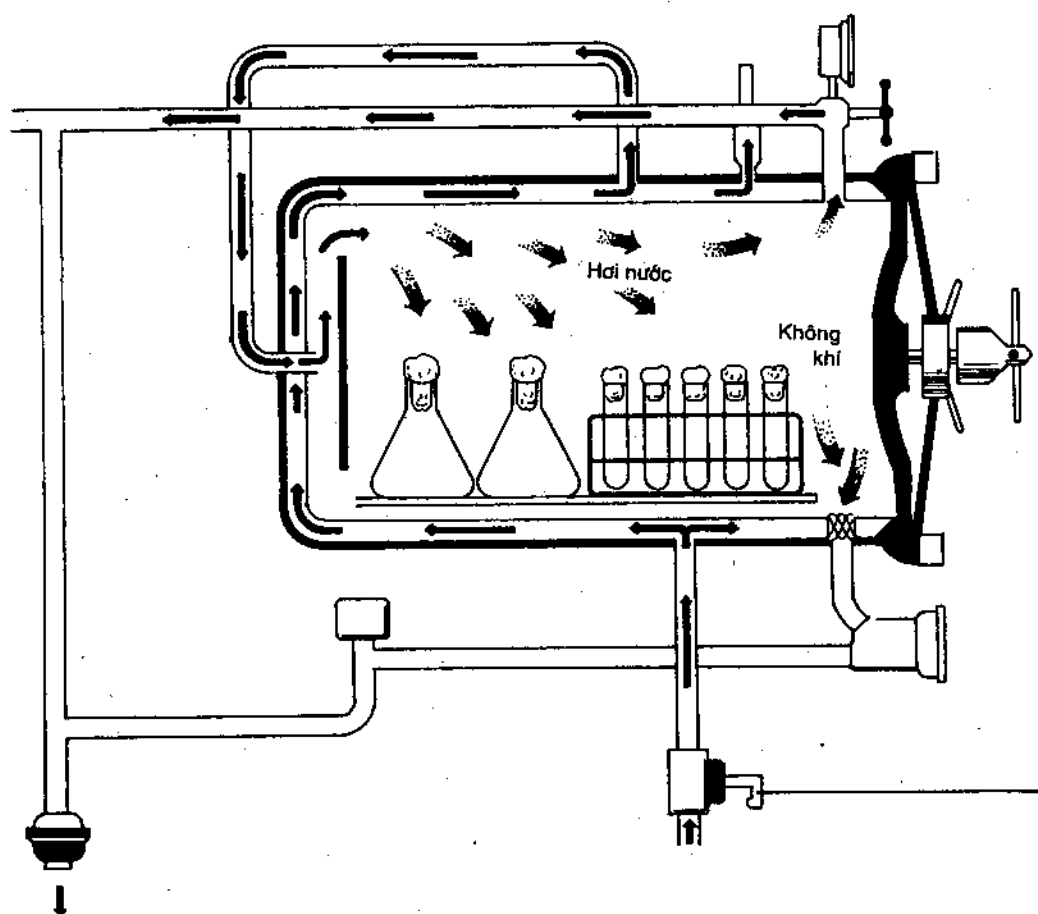
Sự xuất hiện 27 khuẩn lạc sau khi đặt phẩn lọc (đã lọc 100ml nước) lên môi trường thạch đĩa



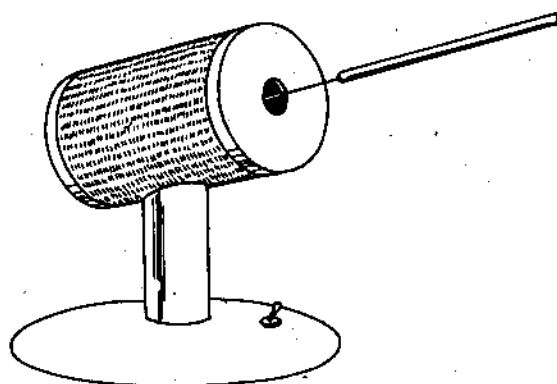
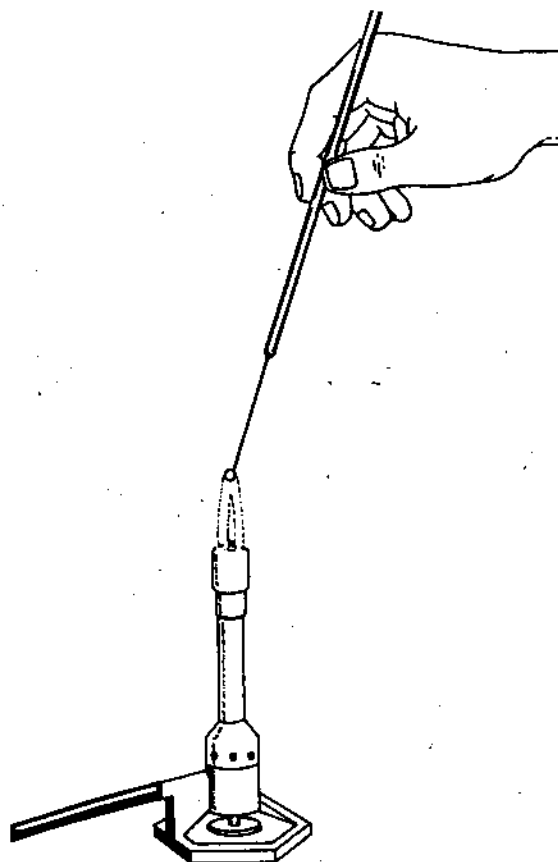
Mối quan hệ giữa các nhóm vi sinh vật khác nhau với nhiệt độ

Một số đại diện của các nhóm vi khuẩn ưa nhiệt, ưa ấm và ưa lạnh

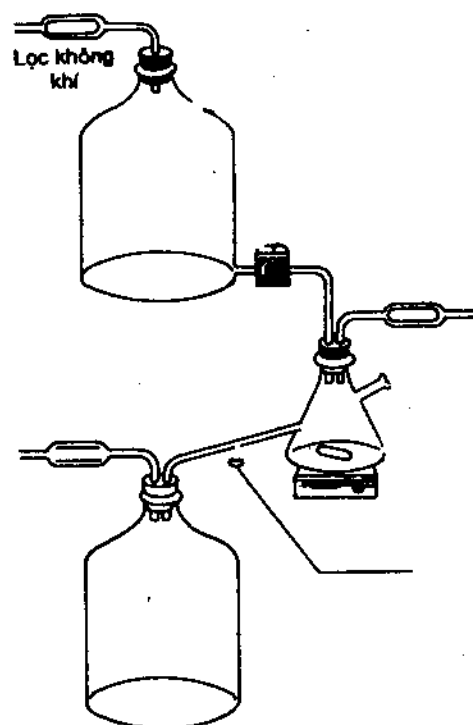
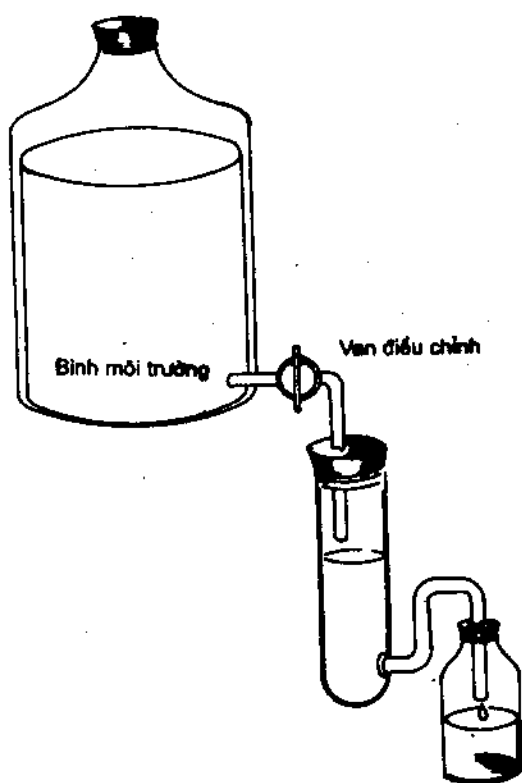
Vi khuẩn	Nhiệt độ tối thích (°C)	Thời gian thế hệ (phút)
<i>Bacillus stearo-therophilus</i>	60	11
<i>Escherichia coli</i>	37	20
<i>Bacillus subtilis</i>	37	27
<i>Staphylococcus aureus</i>	37	28
<i>Streptococcus lactis</i>	37	30
<i>Pseudomonas putida</i>	30	45
<i>Vibrio marinus</i>	15	80



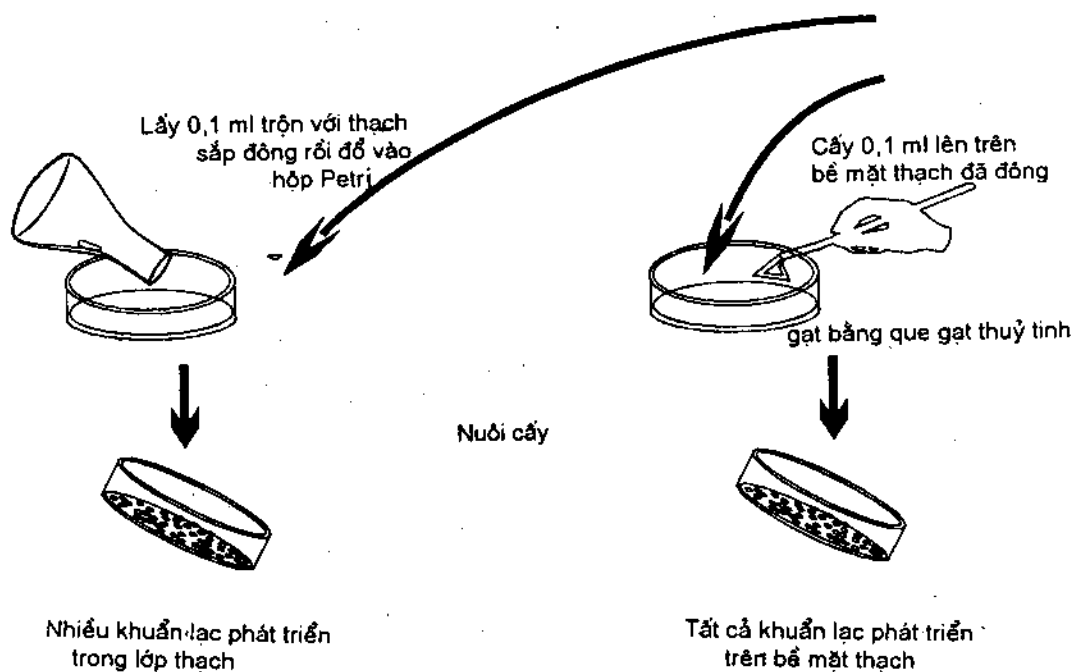
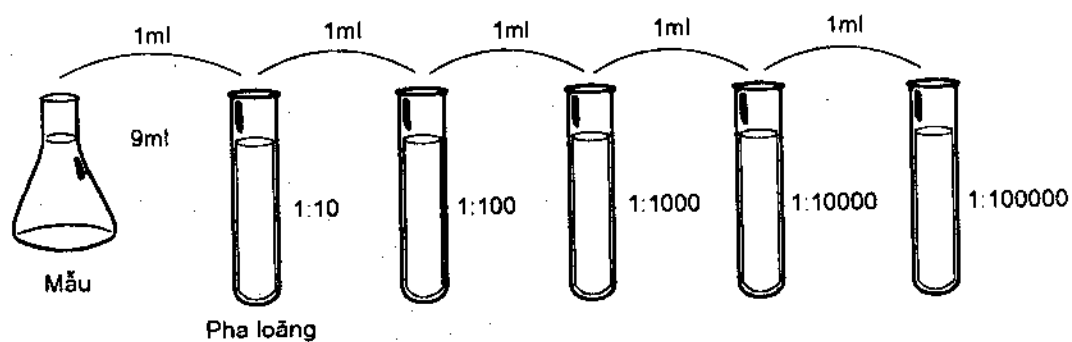
Khử trùng môi trường hoặc dụng cụ thí nghiệm bằng nồi hấp áp lực



Khử trùng que cấy bằng sức nóng của ngọn lửa và bằng sức nóng của thiết bị điện



Mô hình nuôi cấy liên tục vi khuẩn trong chemostat

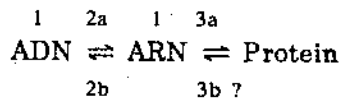


CHƯƠNG IX

DI TRUYỀN HỌC VI SINH VẬT

Cũng như các sinh vật khác, mỗi vi sinh vật đều giống tổ tiên ở hầu hết đặc điểm. Di truyền là sự duy trì các đặc điểm qua nhiều thế hệ. Đơn vị của di truyền là gen. Gen là một đoạn ADN đảm nhiệm một chức năng nhất định trong quá trình truyền thông tin di truyền, chẳng hạn đọc mã cho một chuỗi polipeptit, một loại ARN (rARN, tARN và các loại ARN khác có chức năng điều chỉnh) hoặc đóng vai trò điều khiển sự biểu hiện hoạt động của genom. Ở một số virus có chất di truyền là ARN (như virus cúm, virus gây bệnh dại, virus HIV...) thì gen là một đoạn ARN thường đọc mã (nhờ bộ máy phiên dịch của tế bào chủ) cho một protein xác định.

Phần lớn gen nằm trong nhân tế bào, phần nhỏ gặp ở các yếu tố di truyền ngoài nhiễm sắc thể chẳng hạn plasmid (plasmid F, plasmid R) và các yếu tố di truyền di động (yếu tố IS và transposon). Cho đến nay, dòng thông tin di truyền từ nhiễm sắc thể đến tế bào chất ở mọi sinh vật diễn ra như sau :



Bản thân chất di truyền (ADN hoặc ARN) có khả năng tự nhân lên, quá trình này được gọi là sao chép (1). Sau đó ADN được dùng làm khuôn để tổng hợp ARN (tARN, rARN và mARN) trong quá trình phiên mã (2a). Một số virus (chẳng hạn retrovirus) chứa chất di truyền là ARN, nhưng để có thể lắp genom của bản thân vào nhiễm sắc thể của tế bào chủ virus phải tổng hợp dạng ADN trung gian từ sợi khuôn ARN. Quá trình này được gọi là phiên mã ngược (2b). Cuối cùng, sinh tổng hợp protein hay dịch mã (3a) diễn ra trên phức hợp bao gồm sợi mARN, ribosom (chứa các rARN) và tARN (mang axit amin). Liệu có tồn tại quá trình dịch mã ngược (3b) hay không, ta chưa rõ.

1. SAO CHÉP

Về cơ bản sao chép diễn ra tương tự ở mọi tế bào sinh vật, nhưng quá trình được nghiên cứu chi tiết nhất ở *E. coli*. Genom ở *E. coli* là một sợi ADN kép, đóng vòng kín. Sao chép bắt đầu ở một điểm gốc (oriC) và diễn ra liên tục cho đến kết thúc. Một đơn vị chất di truyền có khả năng tự sao chép từ đầu đến cuối như vậy gọi là một replicon. Sau khi một số protein nhận ra điểm gốc oriC, hai sợi ADN sẽ tách ra tạo thành 2 chạc sao chép, ở đây ADN được tổng hợp theo 2 hướng đối nhau. Tham gia vào quá trình sao chép có các enzym và protein chủ yếu sau đây :

1. Gyraza (còn gọi là topoizome - raza II) là enzym duỗi siêu xoắn ở phía trên chạc sao chép.

2. Helicaza. 2 phân tử khác nhau của enzym này gắn vào 2 đoạn sợi đơn của chạc, có khả năng thủy phân ATP để chuỗi xoắn.

3. Các protein liên kết sợi đơn (SSB) gắn vào 2 đoạn ADN sợi đơn giữ cho chúng khỏi bị xoắn lại và có hình dạng thuận lợi cho sự sao chép.

4. ADN - polimeraza *E. coli* chứa 3 loại enzym này, gọi tắt là pol. I, pol. II, pol. III. Cả 3 đều có khả năng sao chép ADN và đều có các đặc tính sau :

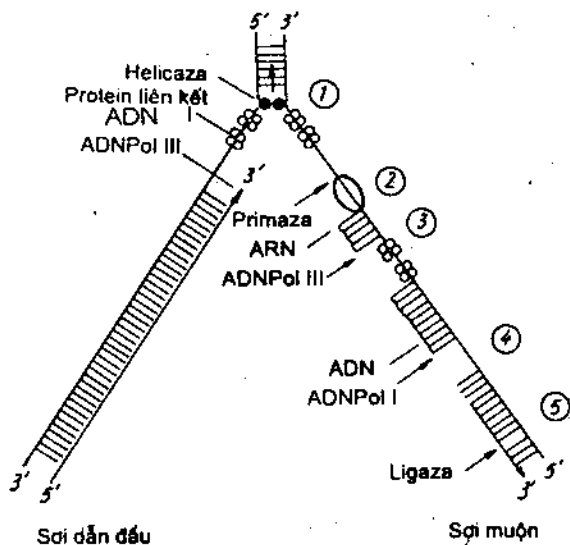
- chỉ sao chép theo hướng 5' → 3'.
- không có khả năng sao chép từ đầu mà cần có một đầu 3'-OH có sẵn để gắn nucleotit vào. Đáng chú ý, đầu 3'-OH này do một đoạn ARN (gọi là mồi primer) ngắn cung cấp. Mồi lại do một enzym đặc biệt, gọi là primaza tổng hợp. Hơn nữa, chỉ khi kết hợp với một số chuỗi polipeptit khác tạo thành primosom, primaza mới có khả năng nhận ra các thứ tự đặc biệt trên sợi đơn ADN và tiến hành tổng hợp mồi.

- Ngoài hoạt tính polimeraza còn có hoạt tính nucleaza, hoạt tính này cần cho sự sao chép và cho việc sửa chữa ADN.

Về chức năng, pol.III có vai trò chủ yếu trong sao chép, pol.I có vai trò tổng hợp bổ sung và sửa chữa. Chức năng của pol. II chưa rõ.

Sao chép ở *E.coli* diễn ra như sau :

1. Một số protein nhận ra gốc oriC và cởi xoắn ở đây.
2. Hai phân tử helicaza gắn vào 2 đoạn sợi đơn tiếp tục cởi xoắn.
3. Các protein SSB liên kết tiếp vào 2 đoạn sợi đơn sau helicaza.
4. Trên sợi khuôn 3' → 5' primaza tổng hợp một mồi duy nhất sau đó pol.III lắp tiếp các nucleotit vào đầu 3'-OH của mồi. Sợi con được sao chép liên tục và được gọi là sợi dẫn đầu.
5. Trên sợi khuôn đối diện, primaza phải tổng hợp nhiều mồi, pol.III lắp tiếp nucleotit vào đầu 3'-OH của mồi mồi tạo thành các đoạn ADN khoảng 1000 - 2000 nucleotit gọi là đoạn Okazaki.



Sao chép ADN sợi đôi

1. ADN sợi đơn được làm bền bởi các protein SSB.
2. Sợi dẫn đầu được sao chép liên tục bởi pol. III theo hướng 5' → 3'.
3. Tổng hợp của sợi muộn diễn ra theo hướng ngược lại và gián đoạn nhờ mồi ARN tổng hợp bởi primaza.
4. Nhờ pol. III, một đoạn ADN được tổng hợp tiếp theo mồi.
5. Mồi bị loại bỏ nhờ pol. I và chỗ khuyết được pol. I tổng hợp bổ sung.
6. Những lỗ hổng được hàn lại bởi ligaza.

6. Pol. I cắt bỏ mỗi đồng thời sao chép bổ sung các đoạn Okazaki đứng sau.

7. Enzim ligaza "hàn" các chỗ hổng giữa các đoạn Okazaki. Phản ứng "hàn" cần NAD^+ làm nguồn năng lượng.

Như vậy, sợi con tạo thành trên sợi khuôn $5' \rightarrow 3'$ được sao chép theo kiểu gián đoạn và được gọi là sợi muộn (hình 9-1).

Cần chú ý, sinh tổng hợp của 2 sợi con được phối hợp nhờ sự tạo thành một nút ở sợi muộn gần chạc, nhờ đó một dime của pol III có thể sao chép đồng thời và cùng hướng cả 2 sợi. Cuối cùng cần chú ý rằng :

- Ở *E. coli* sự nhân đôi nhiễm sắc thể diễn ra theo hai hướng nhưng ADN vòng ở ti thể và thể thực khuẩn X174 chỉ theo một hướng. Ở tế bào Eukaryota (chẳng hạn ở ruồi giấm *Drosophila*) quá trình nhân đôi nhiễm sắc thể cũng giống ở vi khuẩn nhưng do các sợi ADN rất dài và sự di chuyển của các "mắt" (chỗ phồng) tương đối chậm nên tế bào phải bắt đầu nhân đôi nhiễm sắc thể từ nhiều điểm O, nghĩa là phải tạo thành nhiều "mắt" (tế bào trứng của *Drosophila* nhân đôi nhiễm sắc thể hết 3 phút và phải sử dụng khoảng 6000 "mắt").

- Ở tế bào Eukaryota các đoạn Okazaki được tạo thành trên các mồi ARN ngắn (~ 10 nucleotit), các đoạn Okazaki cũng ngắn ($\sim 100 - 150$ nucleotit). Sự nhân đôi nhiễm sắc thể cần nhiều yếu tố trong tế bào chất hòa tan, hoạt động trong bước mở đầu có lẽ để phân li histon và các protein khác khỏi ADN.

- Ở thể thực khuẩn ϕX174 việc tổng hợp ADN chỉ cần pol. I và ligaza và cũng không cần ARN làm mồi.

- Sự nhân đôi nhiễm sắc thể đòi hỏi hoạt động phối hợp của hàng loạt protein (kể cả các enzym). Đứng về quan điểm chức phận và có lẽ cả quan điểm cấu trúc những protein này phải tạo thành một đơn vị gọi là replixom. Replixom trong tổng hợp ADN có lẽ tương đương với riboxom trong tổng hợp protein. Mặc dù không lớn và phức tạp như riboxom nhưng replixom khó nghiên cứu hơn vì hai lý do : chỉ có mặt trong tế bào khoảng 5 - 10 bản sao (so với ~ 10.000 riboxom / tế bào) và, không tồn tại ở phức hợp bền, đặc biệt khi vắng mặt điểm sinh trưởng của ADN.

Một số chất kháng sinh kìm hãm quá trình nhân đôi nhiễm sắc thể. Phleomixin, antramixin, daunomixin và dixtamixin A không những kìm hãm việc tổng hợp ADN mà còn ảnh hưởng đến việc tổng hợp ARN. Đặc biệt, mitomixin C, do tạo thành những cầu nối ngang cộng hóa trị giữa các sợi ADN, đã ngăn cản việc tách các sợi này trong quá trình nhân đôi nhiễm sắc thể. Sau khi miomixin C gắn vào ADN, sợi khuôn sẽ bị phân giải. Tuy nhiên, ta còn chưa rõ chất kháng sinh này liên kết cộng hóa trị vào vị trí O_6 của guanozin hay N_9 của purin.

2. PHIÊN MÃ

Phiên mã cũng diễn ra theo hướng $5 \rightarrow 3'$. Ở *E. coli* enzym xúc tác phiên mã cả 3 loại ARN là ARN - polimeraza và gồm 5 chuỗi peptit : $2\alpha : \beta : \beta' : \sigma$ (holoenzim). 4 chuỗi đầu gắn chặt với nhau và có hoạt tính polimeraza gọi là enzym tối thiểu. Chuỗi σ gắn lỏng lẻo vào enzym tối thiểu, hướng dẫn enzym này gắn chặt và chính xác vào vị trí mở đầu của mỗi gen (promoto).

Khác với sao chép, phiên mã chỉ diễn ra trên một sợi, thậm chí trên từng đoạn của sợi khuôn ADN. Hơn nữa, ARN- polymeraza không cần mỗi và cũng không có hoạt tính nucleaza. Phiên mã ở *E. coli* diễn ra như sau :

1. Nhờ sự "dẫn đường" của yếu tố σ (xích ma) ARN-polymeraza gắn vào vị trí promoto trên sợi khuôn ADN và còi xoắn ở đây.

2. Phiên mã bắt đầu. Nucleotit thứ nhất bao giờ cũng là ATP hoặc GTP (còn cả triphotphat) và gắn vào chuỗi β .

3. Sau khi phiên mã được khoảng 12 nucleotit, σ tách khỏi phức hợp để lại liên kết với một phần tử enzym tối thiểu khác.

4. Khi sắp phiên mã xong một gen ARN - polymeraza sẽ gặp một trong 2 tín hiệu kết thúc sau đây :

- tín hiệu mạnh : không cần yếu tố protein bổ sung nào và có cấu trúc dạng cặp tóc.

- tín hiệu yếu : cũng có cấu trúc dạng cặp tóc nhưng thiếu đoạn oligo (U) và cần yếu tố protein rho ; rho nhận ra và gắn vào đoạn ARN sợi đơn, thủy phân ATP rồi di động đến bóng phiên mã và tách mRNA khỏi phức hợp.

Sau khi tổng hợp trên sợi khuôn ADN phân tử ARN thường còn phải trải qua một quá trình chế biến trước khi trở thành dạng cuối cùng tham gia vào hoạt động sống của tế bào. Quá trình chế biến sau phiên mã này gồm ba loại :

a) Tách các nucleotit thừa

Ở vi khuẩn, hai rARN 16S và 23S nằm trên cùng một đơn vị phiên mã. Tuy nhiên thường ta không phát hiện được sợi ARN tiền chất lớn chứa cả hai thứ tự 26S và 23S vì đoạn mang rARN 16S bị cắt ra trước khi đoạn mang rARN 23S được hoàn thành. Nhưng nếu dùng các biến chủng RNaza III⁻ (là endonucleaza III đặc trưng cho ARN sợi đôi) ta sẽ thấy tế bào tích lũy một lượng lớn các ARN tiền chất nói trên. Vậy ribonucleaza III có chức phận tách phần chứa thứ tự 16S (p 16S) khỏi phần chứa thứ tự 23S (p 23S). Bước tiếp theo là việc cắt xén các nucleotit thừa ở đầu 5' và 3' của p 16S và p 23S. Nói chung, khoảng 22% nucleotit của sản phẩm phiên mã ban đầu đã bị loại đi.

Còn rARN 5S' tiền chất ở *E. coli* chỉ dài hơn dạng cuối cùng vài nucleotit. Nhưng ở *Bacillus*, chẳng hạn *B. subtilis*, có hai loại tiền chất của rARN 5S : p5A (180 nucleotit) và p5B, (140 - 150 nucleotit). Vì dạng 5S trưởng thành (dạng cuối cùng) chứa 118 nucleotit nên các tiền chất trên rõ ràng là khá lớn và là sản phẩm của hai gen khác nhau. Một enzym nucleaza - RNaza M5 đã cắt xén p5A và p5B thành dạng 5S cuối cùng.

Ở nấm men (Eukaryota) rARN được tổng hợp trong hạch nhân ở dạng một sợi tiền chất duy nhất 35S. Sau đó rARN tiền chất này bị phân giải thành các dạng cuối cùng 28S, 18S, 5,8S và 5S.

Việc tổng hợp các phân tử tARN cũng diễn ra theo mẫu phân hủy chuỗi và tách các nucleotit thừa. Trên nhiễm sắc thể của *E. coli* và của thể thực khuẩn T₄ một số gen đọc mã cho các phân tử tARN được hợp thành nhóm chứa thông tin của một hoặc thậm chí tới 5 - 7 phân tử tARN khác nhau. Trên sợi ARN tiền chất này các phân tử tARN cách nhau bởi những đoạn ribonucleotit "thừa". Các sợi ARN tiền chất khổng lồ như vậy có thể được phát hiện nếu ta dùng các biến chủng của *E. coli* miễn cảm với nhiệt độ, chứa một enzym chế biến tARN-RNazaP đã bị hư hại. Ít nhất ba tiền chất của tARN có cấu trúc bậc một đã được xác định hoàn toàn : một tiền chất

monome của tARN^{tir} (*E. coli*) và một tiền chất dime tARN^{gly} - tARN^{trc} (*E. coli*), và một tiền chất dime tARN^{Pro} - tARN^{Xer} (thể thực khuẩn T₄). Quá trình cắt xén các nucleotit thừa để chuyển tiền chất thành các dạng tARN cuối cùng cần ít nhất hai loại RNaza : RNaza P và RNaza Q.

Riêng đối với mARN ở vi khuẩn, quá trình cắt xén các nucleotit thừa từ sản phẩm phiên mã ban đầu còn chưa rõ ràng. Tuy nhiên, nhiều phân tử mARN của thể thực khuẩn được tổng hợp *in vitro* ở dạng những đơn vị phiên mã dài. Chẳng hạn ARN của thể thực khuẩn T₇ tạo thành *in vitro* nhờ sự xúc tác của ARN-polimeraza của *E. coli* có khối lượng phân tử $2,5 \times 10^6$ nhưng các mARN sớm của T₇ xuất hiện trong tế bào bình thường sau khi nhiễm thì nhỏ hơn nhiều. Nếu nhiễm T₇ vào tế bào *E. coli* chứa RNaza III bất hoạt ta sẽ thấy chuỗi ARN của T₇ cũng lớn như sản phẩm *in vitro*. Vậy, có lẽ RNaza III tham gia vào việc chế biến cả rARN và mARN.

b) Cải biến các nucleotit

Trong quá trình trưởng thành của nhiều phân tử ARN một số nucleotit trong sản phẩm phiên mã ban đầu bị cải biến, đặc biệt ở các phân tử tARN nhưng cũng ở các phân tử rARN và có thể ở cả mARN. Sự cải biến thường thấy nhất là việc gắn nhóm metil vào một nucleotit ; chất cho nhánh metyl là S. adenosylmethionin và phản ứng được xúc tác bởi methyltransferaza. Sản phẩm của phản ứng chủ yếu là các dẫn xuất metyl của các bazơ nhưng một số dẫn xuất 2'-O-metyl của ribozơ và một số hợp chất dimetyl cũng được tạo thành. Một sự cải biến quan trọng nữa là phản ứng đồng phân hóa nhánh uridilat thành pseudouridilat. Hầu như phân tử tARN nào cũng chứa ít nhất một nhánh pseudouridin. Phản ứng đồng phân này xảy ra ở cả rARN của tế bào Eukaryota và Prokaryota. Hệ thống enzym xúc tác sự đồng phân hóa nhánh uridilat trong phân tử tARN từ *E. coli* đã được phân lập và người ta cũng đã thu nhận được biến chủng của *Salmonella typhimurium* bị thiếu enzym này. Những biến chủng như vậy bị hư hại trong việc điều chỉnh sinh tổng hợp một số axit amin nhất định.

Những phản ứng cải biến khác chỉ gặp ở tARN, chẳng hạn việc chuyển uridin thành tiouridin, sự khử bazơ uraxin thành dihydrouraxin cũng như việc gắn nhánh izopenteryl vào nhóm 6-amino của adenosin ở gần một số anticodon nhất định.

Điều đáng chú ý là ở tARN và rARN một số các biến cố có thể xảy ra ngay khi sản phẩm còn ở dạng tiền chất. Đặc biệt rARN 16S chỉ bị cải biến khi đã gắn với một số protein - ribosom.

c) Bổ sung các nucleotit

Nhiều phân tử mARN trong tế bào Eukaryota chứa một đuôi poliA (150 - 300 nucleotit) ở đầu 3'. Phản ứng ngưng tụ các nhánh adenilat diễn ra trong nhân sau khi phiên mã và do enzym nucleotit-transferaza xúc tác. Có lẽ "đuôi" poliA giúp cho việc chuyển mARN từ nhân vào tế bào chất và ở đây nó lại bị phân giải đi. Tế bào vi khuẩn cũng chứa một enzym có khả năng, gắn nhánh adenilat vào ARN nhưng cho tới nay chưa có chứng cứ nào cho thấy ARN ở vi khuẩn cũng chứa một "đuôi" poliA.

Như ta đã biết phân tử tARN từ mọi tế bào sinh vật, kể cả vi khuẩn, đều tận cùng bởi thứ tự -X-X-A ở đầu 3'-OH. Trong một số trường hợp (như tARN^{tir}, tARN^{gly} - tARN^{trc}) thứ tự -XXA là một phần nội tại của sản phẩm phiên mã và trở thành đầu 3'-OH sau khi các nucleotit thừa nằm phía ngoài đã bị RNaza Q cắt xén đi. Nhưng trong trường hợp khác thì thứ tự -XXA được thêm vào khi phiên mã nhờ tác dụng của enzym nucleotidyl-transferaza. Bản thân enzym cũng có chức phận sản sinh lại đầu -XXA của tARN đã bị loại đi sau mỗi vòng trao đổi chất.

Một số độc tố nấm và chất kháng sinh kim hãm quá trình phiên mã. Những chất này thuộc 3 loại :

1. Các chất tương tự với cơ chất : thurigin (là exotoxin từ *B. thuringiensis*), cordixepin-5'-tri-P (từ *Cordyceps militaris*) và tuberixidin (từ *Streptomyces tubercidicus*) đều là chất tương tự của ATP. Các chất này ảnh hưởng lên bước kéo dài chuỗi ARN do gắn vào vị trí liên kết của ARN-polimeraza với ATP.

2. Các chất liên kết vào ADN và cải biến cấu trúc của sợi khuôn.

Những chất này tạo thành phức hợp không cộng hóa trị với ADN và ảnh hưởng đến chức năng của sợi khuôn.

Actinomixi D có vòng phenoxazon xen vào giữa hai cặp bazơ G-X trong khi các chuỗi bên, pentapeptit liên kết hidro với các nhánh G và hướng vào rãnh nhỏ của sợi ADN xoắn kép. Actinomixin D không ảnh hưởng đến sự liên kết của enzym vào sợi khuôn mà kim hãm chủ yếu bước kéo dài chuỗi.

Proflavin và etidium bromit cũng xen vào giữa hai cặp bazơ liên tiếp.

Aflatoxin thì kim hãm cả quá trình nhân đôi nhiễm sắc thể và quá trình phiên mã.

3. Các chất gắn vào ARN-polimeraza và ảnh hưởng đến hoạt tính

Đáng chú ý là chất kháng sinh rifampixin (ở *Streptomyces mediterranei*), chất này gắn chặt vào chuỗi β của enzym gắn vị trí liên kết nucleozit-5'-tri-P đầu tiên, do đó kim hãm bước mở đầu. Rifampixin chỉ kim hãm tổng hợp ARN ở các hệ thống riboxom 70S (vi khuẩn, ti thể, lục lạp). Trái lại việc tổng hợp mARN tiến thể trong dịch nhân của các cơ thể Eukaryota bị kim hãm bởi α -amanitin - một peptit độc từ nấm *Amanita phalloides*. Vì vậy, cũng dễ hiểu là trong quá trình nhiễm vi khuẩn những virus nào sử dụng ARN-polimeraza của chủ (như thể thực khuẩn T_4 , SP01) thì miễn cảm với rifampixin, trái lại thể thực khuẩn T_7 , 5 phút sau khi nhiễm không bị rifampixin tác dụng nữa vì trong thời gian này chúng đã tổng hợp một enzym mới không miễn cảm với rifampixin.

Tương tự với rifampixin có streptovarixin (*S. spectabilis*) và tolypomixin (*S. tolypophorus*) nhưng tác dụng yếu hơn. Riêng streptolidizin (*S. lydicus*) lại ảnh hưởng đến bước kéo dài chuỗi do làm giảm vận tốc hình thành liên kết photphodiester. Chất thuốc nhuộm rose bengal cũng có tác dụng tương tự như streptolidizin.

Sự mở đầu phiên mã ở *E. coli* bị kim hãm bởi chất kháng sinh rifampixin do chất này liên kết cạnh tranh vào vị trí gắn nucleotit đầu tiên trên chuỗi β .

Đáng chú ý, ngoài chức năng trong phiên mã, yếu tố σ còn có vai trò trong điều chỉnh hoạt động của gen. Chẳng hạn, ở *E. coli* yếu tố σ^{70} (do có $M_r = 7000$ kDa*) đảm nhiệm hướng dẫn việc phiên mã các gen trong điều kiện bình thường. Tuy nhiên trong điều kiện bị sốc nhiệt (tăng nhiệt độ nuôi từ 37°C lên 42°C) tế bào tổng hợp một yếu tố σ mới - σ^{32} ($M_r = 32000$ kDa) - liên kết với enzym tối thiểu bình thường ($= 2\alpha\beta\beta'\sigma^{32}$) và hướng dẫn enzym này gắn vào promoto của các gen sốc nhiệt. Kết quả là 17 protein sốc nhiệt (HSP = heat shock protein) đã được tạo thành, các protein này có thể có chức năng bảo vệ các enzym chống lại sự biến tính bởi nhiệt.

Sự tạo thành bào tử ở *Bacillus* khi cạn chất dinh dưỡng cũng có thể coi là biểu hiện của một sự sốc khác. Trong điều kiện như vậy tế bào *B. subtilis* tổng hợp một số yếu tố σ mới có vai trò trong việc tạo thành nôi bào tử.

*1kDa (kilô dalton) = $1,66 \times 10^{-21}$ g. Hiện nay thường dùng đơn vị cacbon (1 đơn vị cacbon = $1,6602 \times 10^{-24}$ g).

Ở các tế bào nhân thật kể cả vi sinh vật, tồn tại 4 ARN-polimeraza : pol. I gặp trong hạch nhân và tổng hợp các rARN lớn ; pol. II gặp trong dịch nhân và tổng hợp tiền tARN ; pol. III gặp trong dịch nhân và tổng hợp tARN, tARN 5S và một số ARN nhỏ khác ; ti thể chứa ARN-polimeraza riêng.

Khác với tế bào nhân nguyên thủy, genom ở tế bào nhân thật được phân thành các đoạn khác nhau : các đoạn không mang thông tin xen kẽ (intron) với các đoạn mang thông tin (exon). Sản phẩm phiên mã trực tiếp của pol. II chưa phải là tARN mà là pre-mARN vẫn chứa cả exon và intron. Sau đó diễn ra trong nhân quá trình cắt exon khỏi intron và nối các exon lại thành mARN. Quá trình được xúc tác bởi một phức hợp gồm protein và một sợi ARN nhỏ gọi là snRNP (small nuclear ribonucleoprotein). Chất kìm hãm đặc trưng của pol. II là α -amanitin (một peptit rất độc gặp trong nấm *Amanita phalloides*).

Cũng khác hẳn tế bào nhân nguyên thủy, mARN và pre-mARN ở tế bào nhân thật luôn luôn có một chóp (cap) m^7G (guanin được metyl hóa ở nguyên tử C^7) ở đầu 5' và một đuôi poli (A) (khoảng 100 - 200 bazơ adenin) ở đuôi 3'.

Điều ngạc nhiên là ARN-polimeraza ở vi khuẩn cổ lại có cấu trúc giống với ARN-polimeraza ở nấm men và các tế bào nhân thật khác nghĩa là chứa tới 8 - 12 chuỗi polipeptit (chứ không phải chỉ 4 chuỗi như ở *E. coli*). Hơn nữa genom ở vi khuẩn cổ cũng chứa intron.

3. DỊCH MÃ

Cũng như sao chép và phiên mã, dịch mã diễn ra ở mọi tế bào về cơ bản là giống nhau nhưng được nghiên cứu kĩ nhất ở *E. coli*. Tham gia vào quá trình này có 3 thành phần chính : riboxom, mARN và tARN.

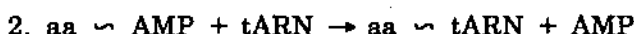
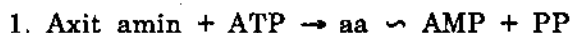
Ở *E. coli* (và ở các bào quan như ti thể, lục lạp) riboxom thuộc loại 70S, có thể phân li thuận nghịch thành 2 hạt nhỏ : 50S và 30S. Hạt 50S chứa 34 protein (đánh số từ L1 đến L34) và 2 loại rARN (23S và 5S), hạt 30S chứa 21 protein (đánh số từ S1 đến S21) và một loại rARN (16S).

Trên riboxom có 2 vị trí gắn tARN : vị trí A gắn aminoaxyl-tARN và vị trí P gắn peptidyl-tARN.

tARN chỉ gồm 70 - 90 nucleotit, chứa nhiều bazơ cải biến (dihidro - pseudo - tiouridin, inozin, ribotimidin...), có cấu trúc kiểu lá chẻ ba với cuống và 3' thùy. Đầu 5' của cuống luôn tận cùng bởi -XXA và là vị trí gắn axit amin, còn 3 thùy lần lượt được gọi là DHU (dihidro - uridin), AC (anticodon) và TΨX.

Vì axit mở đầu dịch mã bao giờ cũng là metionin nên tế bào cần 2 loại tARN : một vận chuyển Met mở đầu chuỗi và một vận chuyển Met vào giữa chuỗi. Met mở đầu chuỗi, sau khi gắn với tARN, phải được focmyl hóa (nhờ enzym transformilaza) thành focmyl-metionyl-tARN. Chất cho nhánh focmyl là axit N^{10} - tetra-hidrofolíc. Vì vậy, tARN mở đầu dịch mã và tARN chuyển Met vào giữa chuỗi được kí hiệu lần lượt là ARN_1^{Met} và ARN_m^{Met} .

Trước khi tham gia vào tổng hợp protein mỗi axit amin phải được hoạt hóa qua 2 phản ứng đều do enzym aa-tARN-sintetaza xúc tác :



Như đã nói trên, khác với tế bào nhân thật, mARN ở *E. coli* không có chóp m⁷G ở đầu 5' và đuôi poli (A) ở đầu 3'. Hơn nữa, trong khi ở tế bào nhân thật, mARN là monoxistron (chỉ đọc mã cho một polipeptit) thì ở vi khuẩn thật, kể cả *E. coli*, mARN là polixistron (đọc mã cho >1 polipeptit). Điều đáng chú ý là ở vi khuẩn mARN thường không gặp ở dạng nguyên vẹn vì ngay khi đang còn được phiên mã trên sợi khuôn ADN, các riboxom đã lần lượt gắn vào đầu 5' của mARN để tiến hành tổng hợp protein. Nghĩa là : ở tế bào nhân nguyên thủy, phiên mã và dịch mã diễn ra đồng thời về không gian và thời gian.

Có thể chia quá trình dịch mã thành 3 chặng : mở đầu, kéo dài và kết thúc.

3.1. Mở đầu

Tham gia vào chặng này ngoài các thành phần kể trên còn có 3 yếu tố protein gọi là yếu tố mở đầu : IF-1, IF-2, IF-3.

Trước hết, nhờ sự kích thích của IF-3, mARN được liên kết với hạt riboxom 30S (IF-3 đã gắn trước vào hạt này để ngăn cản hạt 50S khỏi tùy tiện kết hợp với hạt 30S). Tiếp theo, fMet-ARN_f^{Met} ở dạng phức hợp [fMet-ARN_f^{Met}-IF-2-GTP] được chuyển vào vị trí P trên hạt 30S ứng với codon mở đầu AUG của metionin. Nhưng bên trong mARN cũng có nhiều codon AUG khác. Vậy chỉ riêng fMet - tARN với codon AUG tương ứng chưa đủ là tín hiệu mở đầu cho dịch mã. Shine và Dalgarno nhận thấy ở đầu 5' của mARN và đầu 3' của rARN 16S bao giờ cũng có 3 - 9 nucleotit ghép đôi với nhau. Nhờ đoạn ghép đôi bazơ này (gọi là tín hiệu SD, hay vị trí liên kết riboxom, RBS) mà codon mở đầu AUG được chuyển chính xác vào vị trí mở đầu. Bây giờ, IF-3 bị tách ra.

Vai trò của IF-1 chưa rõ nhưng sự có mặt của yếu tố này là cần cho tác dụng của IF-2.

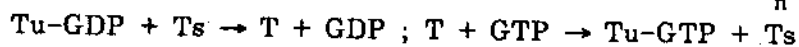
Sau khi fMet - ARN_f^{Met} gắn chính xác vào vị trí mở đầu thì hạt 50S liên kết tiếp vào thành monoxom 70S đồng thời GTP bị thủy phân bởi chính IF-2, năng lượng thủy phân dùng đẩy cả IF-1 và IF-2 ra ngoài.

Kết quả là phức hợp mở đầu được tạo thành : [70S- mARN-fMet-ARN_f^{Met}].

3.2. Kéo dài

Ngoài các thành phần đã biết, chặng này còn cần 2 protein bổ sung gọi là yếu tố kéo dài : EF-T và EF-G. Riêng yếu tố T lại gồm 2 protein : Tu và Ts, liên kết lỏng lẻo với nhau. Cần chú ý, từ axit amin thứ hai trở đi sự liên kết của aa-tARN vào riboxom cần sự kích thích của Tu và GTP trong phức hợp aa_n-ARN-Tu-GTP].

Trước hết, [aa₂-tARN-Tu-GTP] gắn vào vị trí A với codon tương ứng. Rồi (tương tự trong chặng mở đầu), GTP bị thủy phân bởi Tu và Tu-GDP bị đẩy ra ngoài). Nhờ yếu tố Ts mà Tu-GTP lại được tái tạo (vì chỉ Tu-GTP mới liên kết với aa_n) :



Liên kết peptit thứ nhất được tạo thành bằng cách chuyển nhóm -COOH của fMet sang nhóm -NH₂ của aa₂ do trung tâm peptidyl-transferaza (là ribozim 23S của riboxom 50S) xúc tác.

Để dịch mã được tiếp tục, bây giờ fMet-aa₂-tARN phải từ vị trí A chuyển về vị trí P đồng thời đẩy tARN^{Met} trống ra ngoài. Sự chuyển chỗ cần yếu tố G và GTP : G thủy phân GTP lấy năng lượng dùng cho sự chuyển chỗ, đồng thời cho việc đẩy bản thân G ra ngoài.

Sau đó [aa₃-tARN-Tu-GDP] lại sẵn sàng vào vị trí A và các bước tiếp diễn như trên cho đến kết thúc.

3.3. Kết thúc

Sau khi tổng hợp xong chuỗi polipeptit riboxom sẽ gặp một trong 3 codon kết thúc hay còn gọi là codon vô nghĩa (vì không có tARN nào có anticodon tương ứng với 3 codon này) : UAA, UAG, UGA. Ở vi khuẩn tham gia vào chằng này có 3 yếu tố protein gọi là yếu tố tách rời : RF-1 (đặc trưng cho 2 codon UAA, UAG), RF-2 (đặc trưng cho 2 codon UAA và UGA) và RF-3 (kích thích hoạt động của 2 yếu tố trên). Một yếu tố tách rời khác, đặc trưng cho riboxom gọi là RRF và yếu tố kéo dài EF-G cũng cần cho quá trình kết thúc.

Chuỗi polipeptit bị tách khỏi tARN cuối cùng. Phản ứng thủy phân này cần GTP và được xúc tác bởi trung tâm pept-transferaza. Tiếp theo riboxom 70S bị phân li cùng với tARN.

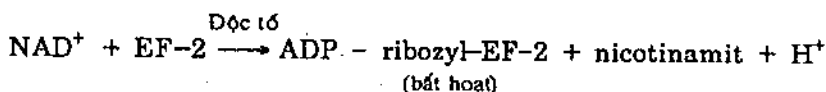
Điều đáng chú ý là, dịch mã *in vivo* không diễn ra trên một monoxom 70S đơn độc mà diễn ra đồng thời trên một nhóm riboxom liên kết cạnh nhau trên sợi mARN gọi là polixom. Hơn nữa, sau khi tổng hợp được một số axit amin, nhánh focmyl và trong nhiều trường hợp cả nhánh metionin, bị cắt khỏi chuỗi.

Hầu hết các chất kháng sinh thông dụng đều kìm hãm tổng hợp protein trên riboxom 70S, 80S hoặc cả hai.

Các chất kháng sinh kìm hãm dịch mã

Kháng sinh	Riboxom	Tác dụng
Cloramphenicol	70S	Kéo dài : kìm hãm pept-transferaza
Actidion	80S	Kéo dài
Eritromixin	70S	Kéo dài : kìm hãm sự chuyển peptit
Kanamixin	Cả hai	Kéo dài : cũng gây độc sai mã
Neomixin	Cả hai	Mở đầu và kéo dài do gây độc sai mã
Puromixin	Cả hai	Kéo dài ; gây kết thúc sớm
Sparsomixin	Cả hai	Kéo dài : kìm hãm pept-transferaza
Spectinomixin	70S	Kéo dài : kìm hãm sự chuyển peptit
Streptomixin	70S	Kéo dài : gắn vào hạt 30S và gây độc sai mã
Tetraxiclin	70S	Kéo dài : ngăn cản sự liên kết của aa - ARN _v vào vị trí A.

Ở tế bào nhân thật axit amin mở đầu cũng là metionin nhưng không cần focmyl hóa. Hơn nữa dịch mã ở riboxom 80S bị kìm hãm bởi một chất độc điển hình, đó là độc tố bạch hầu (thực ra, độc tố này được tổng hợp bởi gen của phago beta cộng sinh với genom của *Corynebacterium diphtheriae*). Trong sự có mặt của NAD⁺ độc tố xúc tác phản ứng ADP - ribozyl hóa yếu tố EF-2 (yếu tố kéo dài ở tế bào nhân thật, tương đương với EF-G ở *E. coli*) :



Điều ngạc nhiên là hệ thống dịch mã ở tế bào vi khuẩn cổ lại có những đặc điểm giống với ở tế bào nhân thật (axit amin mở đầu là metionin) không cần focmyl hóa, không bị kìm hãm bởi cloramphenicol mà bởi độc tố bạch hầu).

4. ĐỘT BIẾN VÀ SỰ PHÁT SINH ĐỘT BIẾN

Cũng như ở sinh vật bậc cao, tế bào vi khuẩn cũng chịu đột biến.

Và, ở đây cũng cần phân biệt genotyp (bộ máy di truyền của một tế bào) với phenotyp (biểu hiện bên ngoài của bộ máy trên). Ở cùng một genotyp, sự biểu hiện của phenotyp phụ thuộc vào các điều kiện môi trường. Nếu ở cơ thể bậc cao đột biến xuất hiện trong các tế bào mầm, ít chịu ảnh hưởng của môi trường thì ở vi khuẩn môi trường có tác dụng trực tiếp. Ở vi khuẩn đột biến cũng diễn ra ngẫu nhiên và không định hướng.

4.1. Đột biến ngẫu nhiên

Trong một quần thể vi khuẩn luôn xuất hiện các đột biến mà không cần có sự can thiệp của thực nghiệm. Đó là các đột biến ngẫu nhiên và các tế bào tương ứng gọi là các thể đột biến ngẫu nhiên. Một trong những nguyên nhân của đột biến ngẫu nhiên có lẽ là do sự sai sót ngẫu nhiên khi liên kết nucleotit trong quá trình sao chép gây nên bởi sự chuyển hóa tautome(*) của các electron trong một bazơ. Chẳng hạn, bình thường, T tồn tại ở trạng thái keto (= oxo) và ghép đôi với A, nhưng khi sao chép T chuyển sang dạng enol và ghép đôi với G. Hậu quả : sợi ADN mới sẽ mang một cặp GX ở vị trí lẽ ra là AT.

4.2. Tần độ thể đột biến và tốc độ đột biến

Tần độ thể đột biến (tức số lượng các thể đột biến trong một quần thể tế bào) khác nhau đối với các tính trạng cá thể, đạt từ 10^{-4} đến 10^{-14} và phụ thuộc vào tốc độ đột biến, điều kiện môi trường cũng như tuổi của huyền dịch. Xác suất của một đột biến đối với mỗi tế bào và mỗi thế hệ gọi là tốc độ đột biến. Khi tốc độ sinh trưởng cao thì tốc độ đột biến là hằng số và nói chung, được xác định ở những tế bào sinh trưởng theo số mũ và dưới những điều kiện tối ưu. Tốc độ đột biến-ngẫu nhiên đối với một gen xác định là khoảng 10^{-5} , với một cặp nucleotit xác định là khoảng 10^{-8} .

4.3. Đột biến yên lặng

Nhiều axit amin có >1 codon tương ứng nên cũng có >1 tARN tương ứng. Do sự "thoái hóa mã" này mà không phải mỗi đột biến đều được biểu hiện ở phenotyp. Với nhiều bộ ba sự thay đổi ở bazơ thứ ba không gây nên hậu quả gì (đột biến yên lặng hay đột biến nguyên nghĩa). Ngay sự thay đổi ở bazơ thứ nhất hoặc thứ hai cũng vậy.

(*) Tautome (Tautomer) : sự chuyển dịch của một hợp chất từ dạng này sang dạng kia tuy vẫn có cùng công thức nhưng khác cấu trúc.

Mặc dù các cấu trúc bậc cao của một protein được quy định bởi cấu trúc bậc một nhưng từng axit riêng rẽ cũng có ý nghĩa khác nhau đối với cấu trúc của protein. Ví dụ : đột biến chuyển AUX (izoloxin) → GUX (valin) dẫn tới sự thay thế một nhóm ưa lipid này bằng một nhóm ưa lipid khác. Trái lại, XUU (lơxin) → XXU (prolin) khiến cho chuỗi polipeptit bị sai lệch và có thể làm thay đổi sâu sắc các cấu trúc bậc cao.

Vì vậy, trong một loạt thể đột biến có cùng gen cấu trúc đối với một enzym bị thay đổi sẽ xuất hiện nhiều mức độ hoạt tính, từ mất hoạt tính không đáng kể đến mất hoàn toàn.

4.4. Hồi biến hoặc sự hoàn tổ

Đột biến điểm có thể thuận nghịch, nghĩa là các thể đột biến có thể bị đột biến trở lại (hồi biến) và phục hồi các đặc tính của dạng hoang dại. Có 2 loại thể hồi biến : ở thể hồi biến cùng vị trí đột biến phục hồi hoạt tính diễn ra ở cùng vị trí với đột biến ban đầu (nếu đột biến trở lại không những ở cùng vị trí mà còn dẫn đến thứ tự của typ hoang dại thì ta gọi đó là thể hồi biến thật), trong thể hồi biến khác vị trí, đột biến xảy ra ở một vị trí khác trong ADN, nhưng có thể phục hồi phenotyp của dạng hoang dại. Một số đột biến át chế thuộc loại hồi biến này, chẳng hạn : 1- đột biến ở một vị trí khác trong cùng một gen có thể phục hồi chức năng của enzym như trong đột biến chuyển khung dọc ; 2- đột biến trong một gen khác có thể phục hồi phenotyp hoang dại ; 3- đột biến dẫn đến tổng hợp một enzym khác có thể thay thế enzym đột biến nhờ việc đưa vào một con đường trao đổi chất khác với con đường mà enzym đột biến đã sử dụng.

4.5. Đột biến cảm ứng

Có thể nâng cao tần độ đột biến nhờ xử lý tế bào bằng các tác nhân gây đột biến. Đó là sự cảm ứng đột biến và tế bào sinh ra gọi là thể đột biến cảm ứng. Tác nhân gây đột biến có thể là hóa, lí hay sinh học.

Dựa vào cấu trúc di truyền có thể phân biệt 3 loại thể đột biến :

- Một cặp bazơ bị thay thế bởi một cặp khác, ví dụ AT bị thay đổi GX và ngược lại.
- Một đoạn ADN gồm nhiều bazơ, thậm chí nhiều gen, bị loại đi, bị chuyển chỗ trên nhiễm sắc thể hoặc bị gián đoạn do sự xen vào của ADN lạ.

Các thể đột biến loại 1 (thể đột biến điểm) có tần độ cao các chủng hồi biến. Trái lại, các chủng này ít gặp ở các thể đột biến loại 2 (như đột biến chuyển khung) và không gặp ở các thể đột biến loại 3 (trừ vài ngoại lệ).

a) Lớp chất tương tự bazơ

Chất tương tự bazơ là những chất kháng chất trao đổi. Một số chất tương tự bazơ pirimidin và purin được tế bào hấp thu, lắp vào ADN và hoạt động như các bazơ bình thường. Tuy nhiên khi sao chép chúng có khuynh hướng ghép bazơ không chính xác. Hai chất thường dùng để gây đột biến là BU (brom - uraxin) và AP (2-aminopurin). BU tương tự với T, do đó ở dạng keto BU chiếm chỗ của T trong sợi ADN và ghép đôi với A. Nhưng do khuynh hướng dễ tautome hóa thành dạng enol mà ở vòng sao chép tiếp theo BU sẽ ghép đôi với G. Hậu quả là AT → XG.

AP cũng tác dụng tương tự, mặc dù thể hiện như A nhưng thường tautome hóa thành dạng imino và ghép đôi với X.

Sự thay thế một purin hay một pirimidin bằng một dẫn xuất purin ($A \rightarrow G$) hay pirimidin khác ($X \rightarrow T$) gọi là sự chuyển dịch.

b) Thay đổi hóa học của bazơ

Axit nitơ (HNO_2) khử amin của A, G hoặc X nhưng không làm đứt hoặc biến đổi sợi polinucleotit. Do thay thế nhóm $-NH_2$ bằng nhóm $-OH$ mà :

- A \rightarrow hipoxantin ghép đôi với X thay cho T dẫn tới chuyển $GX \rightarrow AT$.

- G \rightarrow xantin, vẫn ghép đôi với X nên không gây đột biến Hidroxilamin phản ứng chủ yếu với X khiến bazơ này ghép đôi với A, do đó cũng gây chuyển dịch $XG \rightarrow TA$.

Etyl - và metyl - metansunphonat, dimetyl - và dietyl - sunphonat, etilenimin, iprit nitơ hoặc iprit lưu huỳnh, N-metyl-N'-nitro-N-nitroso-guanidin là các tác nhân alkin hóa gây đột biến mạnh. Chẳng hạn, EMS (etyl - metansulfonat) etyl hóa chủ yếu N-7 của guanin. 7 - alkylguanin bị tách khỏi chuỗi để lại một chỗ hổng, khi sao chép tiếp, một bazơ sai thường lấp vào đây.

c) Lấp vào hoặc loại đi một cặp bazơ

Phân tử acridin xen vào giữa các bazơ cạnh nhau trên chuỗi ADN, làm tăng khoảng cách giữa chúng. Điều này sẽ dẫn đến mất đi một nucleotit hoặc lấp thêm vào một cặp bazơ và làm chuyển khung đọc trong tổng hợp protein :

Đột biến lấp vào

TAX	GGA	XXA	ATA	XT
-----	-----	-----	-----	----

Khung đọc thay đổi

ADN bình thường

TAX	GGA	XAA	TAX	T
-----	-----	-----	-----	---

Khung đọc bình thường

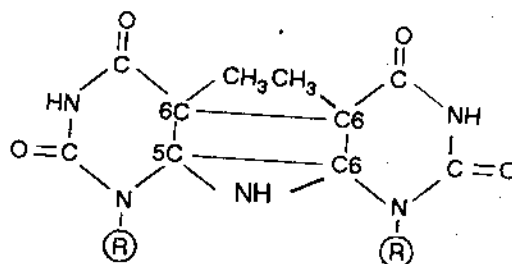
Đột biến loại đi

TAX	GGX	AAT	AXT	
-----	-----	-----	-----	--

Khung đọc thay đổi

d) Tia tử ngoại (UV) và bức xạ ion hóa

Tia UV, tia Ronghen và các bức xạ ion khác có tác dụng gây chết hoặc gây đột biến ở vi sinh vật. Tia UV tác dụng chủ yếu lên axit nucleic, mạnh nhất là ở vùng 260nm, dẫn đến hiện tượng dime hóa timin, ở đây 2 timin gần nhau được liên kết cộng hóa trị với nhau ở nguyên tử C thứ 5 và 6. Hậu quả là sao chép bị sai lầm vì ADN-polimeraza dễ lấp một nucleotit không chính xác vào vị trí trên. Do tác dụng của tia UV trên sợi ADN cũng xuất hiện một dime pirimidin - pirimidin khác gọi là quang sản phẩm 6 - 4, ở đây C-6 của pirimidin 5' (T hoặc X) được liên kết với C-4 của pirimidin 3' (thường là X). Sản phẩm này là nguyên nhân chủ yếu của đột biến gây nên bởi tia UV.



Một dime timin

5. SỬA CHỮA ADN

Tế bào sinh vật có một số cơ chế sửa chữa ADN bị hư hại bởi các tác nhân nói trên.

5.1. Sửa chữa trực tiếp

Nếu chiếu lên huyền dịch vi khuẩn liều lượng cao tia UV thì một số lớn tế bào sẽ bị chết. Nếu sau đó ủ huyền dịch trên với ánh sáng cho phép (320 - 350nm) thì nhiều tế bào sẽ sống sót. Sở dĩ vậy vì trong tế bào tồn tại một loại enzym gọi là photoliasa. Enzim cần 2 cofacto làm yếu tố hấp thụ ánh sáng, đó là $FADH_2$ và 5,10 - meteniltetrahydrofolat (gặp ở *E. coli* và nấm men). Được hoạt hóa bởi ánh sáng photoliasa nhận ra và gắn vào dime timin, sau khi phân giải dime enzym lại tách khỏi ADN.

Một ví dụ khác là sự sửa chữa O^6 - metylguanin (O^6 MG) tạo thành trong sự có mặt của các nhân tố alkyl hóa. Khi sao chép O^6 -MG có khuynh hướng ghép đôi với T hơn là với X, do đó gây nên đột biến $GX \rightarrow AT$. Một enzym, ADN - metyltransferaza, xúc tác chuyển nhóm metyl của O^6 -MG lên một nhánh xistin trên phân tử enzym, sau đó enzym bị bất hoạt.

Sửa chữa cắt nucleotit. Ở *E. coli*, enzym chủ yếu là exonucleaza ABC gồm 3 dưới đơn vị, sản phẩm của các gen *uvrA*, *uvrB* và *uvrC*. Enzim nhận ra một số hư hại kể cả các dime pirimidin cyclobutan, quang sản phẩm 6 - 4 và một số loại ghép thêm bazơ. Khác các endonucleaza thông thường, excinucleaza có khả năng cắt ở 2 vị trí từ 2 đầu của đoạn ADN bị hư hại gồm 12 - 13 cặp bazơ.

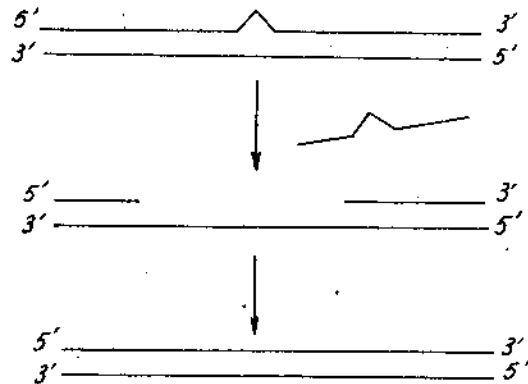
5.2. Sửa chữa cắt bazơ

Mỗi tế bào có một loại enzym gọi là ADN - glicozylaza có khả năng nhận ra những chỗ hư hỏng phổ biến trên ADN (chẳng hạn các sản phẩm khử amin của xitozin và adenin) và loại bỏ đi bazơ hư hỏng bằng cách cắt đi liên kết glicozyl. Điều này tạo ra một vị trí khuyết purin hoặc pirimidin gọi chung là vị trí AP (apurinic hoặc apirimidinic site). Mỗi glicozylaza đặc hiệu cho một loại hư hỏng.

Ví dụ phổ biến cho tất cả các tế bào là uraxin glicozylaza loại bỏ uraxin (xuất hiện từ sự khử amin ngẫu nhiên của xitozin).

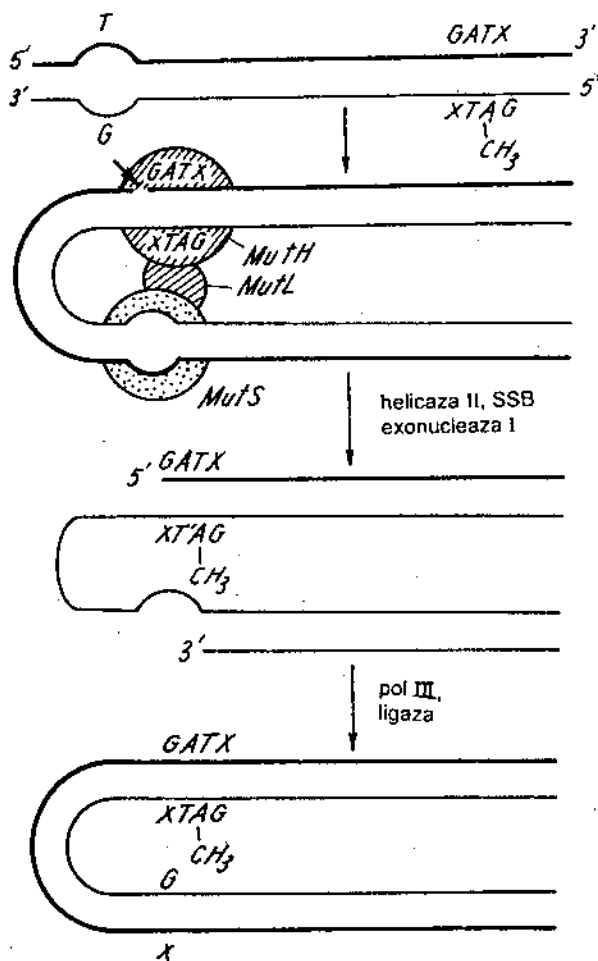
Các glicozylaza khác nhận ra và loại bỏ hipoxantin (xuất hiện từ sự khử amin của adenin) và các bazơ alkyl hóa như 4-metyl-adenin và 7-metylguanin cũng như các dime pirimidin.

Sau khi vị trí AP xuất hiện một số enzym khác tiếp tục sửa chữa. Kết quả là deoxiribo-5'-phosphat sót lại bị loại bỏ và được thay thế bằng một nucleotit mới. Quá trình bắt đầu bằng việc cắt sợi ADN chứa vị trí AP nhờ AP-endonucleaza: một đoạn ADN chứa vị trí AP bị cắt bỏ. Sau đó pol. I tổng hợp ADN bổ sung và ligaza hàn chỗ hổng.



5.3. Sửa chữa ghép đôi sai

Hệ thống sửa chữa này ở *E. coli* gồm ít nhất 9 protein. Sự phân biệt sợi dựa vào tác dụng của Dam - metilaza methyl hóa ADN ở vị trí N₆ của tất cả adenin gặp ở bên trong thứ tự (5') GATX. Ngay sau sao chép có một thời gian ngắn (vài giây hoặc vài phút) chỉ sợi khuôn được methyl hóa, còn sợi mới tổng hợp vẫn chưa được. Chính nhờ điều này mà tế bào phân biệt được các sợi. Cơ chế sửa chữa ghép đôi sai được hướng dẫn bởi các thứ tự GATX tương đối xa. Các protein MutS, MutH và MutL đóng vai trò quan trọng: MutS liên kết vào các cặp bazơ ghép đôi sai, MutH - vào thứ tự GATX, MutL liên kết 2 Mut trên thành một phức hợp. Nếu chỉ một trong hai sợi được methyl hóa ở thứ tự GATX và một cặp bazơ ghép sai nằm gần đó (cách ~ 1000 cặp bazơ), MutH sẽ tác dụng như một endonucleaza đặc hiệu vị trí phân giải sợi không được methyl hóa ở đầu 5' của G trong GATX, vì vậy đã đánh dấu sợi để sửa chữa. Các bước tiếp theo tùy thuộc vào vị trí ghép bazơ sai so với vị trí phân giải trên. Khi bazơ ghép sai nằm ở đầu 5' của vị trí phân giải, sợi không methyl hóa sẽ được cởi xoắn và bị phân giải theo hướng 3' → 5' từ vị trí phân giải qua vị trí ghép sai bazơ rồi được thay thế bằng sợi ADN mới. Quá trình cần tác dụng phối hợp của helicaza II, SSB, exonucleaza I (chỉ phân giải sợi ADN đơn theo hướng 3' → 5'), polimeraza III và ligaza.



6. SỰ TRUYỀN TÍNH TRẠNG VÀ TÁI TỔ HỢP DI TRUYỀN

Ở tế bào nhân thật khi thụ tinh các bộ gen đơn bội kết hợp với nhau tạo thành một hợp tử lưỡng bội. Qua vài lần phân chia ở hợp tử diễn ra sự tái tổ hợp giữa 2 bộ gen và sự giảm (qua phân bào giảm nhiễm) thành bộ gen đơn bội (giao tử).

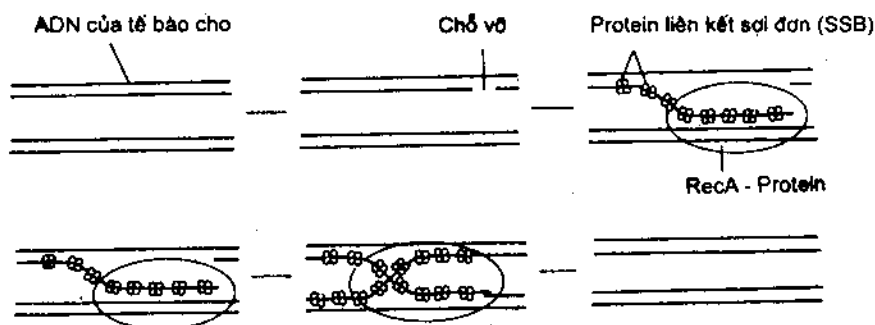
Tái tổ hợp ở tế bào nhân nguyên thủy có nhiều điểm khác. Vi khuẩn luôn luôn là đơn bội. Hợp tử ở chúng không phải là sản phẩm kết hợp của các tế bào. Thường chỉ một phần ADN từ tế bào cho được truyền sang tế bào nhận, do đó sẽ xuất hiện hợp tử một phần. ADN của tế bào nhận và đoạn ADN của tế bào cho ghép đôi và trao đổi đoạn. Khi phân chia nhân và phân bào tiếp theo sẽ xuất hiện một tế bào chỉ chứa nhiễm sắc thể đã tái tổ hợp. Tùy theo cách vận chuyển ADN, ta phân biệt 3

kiểu truyền tính trạng ở vi khuẩn : biến nạp, tải nạp và tiếp hợp. Sau khi ADN được chuyển, trong tế bào, nhân sẽ diễn ra tái tổ hợp : ADN của tế bào cho lắp vào ADN của tế bào nhận (thể tái tổ hợp).

Tái tổ hợp di truyền :

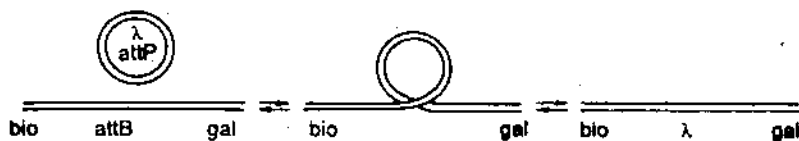
Có 2 cơ chế, qua đó ADN lạ lọt vào tế bào vi khuẩn có thể tái tổ hợp vào nhiễm sắc thể vi khuẩn hoặc plasmit : tái tổ hợp phổ biến hoặc tương đồng và tái tổ hợp đặc hiệu vị trí hoặc đặc hiệu thứ tự.

Tái tổ hợp phổ biến là quá trình trong đó ADN lạ lọt vào tế bào được liên kết với ADN của tế bào chủ qua việc ghép đôi đoạn tương đồng, bẻ vỡ và trao đổi chéo 2 đoạn ADN có trình tự bazơ giống nhau. Ít nhất 6 enzym tham gia vào quá trình (các enzym này cũng có chức năng trong sửa chữa ADN hoặc sao chép ADN), trong đó đáng chú ý nhất là protein RecA.



Cơ chế của tái tổ hợp phổ biến. Sự trao đổi giữa một đoạn ADN của tế bào cho với một đoạn nhiễm sắc thể của tế bào nhận bắt đầu bằng sự cặp đôi của đoạn tương đồng và đoạn bị vỡ, sợi đơn. Tham gia vào đây có protein Rec-A và protein SSB.

Tái tổ hợp đặc hiệu vị trí hoặc đặc hiệu thứ tự, trái lại, chỉ cần một đoạn ADN tương đồng rất nhỏ dùng để nhận biết. Quá trình không cần sự xúc tác của protein RecA mà cần các enzym đặc hiệu cho các phân tử ADN tái tổ hợp. Cả 2 phân tử này đều mang thứ tự nhận biết, do đó tái tổ hợp được gọi là đặc hiệu hai vị trí. Sự hợp nhất của phage lambda và của plasmit F vào genom của *E. coli* là ví dụ về kiểu tái tổ hợp này. Nếu chỉ một trong 2 phân tử ADN tái tổ hợp mang thứ tự nhận biết, ra gọi là tái tổ hợp đặc hiệu một vị trí. Các nhân tố di truyền chuyển dịch chỗ (nhân tố IS, transposon, phage Mu) là ví dụ về kiểu tái tổ hợp trên.



Tái tổ hợp đặc hiệu vị trí trong trường hợp của phage lambda

Khi chuyển sang trạng thái prophage, phage lambda gắn vào nhiễm sắc thể chủ ở một vị trí xác định giữa galactose - operon và vùng biotin. Việc gắn mở đầu bằng sự sắp hàng của 2 thứ tự bazơ tương đồng chỉ gồm 15 cặp bazơ dùng làm vùng nhận biết đối với enzym integrase do phage tổng hợp. Enzym cắt ADN sợi kép của phage và của chủ ở vùng này (vùng attP và attB). Các đầu tự do xuất hiện sẽ được liên kết

chéo nhờ ligaza. Sự lắp vào của phagơ là thuận nghịch. Một enzym khác cũng do phagơ đọc mã, excisionaza, xúc tác việc tách genom của phagơ ra. Cả 2 quá trình, lắp vào và tách ra của phagơ, diễn ra với sự tham gia đồng thời của một protein tạo thành bởi tế bào chủ, yếu tố hợp nhất của chủ, IHF (integration host factor).

Nhân tố IS (insertion sequence). Là các nhân tố di truyền, tuy không có các đoạn tương đồng nhưng có thể lắp vào các vị trí rất khác nhau trên genom vi khuẩn. Đặc tính này tạo cho nhân tố IS khả năng di động rộng rãi gọi là sự chuyển chỗ. Các nhân tố IS được phát hiện đầu tiên ở các biến chủng ngẫu nhiên của *E.coli* ở đây do xen vào ADN của tế bào chủ, chúng phá vỡ sự liên tục của các gen. Các nhân tố IS gặp ở nhiễm sắc thể vi khuẩn, trên các plasmit và phagơ cũng như ở nhiều virut và tế bào nhân thật. Chúng gồm khoảng 800 - 1400 cặp nucleotit và không mang một phenotyp nào khác ngoài chức năng cần cho sự chuyển chỗ. Chức năng này được xúc tác bởi enzym transposaza do yếu tố IS đọc mã, transposaza nhân ra một vùng xác định trong chuỗi kép ADN (ADN đích) và cắt rời 2 sợi. Ở mỗi đầu của nhân tố IS tồn tại các cặp nucleotit lắp lại trực tiếp hoặc gián tiếp và cần cho quá trình chuyển chỗ. Khi nhân tố IS nhận ra ADN đích thì ở vị trí nó lắp vào sẽ diễn ra sự sao chép các cặp nucleotit của ADN đích. Có lẽ các nhân tố IS đóng vai trò quan trọng trong việc định hướng và tái tổ hợp các đặc tính di truyền.

Transposon (Tn). Cũng thuộc các nhân tố di truyền di động, gây đột biến và cũng được gọi là các "gen nhảy". Trái với nhân tố IS, các Tn đọc mã cho các tính trạng dễ nhận thấy về phenotyp, chẳng hạn tính kháng kháng sinh (penixilin, tetraxiclin, kanamixin...), tính kháng kim loại nặng (ví dụ Ag). Sự "nhảy" hoặc sự chuyển chỗ của một Tn thường không liên quan với việc mất của Tn ở vị trí lắp vào ban đầu mà là kết quả của sự sao chép Tn. Theo một mô hình, Tn được nhân lên, trong đó diễn ra sự tiếp xúc với một ADN đích. Kết quả là sự xuất hiện tạm thời của một dạng đồng hợp nhất giữa thể mang Tn và ADN đích mới. Nhờ sự xúc tác của enzym resolvasaza, cuối cùng, thể đồng hợp nhất được tách thành 2 phần tử ADN, mỗi phần tử mang một bản sao của Tn.

Bacteriophago Mu. Có chung đặc tính hợp nhất không bình thường của nhân tố IS và Tn. Khi hợp nhất vào gen của chủ phagơ sẽ gây đột biến (Mu là viết tắt của mutator); bacteriophagơ Mu tác dụng như Tn khổng lồ. Các retrovirut động vật cũng có đặc tính tương tự. Chuyển chỗ là một bước cần thiết trong sự sinh sản dung giải của bacteriophagơ Mu, ADN của phagơ Mu không sao chép bên ngoài genom vi khuẩn. Một đặc tính đáng chú ý nữa gặp ở bacteriophagơ Mu là sự đảo ngược gen. Quá trình này dựa vào sự tái tổ hợp đặc hiệu vị trí, tác dụng lên sự chuyển hướng của một đoạn ADN riêng rẽ bên trong genom của phagơ. Sự đảo ngược cần đoạn G của bacteriophagơ Mu. Đoạn G đọc mã cho các protein tổng hợp sợi đuôi. Nếu đoạn này nằm theo hướng G^+ các protein đuôi S và U sẽ được tạo thành và phagơ nhiễm *E. coli* K12. Nếu đoạn đảo ngược theo hướng G^- một promotor khác sẽ hoạt động và sợi ADN đối diện được sử dụng, sợi này phiên mã các gen S' và U' mà sản phẩm của chúng tạo thành một protein đuôi làm thay đổi phổ vật chủ của phagơ. Nhờ vậy phagơ có thể hấp thụ vào các tế bào của *E. coli* C và các vi khuẩn đường ruột khác. Sự đảo ngược gen cũng gặp ở *Salmonella* và ở đây nó liên quan đến sự thay đổi tổng hợp tiên mao.

7. SỰ BIẾN NẠP

Sự chuyển gen qua ADN giải phóng từ một vi khuẩn cho hoặc được chiết rút từ vi khuẩn này sang một vi khuẩn nhận được gọi là biến nạp.

Các tế bào ở trạng thái có thể được biến nạp bởi ADN trong môi trường được gọi là khả nạp (competent). Đặc tính này gặp ở các chi *Acinetobacter*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Haemophilus*, *Mycobacterium*, *Neisseria*, *Pseudomonas*, *Streptococcus* và *Synechococcus*. Trạng thái khả nạp do các gen nhiễm sắc thể độc mã và được kích thích bởi một số điều kiện môi trường. Những vi khuẩn như vậy được coi là có khả năng chịu sự biến nạp tự nhiên. Nhiều vi khuẩn khác không trở nên khả nạp dưới điều kiện nuôi cấy bình thường nhưng có thể thu được đặc tính trên qua việc xử lý nhân tạo như ủ tế bào trong dung dịch các cation hóa trị hai với nồng độ cao. Đây là các hệ thống biến nạp nhân tạo.

Hai hệ thống biến nạp tự nhiên ở vi khuẩn đã được nghiên cứu kĩ và thể hiện nhiều khác biệt đó là *Streptococcus pneumoniae* và *Haemophilus influenzae*. Cho tới gần đây, kiểu biến nạp ở *S.pneumoniae* được coi là điển hình cho các vi khuẩn G^+ có khả năng biến nạp tự nhiên và kiểu biến nạp ở *H.influenzae* là điển hình cho các vi khuẩn G^- có khả năng trên. Tuy nhiên, sự thực không hẳn như vậy. Việc nghiên cứu biến nạp tự nhiên của plasmid cho thấy sự khác biệt trong cơ chế biến nạp không nhất thiết tương ứng với tính chất của thành tế bào phát hiện bởi phản ứng nhuộm Gram.

Các tế bào trong quần thể *S.pneumoniae* nhanh chóng trở nên khả nạp trong pha sinh trưởng lũy thừa. Sự chuyển hóa này được xúc tác bởi một protein nhỏ gọi là yếu tố khả nạp. Yếu tố này được tổng hợp và tiết thường xuyên vào môi trường bởi tế bào *S.pneumoniae* nhưng chỉ khi mật độ quần thể tế bào, nồng độ của yếu tố khả nạp trong môi trường tăng tới giá trị nhất định, tính khả nạp mới phát triển. Khoảng 12 protein được tổng hợp và thực hiện quá trình biến nạp. Nhờ những protein này mà các tế bào khả nạp có thể hấp thụ ADN sợi kép vào bề mặt ngoài ở một số vị trí và phân giải nó thành các đoạn nhỏ hơn nhờ tác dụng của các enzym liên kết bề mặt. Sau đó một sợi của đoạn bị nucleaza phân hủy còn sợi kia xâm nhập tế bào ngay khi còn đang gắn vào một protein liên kết ADN đặc hiệu cho khả nạp.

S.pneumoniae hấp thụ và chế biến ADN từ bất kì nguồn nào chẳng hạn, ADN từ tinh trùng cá hồi hay từ một tế bào *S.pneumoniae* khác đều được hấp thụ như nhau. Tuy nhiên, chỉ nếu ADN là tương đồng với genom của vi khuẩn nhận nó mới được hợp nhất vào và từ đó làm thay đổi di truyền của tế bào này.

Sự hợp nhất của ADN tương đồng diễn ra qua quá trình thay thế sợi tạo thành sản phẩm trung gian là một vùng sợi kép dị nguyên: một sợi của vùng này là sợi mới xâm nhập còn sợi kia là vùng tương đồng của genom vi khuẩn nhận. Do nguồn gốc khác nhau mà 2 sợi bao gồm sợi kép dị nguyên không nhất thiết giống nhau, trong đó có những vùng của sợi này không được duy trì nhờ liên kết hidro. Những vùng này có thể bị loại bỏ và thay thế bằng các bazơ bổ sung đối với ADN thể nhận.

Sự chuyển nạp ở vi khuẩn G^- *H.influenzae* khác ở vi khuẩn G^+ nói trên một số điểm cơ bản. Tế bào trở nên khả nạp không phải do tổng hợp yếu tố khả nạp mà là do hậu quả của sự sinh trưởng. Hơn nữa, chỉ ADN tương đồng (từ cùng một loài hoặc từ một loài rất thân thuộc của *Haemophilus* được hấp thụ và xâm nhập tế bào, ADN này ở dạng sợi kép cho tới khi hợp nhất vào genom của vi khuẩn nhận.

Màng ngoài của tế bào khả nạp chứa trung bình 10 cấu trúc dạng túi là những nếp gấp của màng ngoài, ở gốc của mỗi túi có những lỗ nhỏ. Bên trong mỗi túi có một protein liên kết đặc biệt với một thứ tự ADN gồm 11 cặp bazơ gấp ở 600 vị trí trên genom.

Ngay sau khi ADN tương đồng được bổ sung vào quần thể vi khuẩn khả nạp các túi hướng ra ngoài biến mất và xuất hiện các túi hướng vào trong. Có lẽ sự liên kết ADN tương đồng trên bề mặt túi làm túi bị gấp khúc, giữ ADN ở bên trong tạo thành một cấu trúc gọi là transformaxom. ADN bên trong transformaxom khi đi qua tế bào chỉ được chuyển thành dạng sợi đơn ngay trước khi tái tổ hợp với genom thể nhận.

Tế bào *H.influenzae* khả nạp có thể hấp thụ các plasmit nguyên vẹn nếu plasmit chứa thứ tự 11 cặp bazơ phù hợp. Tuy nhiên tế bào khả nạp của *B. subtilis* được biến nạp bởi ADN nhiễm sắc thể như ở *S.pneumoniae* thì bao giờ cũng phân cắt plasmit khi chúng xâm nhập tế bào và chuyển chúng thành sợi đơn. Các plasmit dạng đường thẳng không có khả năng sao chép, chúng chỉ có thể trở thành một bộ phận di truyền của genom tế bào nhận nếu chúng lại được đóng vòng bên trong tế bào, sự đóng vòng lại này tùy thuộc vào điều kiện là giữa plasmit và genom nhận có vùng tương đồng hay không. Nếu bên trong vùng tương đồng này diễn ra sự phân cắt thì sự ghép đôi của vùng với genom nhận sẽ mang các đầu lại gần nhau khiến cho plasmit vòng sợi kép có thể được tái tạo nhờ ADN - polimeraza và ligaza.

Ở các vi khuẩn khả nạp tự nhiên tính trạng được biến nạp là tính kháng độc tố và tính nguyên dưỡng đối với axit amin. Sự khả nạp phụ thuộc vào trạng thái sinh lý của tế bào và pha sinh trưởng. Tế bào khả nạp có bề mặt tế bào thay đổi, thành tế bào xốp và chúng có hoạt tính cao của các enzym ngoại bào, đồng thời tạo thành yếu tố khả nạp tiết vào môi trường. Nồng độ ADN cần cho sự chuyển nạp rất nhỏ: chỉ 0,1 $\mu\text{g/ml}$ huyền dịch tế bào đủ để chuyển nạp 5% quần thể tế bào nhận.

Ở các vi khuẩn bình thường không có khả năng biến nạp tính khả nạp có thể được cảm ứng trong điều kiện phòng thí nghiệm nhờ xử lý tế bào bằng một phương pháp. Chẳng hạn, với *E. coli* có thể xử lý bằng CaCl_2 và bảo quản trong lạnh.

Với các vi khuẩn G^+ thuộc chi *Bacillus* và *Streptomyces* việc sử dụng các thể nguyên sinh chất để biến nạp có ý nghĩa thực tế rõ rệt. Ở các vi khuẩn này, sự hấp thụ ADN plasmit cảm ứng với polietilenglicol được thực hiện qua các thể nguyên sinh chất thiếu vách, hay trong trường hợp chuyển ADN nhiễm sắc thể qua sự dung hợp trực tiếp của các thể nguyên sinh chất. Các thể nguyên sinh chất đã dung hợp, kết hợp genom của cả hai tế bào bố mẹ, có thể tái sản thành các tế bào nguyên vẹn dưới các điều kiện thực nghiệm xác định. Các thể tái tổ hợp xuất hiện từ sự dung hợp như trên mang tính trạng của cả hai bố mẹ nhờ quá trình tái tổ hợp tương đồng.

Gần đây, phương pháp xung điện có hiệu quả cao đã được đưa vào sử dụng. Phương pháp này tạo cho các màng sinh học dễ thấm và dễ dung hợp nhờ sự kích thích của một điện trường, đã được ứng dụng lần đầu tiên cho các tế bào nhân thật như lai các tế bào thực vật. Tuy nhiên nhiều ADN plasmit của vi khuẩn Gram dương cũng như Gram âm cũng có thể được chuyển nạp nhờ xung điện.

8. TÀI NẠP

Tài nạp là sự chuyển ADN từ tế bào cho sang tế bào nhận nhờ phagơ. Thường chỉ một đoạn nhỏ ADN chủ được chuyển. Có hai loại tài nạp và trong cả hai trường hợp phagơ tài nạp thường bị khuyết tật, ví dụ mất khả năng dung giải tế bào chủ. Tài nạp gặp ở các loài của *Salmonella*, *Escherichia*, *Shigella*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Vibrio* và *Rhizobium*. Tuy nhiên không phải tất cả các phagơ đều có thể tài nạp và tất cả vi khuẩn đều được tài nạp.

8.1. Tài nạp không đặc biệt (tài nạp phổ biến)

Là kiểu tài nạp trong đó một đoạn bất kì của ADN chủ được lắp thêm vào hoặc thay thế hoàn toàn genom của phagơ.

Tài nạp không đặc biệt được Lederberg và Linder phát hiện năm 1951 ở *S. typhimurium*. Chúng cho B^+ được nhiễm phagơ ôn hòa P22. Sau khi tế bào chủ bị dung giải các phagơ được tách riêng và được ủ với chủ nhận B^- khác B^+ ít nhất một đặc tính di truyền. Khi cấy gọt trên môi trường chọn lọc, nhận thấy một số thể tái tổ hợp thể hiện tính trạng của B^+ . Tại sao vậy ?

Khi phagơ P22 nhân lên trong chúng cho B^+ , ADN của tế bào bị cắt thành các đoạn, một vài đoạn nào đó có thể được bao bọc bởi vỏ capsit của phagơ. Hỗn dịch sẽ chứa cả phagơ bình thường và phagơ khuyết tật. Việc nhiễm một chủng nhận B^- với một phagơ bình thường thường dẫn đến sự dung bào. Nhưng một số tế bào nhận phagơ tài nạp khuyết tật có ADN tái tổ hợp với genom của thể nhận. Các đoạn tương đồng trao đổi có thể dẫn đến sự thay thế một gen khuyết tật trong thể nhận bằng một gen nguyên vẹn của thể cho. Vì chỉ một đoạn nhỏ ADN được tài nạp nên xác suất tái tổ hợp của một tính trạng nhất định chỉ khoảng $10^{-6} - 10^{-8}$. Do đó, với phagơ P 22 của *Salmonella* cũng như phagơ P1 của *E. coli*, trong mỗi trường hợp, chỉ một tính trạng hoặc các gen nằm rất gần nhau có thể được tài nạp. Lượng ADN tương ứng với ADN của phagơ chỉ bằng 1 - 2% ADN của vi khuẩn. Ngoại lệ là phagơ PBS1 của *B. subtilis* có thể tài nạp tới 8% genom của chủ

8.2. Tài nạp đặc biệt

Trong trường hợp này chỉ các đoạn ADN xác định được chuyển, ở đây một số gen của phagơ được thay thế bằng một số gen của chủ. Chẳng hạn, phagơ lambda thường chỉ tài nạp các gen *gal* và *bio*.

Nếu phagơ tài nạp nhiễm một tế bào nhận bị khuyết tật, chẳng hạn ở gen *gal* (gal^-), tái tổ hợp có thể xảy ra qua trao đổi gen gal^- bằng gen tài nạp gal^+ . Các thể tái tổ hợp hoặc các thể tài nạp tạo thành sẽ là gal^+ .

Việc chuyển gen bởi phagơ Phi 80 cũng tương tự : phagơ lắp vào cạnh các gen *trp* mã cho các enzym tổng hợp triptophan, do đó thích hợp cho việc chuyển các gen *trp*.

So với tài nạp không đặc biệt thì sự xen kẽ của phagơ vào genom chủ trong tài nạp đặc biệt là tiền đề cho việc chuyển ADN đạt hiệu quả.

Trong một số trường hợp đoạn ADN tài nạp không tái tổ hợp mà nằm ngoài nhiễm sắc thể của thể nhận : tế bào là dị hợp tử về tính trạng được chuyển ADN chuyển tuy được phiên mã nhưng không được sao chép. Vì vậy, khi phân bào đoạn ADN của thể cho chỉ được phân vào một tế bào con. Những tế bào đó được gọi là thể tài nạp

khuyết. Nếu thể nhận là trợ dưỡng và đoạn ADN của thể cho bổ sung có tính trạng này thì chỉ những tế bào di truyền tiếp đoạn ADN nói trên mới có thể sinh trưởng và tạo thành các khuẩn lạc rất nhỏ trên môi trường thạch.

8.3. Tiếp hợp

Tiếp hợp là sự chuyển ADN qua tiếp xúc trực tiếp giữa hai tế bào vi khuẩn, sự chuyển là định hướng từ tế bào cho (đực) sang tế bào nhận (cái).

Tế bào cho chứa một yếu tố ADN có thể di chuyển gọi là plasmit giới tính F (fertility). Những tế bào thiếu plasmit F (F^-) chỉ có thể dùng làm thể nhận. Khi tiếp hợp plasmit F được chuyển với xác suất 100% nhưng không tính trạng nào của nhiễm sắc thể được chuyển. Plasmit F có thể hợp nhất vào nhiễm sắc thể và khi tiếp hợp ADN của nhiễm sắc thể sẽ được chuyển từ vi khuẩn cho sang vi khuẩn nhận với tần độ cao hơn hàng ngàn lần so với dùng chủng F^+ . Vì vậy chúng được gọi là các tế bào Hfr (high frequency of recombinants = tần số cao của các thể tái tổ hợp). Cũng như phage lambda, F lắp vào nhiễm sắc thể ở vị trí xác định, F lắp vào nhiễm sắc thể chủ theo kiểu thuận nghịch, và, khi tách ra, nếu không chính xác nó sẽ kéo theo một đoạn ADN chủ tạo thành plasmit F'. Tế bào chứa plasmit F' gọi là tế bào F' .

Plasmit F là phân tử ADN sợi kép, vòng kín, kích thước khoảng 10^5 bazơ, có khả năng tự sao chép độc lập với nhiễm sắc thể. Plasmit F chứa các gen cần cho sự tiếp hợp và các gen xác định tiêm mao giới tính F. Nó có một số đặc tính chung với các plasmit khác như chứa một số gen cho phép sao chép trong tế bào, thể hiện hiện tượng không tương hợp do vòng inc quy định, nghĩa là nếu một plasmit đã có mặt trong tế bào thì việc sao chép của các plasmit thân thuộc sẽ bị kìm hãm. Plasmit F thuộc nhóm không tương hợp gọi là Inc F1.

Không phải tất cả các plasmit đều đọc mã cho tính trạng tự chuyển như plasmit F và một số plasmit khác, được gọi chung là các plasmit tiếp hợp. Trong trường hợp của plasmit F sự chuyển ADN được đọc mã bởi 13 gen và diễn ra qua 4 bước: 1. Bên trong vùng khởi đầu sao chép (oriT) diễn ra việc bẻ vỡ một sợi đơn; oriT là một đoạn ADN 373 cặp bazơ được nhận ra bởi các protein liên kết ADN xác định và khác với vùng khởi đầu sao chép sinh dưỡng (ori); 2. Từ oriT ADN được cởi xoắn theo hướng $5' \rightarrow 3'$; quá trình được xúc tác bởi 2 protein đặc trưng cho sự chuyển và cần ATP; 3. Đầu $5'$ tự do di chuyển qua một lỗ gần hai tế bào cho và nhận vào tế bào nhận; 4. Đồng thời, trong tế bào cho, ở đầu $3'$ sợi kép bổ sung được tổng hợp liên tục theo cơ chế vòng xoay. Việc tổng hợp sợi kép trong tế bào nhận diễn ra theo kiểu gián đoạn trên đoạn mồi (primer) ARN.

Ngoài *E. coli* các plasmit tiếp hợp cũng gặp ở nhiều vi khuẩn G^- khác, và ở nhiều chi vi khuẩn G^+ như *Bacillus*, *Clostridium*, *Nocardia*, *Staphylococcus*, *Streptococcus* và *Streptomyces*. Một nhóm plasmit tiếp hợp từ *S. faecalis* (được chuyển với hiệu quả cao) đọc mã cho một pheromon giới tính đảm nhiệm chức năng của một tín hiệu giao phối đặc biệt. Pheromon giới tính kích thích tổng hợp một chất ngưng kết trong vi khuẩn cho plasmit. Chất này được coi như chất kết dính liên kết tế bào cho với tế bào nhận và dẫn đến sự kết vón hai loại tế bào.

Nhiều plasmit có phổ chủ khá hẹp chỉ có thể sao chép trong các loài rất gần gũi. Tuy nhiên cũng có những plasmit thể hiện phổ chủ tương đối rộng. Trong số các vi khuẩn G^- plasmit kháng, tiếp hợp RP4 thuộc nhóm IncP1 và plasmit kháng không tiếp hợp RSF 1010 thuộc nhóm IncQ là những plasmit có đặc tính trên. Các plasmit đầu

cho tính kháng ampicilin, kanamixin và tetraxiclin cũng như kim loại nặng telur, các plasmit sau cho tính kháng streptomixin và sunphonamit.

Các plasmit với phổ chủ rộng trong nhóm vi khuẩn Gram dương còn ít được biết. Tuy nhiên từ *S. faecalis* người ta đã phân lập được một plasmit tiếp hợp có thể sao chép trong nhiều loài của *Staphylococcus*, *Bacillus* và *Lactobacillus*. Plasmit lớn 2,9 kb pC194 từ *S. aureus* có phổ chủ khá rộng bao gồm các vi khuẩn G⁺ như *B. subtilis*, vi khuẩn G⁻ như *E. coli*, thậm chí cả tế bào nhân thật như *S. cerevisiae*.

Các plasmit tiếp hợp có thể giúp cho các plasmit không tiếp hợp chuyển từ tế bào cho sang tế bào nhận. Quá trình này được gọi là sự huy động plasmit và có thể :

1. Plasmit không tiếp hợp nhưng có thể huy động được chuyển đồng thời với plasmit tiếp hợp mà không có sự liên kết với nhau. 2. Sự tương tác vật lý giữa 2 phân tử plasmit qua tái tổ hợp là cần thiết, dạng đồng hợp nhất xuất hiện sẽ đi vào tế bào nhận và ở đây, có thể nó lại được tách thành 2 plasmit ban đầu. Plasmit Col E1 có thể huy động độc mã trong các vùng mob 3 protein huy động cần thiết cho việc chuyển của Col E1.

Các plasmit đường thẳng ít gặp ở prokaryota. Cho tới nay chúng mới chỉ được phát hiện ở *Streptomyces*, *Streptococcus* và *Nocardia opaca*. Bằng cách nào ADN của chúng tránh được sự phân giải của exonucleaza ta còn chưa rõ.

Ý nghĩa sinh học của plasmit :

Các tính trạng độc mã bởi plasmit thường cung cấp cho tế bào chủ ưu thế sinh trưởng và nhờ đó mà các tế bào này thu được ưu thế chọn lọc.

Plasmit kháng. Các vi khuẩn kháng kháng sinh được phân lập đầu tiên vào những năm 1950 ở Nhật và thuộc các chủng của trực khuẩn lỵ *Shigella* phân lập từ các bệnh nhân được điều trị bằng kháng sinh. Đáng chú ý là, các vi khuẩn này thể hiện tính kháng đa thuốc và được chuyển từ vi khuẩn này sang vi khuẩn kia kể cả *E. coli* qua sự tiếp xúc tế bào đơn giản. Ngày nay ta đã biết được các gen của plasmit R giúp cho vi khuẩn chủ kháng với sunphonamit, streptomixin, cloramphenicol, kanamixin và tetraxiclin. Một số plasmit R cho tính kháng với 8 kháng sinh, số khác cho tính kháng với các kim loại nặng, độc như bạc, niken, coban, cadimi, đồng, kẽm, crom, asen, antimon, telur hoặc thủy ngân. Các plasmit R thường là tiếp hợp hoặc có thể huy động. Một số plasmit R có phổ chủ rộng và có thể được chuyển giữa một số chi vi khuẩn khác nhau, thuận lợi cho sự phổ biến của chúng. Cùng với sự chuyển của plasmit R một số gen nhiễm sắc thể cũng được chuyển, rõ ràng các gen này được huy động bởi plasmit R.

Có 2 cơ chế kháng kháng sinh : kháng do plasmit độc mã và kháng do nhiễm sắc thể độc mã. Chẳng hạn, tính kháng streptomixin do nhiễm sắc thể dựa vào sự thay đổi của hạt riboxom 30S. Trái lại, tính kháng streptomixin do plasmit lại dựa vào sự biến đổi chất kháng sinh này nhờ enzym (streptomixin bị adenyl hóa). Tính kháng do plasmit đối với một số chất kháng sinh khác cũng dựa vào sự biến đổi hóa học xúc tác bởi enzym : cloramphenicol bị axetyl hóa, kanamixin và neomixin bị photphoryl hóa hoặc axetyl hóa, còn penixilin bị phân giải bởi penixilinaza. Vì các chất kháng sinh thường được đưa vào sử dụng trong điều trị bệnh, đặc biệt ở các bệnh viện, nên đã diễn ra sự phổ biến plasmit R trong số các vi khuẩn gây bệnh và sự chọn lọc, tích lũy các vi khuẩn kháng kháng sinh.

0.149
Từ đất và nước chứa hoặc nhiễm các muối kim loại nặng người ta đã phân lập được một số vi khuẩn kháng kim loại. Tính kháng kim loại có thể được đọc mã bởi plasmit hoặc bởi nhiễm sắc thể. Cơ chế của tính kháng kim loại có lẽ dựa vào sự xuất thải nhờ ATP-aza hay sự nghịch chuyển các ion độc xâm nhập tế bào.

Nhiều vi khuẩn tạo thành các protein có khả năng giết chết hoặc kìm hãm sinh trưởng của các loài thân thuộc. Các protein có tác dụng đặc hiệu này được gọi là bacterioxin và do plasmit độc mã; bacterioxin đã được phân lập từ *E.coli* (colixin), *P.aeruginosa* (pioxin), *B.megaterium* (megaxin)... Cơ thể người và động vật thường xuyên tiết ra nhiều chất có thể dùng làm chất dinh dưỡng cho các vi sinh vật. Mặt khác, đây là môi trường tương đối ổn định, do đó tạo nên các tiền đề lí tưởng cho sự phát triển của nhiều vi sinh vật. Nhiều vi khuẩn đóng vai trò có ích thậm chí cần thiết cho sự phát triển của các sinh vật bậc cao. Tuy nhiên, bên cạnh các vi khuẩn có ích này cũng có nhiều vi khuẩn có hại cho cơ thể chủ. Trong quá trình tiến hóa, người và động vật đã phát triển một số hàng rào ngăn cản sự xâm nhập và sự sinh sản của các vi khuẩn gây bệnh, chẳng hạn da, hệ thống miễn dịch và các yếu tố trong máu. Các vi sinh vật có khả năng xâm nhập vì chúng có các yếu tố gây bệnh và các yếu tố độc tính. Nhiều trong số các yếu tố này là do plasmit độc mã. Cũng vì vậy mà các yếu tố trên được phổ biến nhanh chóng. Các yếu tố xâm thực cho phép vi sinh vật phát triển mạnh mẽ trên bề mặt các màng nhầy. Invasin, do plasmit độc mã giúp cho *Shigella flexneri* xâm nhập tích cực vào các tế bào biểu mô ruột. Enterotoxin (độc tố ruột), thể hiện tác dụng độc trong đường ruột và gây ỉa chảy, thường cũng được đọc mã bởi plasmit. Hemolizin có tác dụng dung giải hồng cầu. Ở nhiều chủng *E. coli* gây bệnh các yếu tố xác định di truyền của chúng cũng nằm trên plasmit. Đối với các vi khuẩn đường ruột gây bệnh khả năng sử dụng ion sắt là tiền đề quan trọng cho sự xâm nhập của chúng vào các tế bào và mô. Chính các siderophor liên kết sắt như aerobactin cũng được đọc mã bởi plasmit.

Plasmit cũng có chức năng gây bệnh ở thực vật, chẳng hạn plasmit gây u ở *Agrobacterium tumefaciens*. Tác dụng diệt sâu (độc tố BT) của thể vùi chứa protein ở *B.thuringiensis* cũng được đọc mã bởi gen nằm trên một plasmit lớn khoảng 100kb*.

Plasmit cũng có thể mang các gen thực hiện các phản ứng sinh hóa đặc biệt, trước hết là các gen xúc tác sự phân giải các chất được tổng hợp bằng con đường hóa học, không tồn tại trong sinh quyển, chẳng hạn các hợp chất thơm và dị vòng với gốc halogen thay thế, các chất này chỉ có thể được khoáng hóa bởi một số vi khuẩn chuyên hóa. Trong số các chất trên, đáng chú ý là các chất diệt cỏ, chất trừ nấm và chất diệt côn trùng là các chất chỉ bị phân giải bởi các vi khuẩn mang plasmit dị hóa.

Ngoài ra còn có các plasmit khác, mang gen chịu trách nhiệm các phản ứng trao đổi chất phức tạp như cố định N_2 , tạo thành nốt sần, tổng hợp axit indolaxetic và diaxetin, vận chuyển đường và các ion kim loại (nicken), tổng hợp hidrogenaza cũng như các enzym của quá trình phân nitrat hóa. Các plasmit "trao đổi chất" này thường là các phân tử khổng lồ, kích thước khoảng 300 - 1200 kb và được gọi là các mega-plasmit. Các hệ thống hạn chế và cải biến bảo vệ vi khuẩn khỏi sự xâm nhập của ADN lạ cũng có thể do plasmit độc mã. Chẳng hạn, ở một số chủng, các gen nói trên nằm trên nhiễm sắc thể, ở một số khác, lại nằm trên plasmit. Điều này gặp ở các chủng khác nhau của cùng một loài vi khuẩn cũng như của các vi khuẩn rất gần gũi về chủng loại phát sinh. Sự định vị khác nhau của gen chúng ta gen hoặc toàn bộ phức hệ gen giữa nhiễm sắc thể và plasmit đã được trao đổi và plasmit đóng vai trò quan trọng trong sự tiến hóa của các genom nhân nguyên thủy.

*kb = kilobazơ; 1kb = 1000 bazơ

Một số plasmit dị hóa

Chất	Tên gọi plasmit	Tế bào chủ
Toluol	TOL	<i>Pseudomonas putida</i>
Naftalin	NAH	<i>P.putida</i>
Axit 2,4 - diclo - phenoxi - axetic	2,4 - D	<i>Acinetobacter, Alcaligenes, Arthrobacter, Corynebacterium,</i>
n-Alkan	OCT	<i>Pseudomonas...</i>
Salixilat	SAL	<i>P.putida, P.aeruginosa</i>
Terpen	CAM	<i>P.putida</i>
Nicotin	NIC	<i>P.putida</i> <i>Arthrobacter oxydans</i> <i>P.convexa.</i>

9. SỰ HẠN CHẾ VÀ CẢI BIẾN

Nói chung, phagơ sinh sản trong một số chủng *E. coli* này lại không thể sinh sản trong một số chủng khác. Sự hạn chế này chính là do các enzym của vi khuẩn đã nhận ra những vị trí đặc biệt trên ADN "lạ" của phagơ và cắt chúng, trong khi đó ADN của tế bào được bảo vệ nhờ sự cải biến bởi enzym và do đó không bị các enzym hạn chế nhận ra.

Hệ thống hạn chế và cải biến khá phổ biến ở vi sinh vật. Một mặt nó dùng để đánh dấu ADN của tế bào, mặt khác nó phân hủy ADN lạ xâm nhập. Hệ thống gồm 2 hoạt tính enzym: một endonucleaza và một metyltransferaza tồn tại trên một protein duy nhất hay trên hai protein khác nhau. Cả hai thể hiện hoạt tính ở một đoạn ADN xác định thứ tự phân biệt. Trong trường hợp của ADN tế bào, thứ tự này được cải biến hóa học nhờ metyltransferaza qua phản ứng metyl hóa adenin ở vị trí N-6 và xitizin ở các vị trí N-5 và N-4 hoặc trong trường hợp của ADN lạ thì thứ tự trên bị cắt bởi endonucleaza qua sự thủy phân liên kết photphodiester. Một thứ tự nucleotit xác định bao giờ cũng chỉ là cơ chất cho một trong 2 hoạt tính. Metyltransferaza cải biến ADN của tế bào trong khi sao chép, sản phẩm của nó là một sợi kép ADN bởi sợi đơn ADN được metyl hóa. Sau đó hoạt tính endonucleaza được kích thích khi trong tế bào xuất hiện ADN không bị cải biến, là cơ chất thích hợp cho enzym này.

9.1. Các endonucleaza hạn chế

Các endonucleaza hạn chế được đọc mã không chỉ bởi genom vi khuẩn mà còn bởi phagơ và plasmit. Hai loại enzym trên đã được nghiên cứu và cả hai đều cắt ADN sợi kép. Loại I nhận ra trình tự ADN đặc biệt, cắt ADN ở những vị trí tùy tiện xa vị trí nhận biết, chẳng hạn endonucleaza của phagơ P1. Ở loại II, vị trí cắt nằm bên trong vùng nhận, thể hiện sự đối xứng quay kép (2 sợi có cùng trình tự đọc khi theo cùng một sự phân cực). Kết quả là xuất hiện những đoạn ADN xác định. Enzym loại II được sử dụng trong kĩ thuật tạo dòng phân tử, đại diện là EcoRI có trình tự nhận gồm 6 cặp bazơ thể hiện sự đối xứng quay kép (palindrom).

Bảng 9 - 2 : Một số endonucleaza hạn chế

Nguồn gốc enzym	Tên gọi	Thứ tự nhận biết
<i>Escherichia coli</i> RY 13	EcoRI	$ \begin{array}{c} 5' - G \downarrow A \mid A^* - T - T - X - 3' \\ 3' - X - T \mid T - A^* - A - G - 5' \end{array} $
<i>Haemophilus haemolyticus</i>	HhaI	$ \begin{array}{c} 5' - G - X^* \mid G \downarrow X - 3' \uparrow \\ 3' - X - G \mid X^* - G - 5' \end{array} $
<i>Brevibacterium albidum</i>	BalI	$ \begin{array}{c} \uparrow \\ 5' T - G - G \downarrow X^* - X - A - 3' \\ 3' A - X - X^* - G - G - T - 5' \end{array} $
<i>Haemophilus aegypticus</i>	HaeIII	$ \begin{array}{c} \uparrow \\ 5' - G - G \mid X^* - X - 3' \\ \vdots \\ 3' - X - X^* \mid G - G - 5' \\ \uparrow \end{array} $

Chú thích : Mũi tên chỉ vị trí cắt của enzym ; đường --- là trục quay của thứ tự nhận biết và ngôi sao chỉ vị trí metyl hóa.

Mặc dù một số endonucleaza hạn chế cắt cả hai sợi ADN ở cùng vị trí bên trong thứ tự đặc biệt và vì vậy tạo thành các đoạn ADN với đầu tù, số khác cắt mỗi sợi ở vị trí khác nhau tạo thành các đoạn ADN với đầu dính. Các đầu sợi đơn bổ sung này có thể nối với nhau nhờ liên kết hidro, sau đó nhờ enzym ligaza cùng với ATP, các liên kết đường - photphat bị bể vỡ sẽ được hàn gắn.

9.2. Kiến trúc các plasmit tái tổ hợp

Nếu 2 loại ADN được xử lý với cùng một endonucleaza hạn chế thì mỗi ADN sẽ có các đầu dính giống nhau và 2 ADN này có thể được nối với nhau tạo thành một loại ADN duy nhất. Ta có thể tạo nên các plasmit chứa 2 loại ADN khác nhau gọi là plasmit tái tổ hợp.

Cũng có thể lắp một gen của nhân thật (chẳng hạn gen từ ếch) vào một plasmit nhưng trước hết phải thu được mARN từ gen này. Muốn vậy, sau khi có pre - tARN, phải tiến hành loại bỏ các intron và ghép nối các exon. Nhờ enzym phiên âm ngược ta sẽ thu được ADN bổ sung có thể đưa vào plasmit và cuối cùng vào tế bào vi khuẩn.

9.3. Đưa các plasmit tái tổ hợp vào vi khuẩn nhận

Trước khi các plasmit có thể nhân lên, chúng phải được đưa vào tế bào nhận. Phương pháp thông thường là dùng biến nạp, tuy nhiên đa số vi khuẩn không dễ dàng tiếp nhận ADN plasmit. Để khắc phục khó khăn này, người ta đã xử lý tế bào nhận với $CaCl_2$ ở nhiệt độ thấp ($0 - 4^\circ C$ với *E.coli*) bổ sung ADN từ plasmit tái tổ hợp rồi đun nóng tế bào nhận (tới $42^\circ C$ với *E.coli*) để gây sốc nhiệt chung. Nhờ vậy tính thấm của vi khuẩn bị thay đổi, cho phép ADN xâm nhập tế bào ADN plasmit cũng có thể được tế bào hấp thu sau khi bị xử lý sốc điện (xung điện). Có lẽ các xung điện ngăn dẫn đến sự tạo thành các lỗ qua đó plasmit có thể khuếch tán vào tế bào nhận.

Cần chú ý rằng, ngay với phương pháp biến nạp nhờ $CaCl_2$ cũng chỉ một tỉ lệ nhỏ các tế bào trong quần thể nhận tiếp thu được plasmit mới. Để xác nhận các tế bào biến nạp chứa plasmit người ta dùng plasmit chứa gen kháng kháng sinh như kháng

tetraxiclin, ampicilin. Nếu các vi khuẩn nhận ban đầu miễn cảm với các kháng sinh trên thì sau đó chỉ những tế bào đã tiếp nhận ADN plasmit mới trở nên kháng kháng sinh. Khi hỗn hợp các vi khuẩn chứa và không chứa plasmit được cấy gạt trên môi trường thạch chứa chất kháng sinh, chỉ những vi khuẩn chứa plasmit mới tạo thành khuẩn lạc.

9.4. Sự nhân chuyển các plasmit tái tổ hợp

Một khi plasmit tái tổ hợp được đưa vào tế bào vi khuẩn, tế bào có thể sinh sản tạo thành một quần thể lớn các tế bào giống nhau gọi là một dòng. Vì plasmit là một vật chuyển nhờ đó một gen mới được đưa vào tế bào vi khuẩn mà plasmit được gọi là vectơ tạo dòng. Plasmit được coi là vectơ tạo dòng chủ yếu vì chúng được di truyền mà không cần hợp nhất vào nhiễm sắc thể vi khuẩn. Một số phage cũng được dùng làm vectơ nhưng ADN của chúng phải được hợp nhất vào nhiễm sắc thể vi khuẩn mới có thể được di truyền cùng progen vi khuẩn.

Với một số plasmit, việc đặt vào nồng độ thấp của cloramphenicol sẽ dẫn đến sự sao chép plasmit mất điều chỉnh khiến cho khoảng 100 bản sao của plasmit (và bất kì một gen mới nào mà nó mang) có thể được tổng hợp bởi mỗi tế bào vi khuẩn. Sự sao chép bất thường như vậy của plasmit được gọi là sự khuếch đại.

9.5. Ích lợi của kĩ xảo di truyền (genetic engineering) (*)

Kĩ xảo di truyền, hiện tại và tương lai có thể góp phần vào việc cải thiện sức khỏe, môi trường cung cấp thực phẩm và các mặt khác của đời sống chúng ta. Công nghiệp dược phẩm đã sản xuất một số chất dùng điều trị cho người như insulin của người, yếu tố sinh trưởng của người, chất hoạt hóa plasminogen của mô và urokinaza (dùng xử lí các cục máu), interferon và somatostatin (một hoocmon của não).

Các kĩ thuật mới dùng để phát triển vaccin đã xuất hiện từ kĩ xảo di truyền. Chẳng hạn, gen đối với một protein vô hại từ áo của virus gây bệnh lở mồm long móng được đưa vào một plasmit của *E. coli* và vi khuẩn chứa plasmit này sẽ tạo thành protein trên. Khi protein được chiết rút từ vi khuẩn và tiêm vào trâu, bò, nó sẽ kích thích việc sản xuất kháng thể trong động vật chống lại virus lở mồm long móng. Phương pháp thu nhận vaccin nói trên hoàn toàn tránh được nguy hiểm và khó khăn gặp ở phương pháp thông thường sản xuất vaccin bệnh lở mồm long móng, ở đây virus được nuôi trong phòng thí nghiệm, rồi được xử lí với các nhân tố phá hủy sự nhiễm nhưng không phá hủy tính sinh kháng nguyên (khả năng kích thích sự tạo thành kháng thể) của chúng.

Gần đây, vaccin chống virus viêm gan B cũng được thu nhận nhờ kĩ xảo di truyền. Tác nhân gây bệnh là virus HBV không thể nuôi cấy trong phòng thí nghiệm mà chỉ có thể thu nhận từ máu của những người và lợn hắc tinh tinh hoặc các động vật linh trưởng khác được nhiễm thực nghiệm. Nhưng các nguồn này không đủ cung cấp HBV cho việc thu nhận vaccin ở quy mô lớn.

Tuy nhiên, máu của những người bị nhiễm kinh niên chứa nhiều hạt nhỏ của một thành phần protein vô hại của virus. Protein này gọi là HBsAg có thể được chiết rút từ máu, được tinh chế và xử lí hóa học để phá hủy các virus sống nếu còn sót lại. Khi các hạt HBsAg được tiêm vào người, chúng kích thích tính miễn dịch chống lại

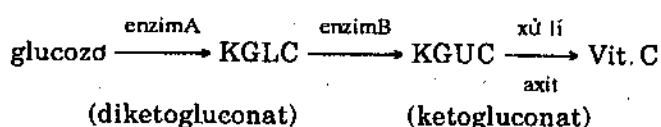
(*) Thuật ngữ này còn được dịch là Kĩ thuật di truyền, Công học di truyền.

virut nhiễm nguyên vẹn. Tuy nhiên, việc sản xuất các hạt HBsAg khá đắt tiền và không đủ cung cấp vì chúng chỉ được thu nhận từ những người bị nhiễm.

Năm 1982, nhờ kĩ xảo di truyền, gen đọc mã cho hạt HBsAg đã được đưa vào tế bào *Saccharomyces cerevisiae*. Nấm men đã biểu hiện gen và tạo thành các hạt HBsAg có thể được chiết rút sau khi tế bào bị phá vỡ. Vì tế bào nấm men sinh sản dễ dàng nên ta có thể thu nhận một số lượng không hạn chế các hạt HBsAg. Đây là vaccin đầu tiên chống lại một bệnh ở người được sản xuất nhờ kĩ xảo di truyền.

Người ta cũng đang nghĩ đến việc sản xuất vaccin chống lại bệnh AIDS bằng con đường tương tự. Bề mặt của virut AIDS chứa 2 protein bắt nguồn từ sự phân giải của một protein lớn là gp 160. Gen virut đọc mã cho gp 160 được lắp vào ADN của baculovirut là virut tấn công côn trùng. Khi các tế bào của mô côn trùng được nhiễm baculovirut tái tổ hợp, gen gp 160 đã được biểu hiện và protein gp 160 được tạo thành. Protein này đang được thử nghiệm ở người để xem nó có gây nên miễn dịch chủ động chống lại AIDS hay không.

Kĩ xảo di truyền cũng được dùng để cải thiện việc sản xuất công nghiệp các chất quan trọng. Vitamin C (axit ascorbic) là một ví dụ. Phương pháp hiện nay dùng để sản xuất vit.C dựa vào thứ tự các phản ứng sau :



Có thể sử dụng vi sinh vật để thực hiện 2 bước đầu tiên, nhưng đáng tiếc chưa phát hiện thấy vi sinh vật nào chứa cả 2 enzym trên, một số vi khuẩn tạo thành enzym A, số khác chỉ tạo thành enzym B, tuy nhiên, khi gen đọc mã cho enzym B được đưa vào một vi khuẩn có thể tổng hợp enzym A, vi khuẩn này có thể chuyển hóa glucozơ hoàn toàn thành KGUL, từ đó cung cấp một lượng vô hạn KGUL cho việc chuyển hóa thành axit ascorbic.

Kĩ xảo di truyền cũng giúp ích cho nông nghiệp. Trong nông nghiệp hiện đại người ta đang sử dụng các chủng *Pseudomonas syringae* và *P.fluorescens* được thay đổi về mặt di truyền để bảo vệ quả chống lại sương giá làm hư hại. Đây là các chủng vi khuẩn gắn bó với cây trồng. Các chủng bình thường tiết một protein cho phép tế bào tác dụng như một nhân để tạo thành tinh thể băng (nghĩa là tác dụng như các trung tâm cho việc mở đầu quá trình tinh thể hóa) làm hư hại cây cối. Nhờ kĩ thuật ADN tái tổ hợp, một phần của gen đọc mã cho protein tạo nhân đã bị loại bỏ. Khi dùng để chủng cho các cây ăn quả, các chủng vi khuẩn đã bị thay đổi nói trên có thể thay thế các chủng bình thường, nhờ vậy sẽ bảo vệ quả khỏi sự hư hại của sương giá. Nhờ kĩ xảo di truyền, tính kháng nhiệt và tính chịu hạn của cây trồng được tăng lên, từ đó nâng cao sản lượng thực phẩm trên phạm vi toàn cầu. Cũng tương tự, người ta đang tìm cách tạo ra các cây trồng có tính kháng côn trùng và các vi sinh vật gây bệnh. Việc tạo các vi khuẩn cố định nitơ có khả năng cộng sinh với các cây ngũ cốc sẽ làm tăng đáng kể sản lượng nông nghiệp, đặc biệt ở những vùng thiếu phân bón hóa học.

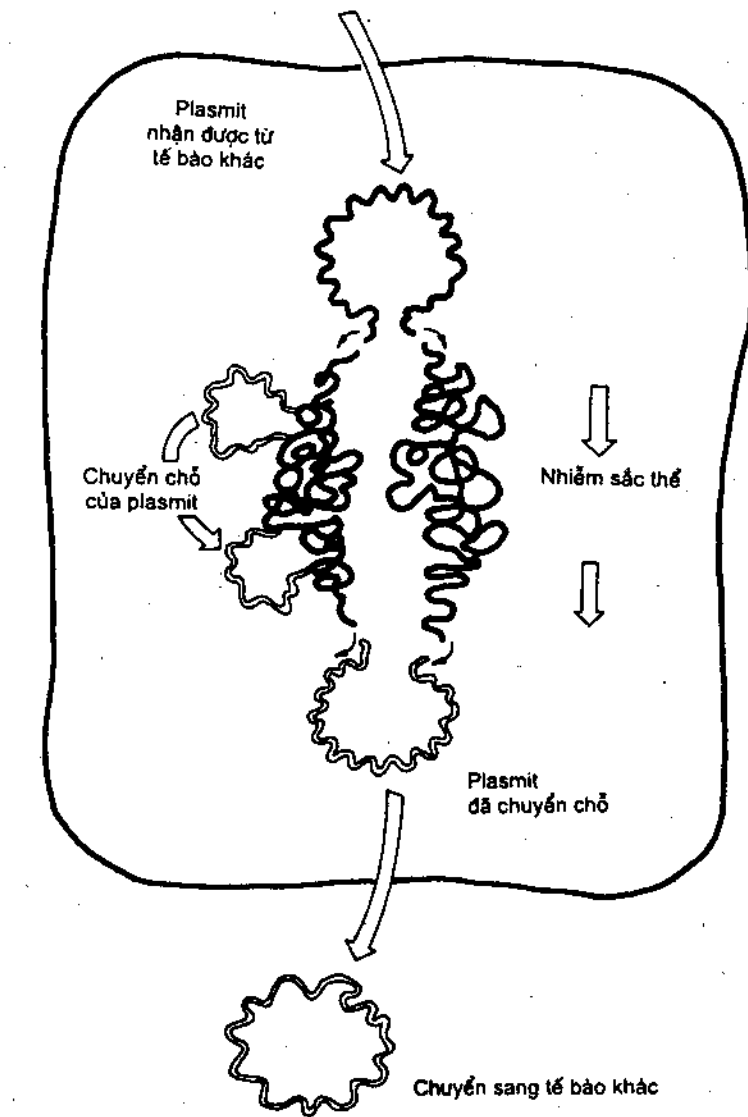
Kĩ xảo di truyền cũng có thể cung cấp các biện pháp mới cho việc bảo vệ môi trường. Chẳng hạn, một số vi khuẩn đã được chuyển ghép gen phân giải dầu hỏa nhằm

giải quyết các vụ đổ dầu ra biển. Công nghiệp phụ trách giải quyết sự ô nhiễm cũng như công nghiệp mỏ và thu hồi dầu cũng cần sự đóng góp của kĩ xảo di truyền.

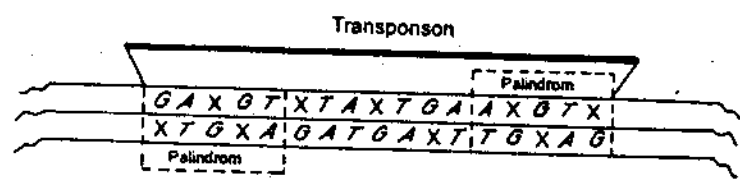
9.6. Sự rủi ro tiềm tàng của kĩ xảo di truyền

Việc chuyển gen từ các động vật sang vi khuẩn để tạo ra các cơ thể mới, không hề có trong tự nhiên. Các phân tử ADN tái tổ hợp hoạt động in vivo có thể gây nên những sự rủi ro sinh học, nếu chúng tồn tại trong vi sinh vật như *E.coli* sống trong đường ruột của người và có thể trao đổi thông tin di truyền với các vi khuẩn khác, chúng có thể phổ biến rộng rãi trong các quần thể của người, vi khuẩn, thực vật hoặc động vật với những hậu quả không thể lường trước.

Đặc biệt là việc kiến trúc các plasmit mới của vi khuẩn, nếu không được điều khiển một cách thận trọng sẽ có thể đưa gen kháng kháng sinh hoặc gen tạo thành độc tố vào các chủng vi khuẩn mà trước đó chúng không có. Các thí nghiệm liên kết toàn bộ hoặc một phần ADN từ các virus sinh u hay các virus khác vào các nhân tố ADN sao chép độc lập (các plasmit của vi khuẩn hay các ADN khác của virus) cũng đặt ra những rủi ro tương tự.



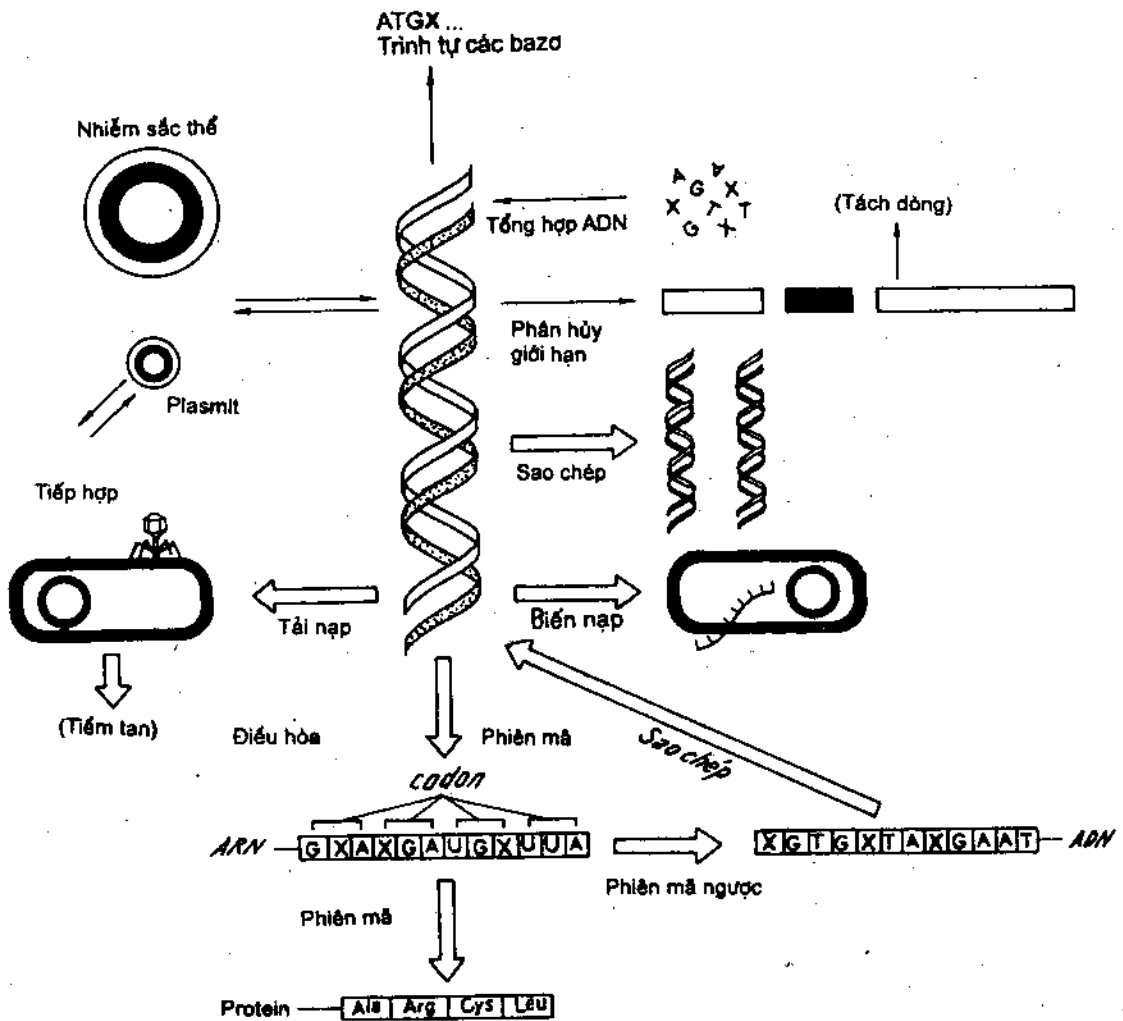
a)



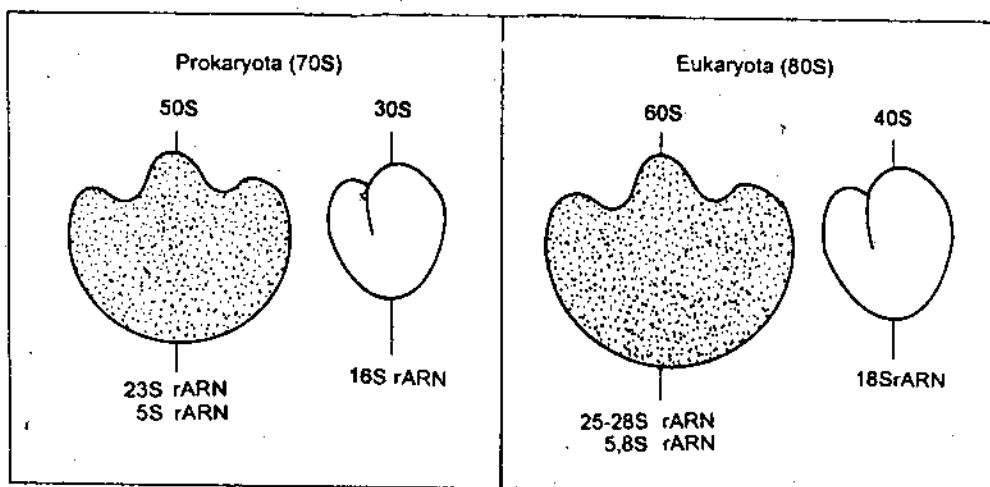
b)

Transposon

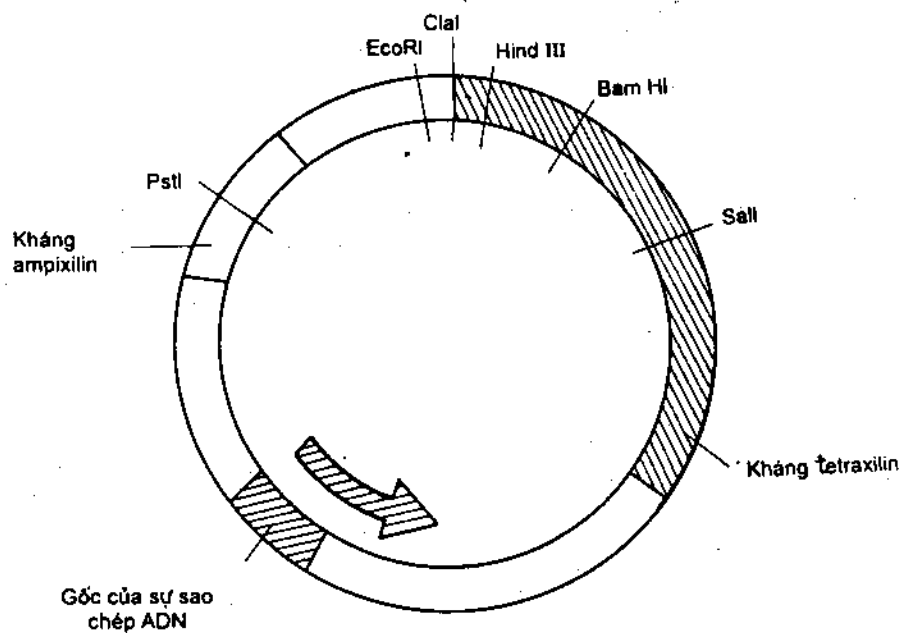
- (a) Cơ chế chuyển transposon ở tế bào vi khuẩn
- (b) Chuyển đổi tần số palindrom



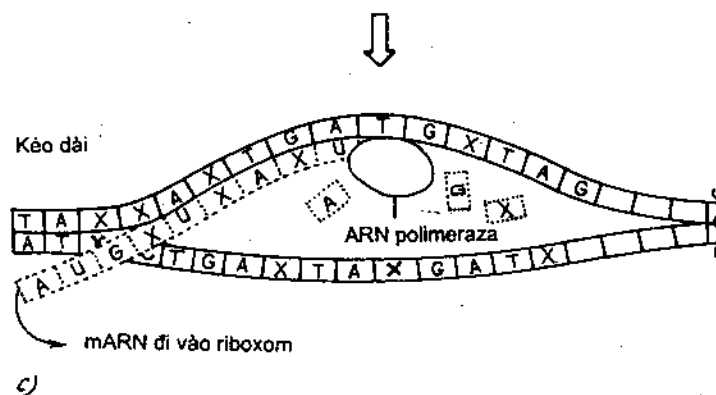
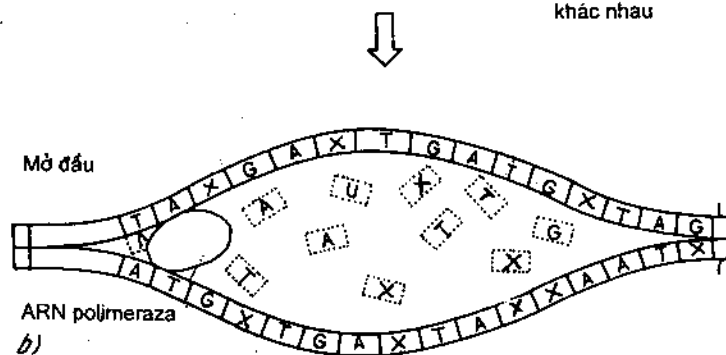
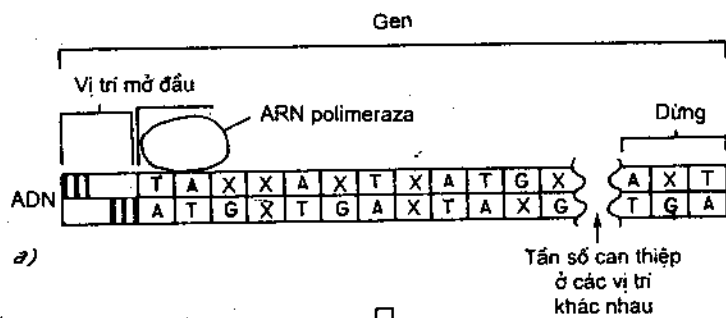
Những quá trình cơ bản về di truyền học



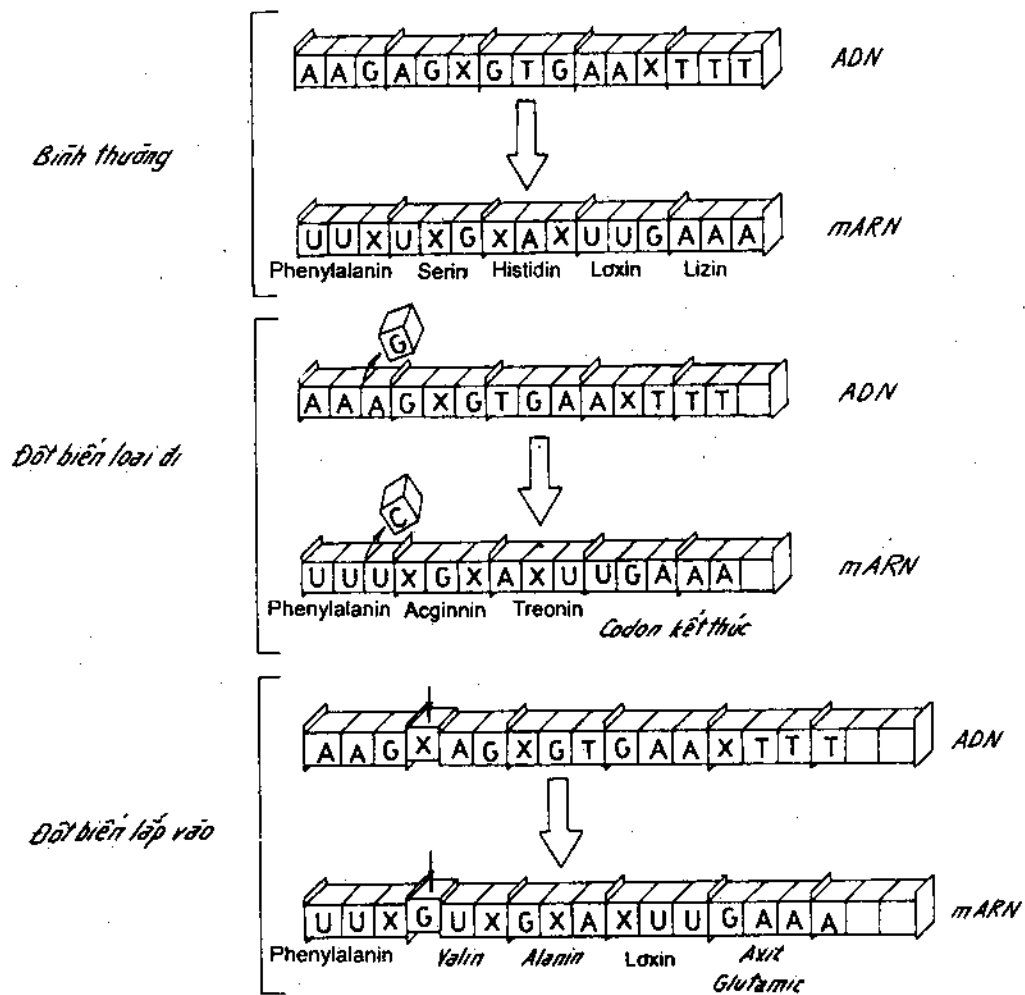
Cấu trúc riboxom ở vi sinh vật nhân nguyên thủy và ở vi sinh vật nhân thật



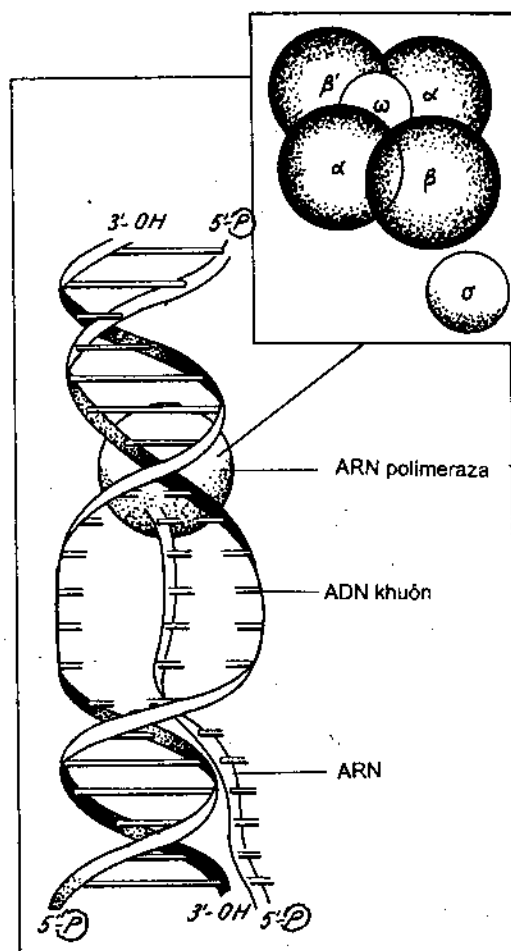
Cấu trúc của plasmid pBR 322



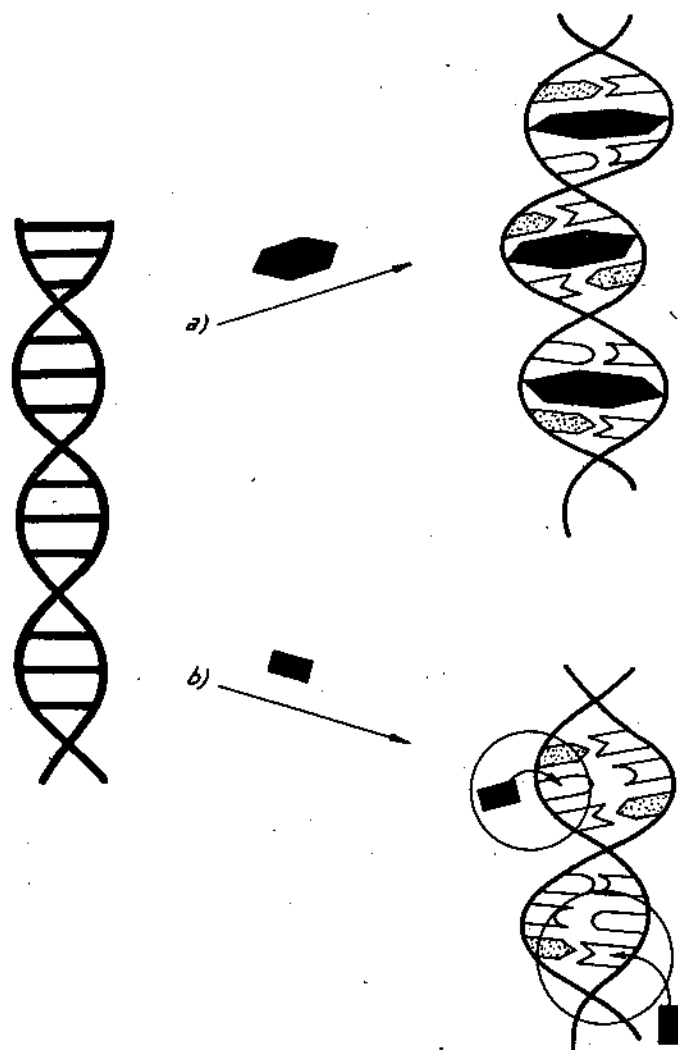
Quá trình phiên mã qua các bước khác nhau



Đột biến do loại đi hay lấp vào một cặp bazơ



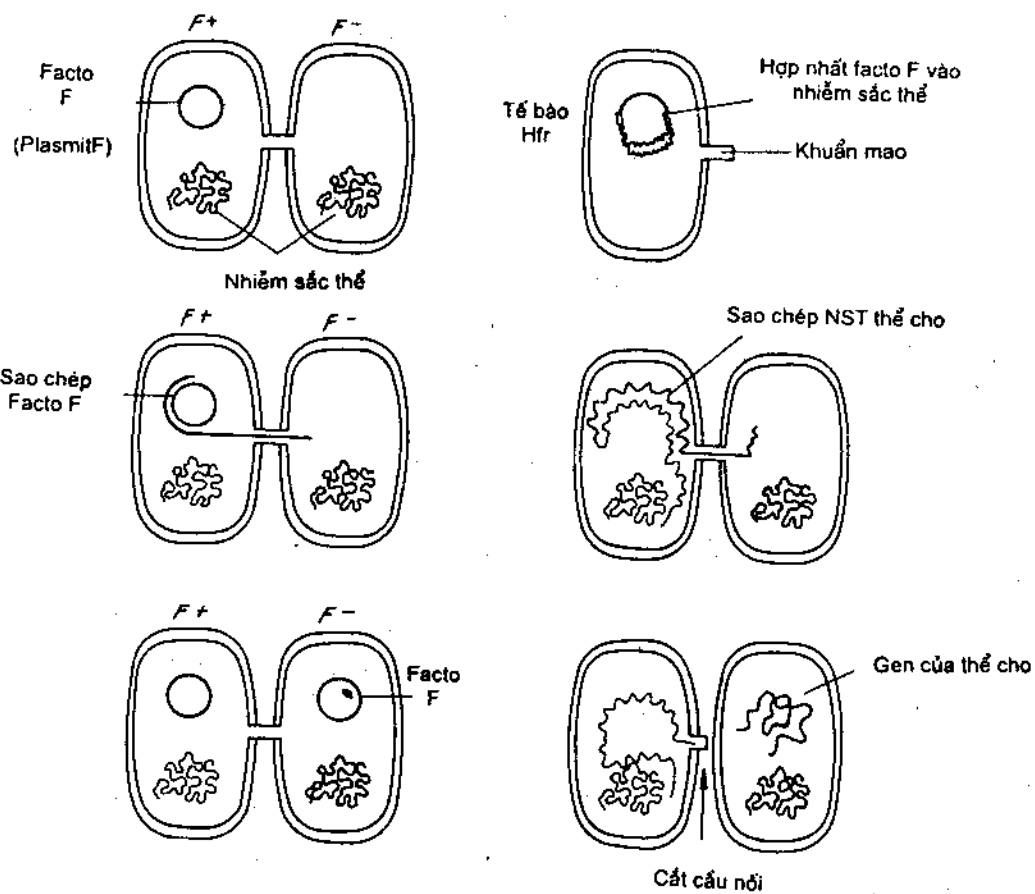
Quá trình phiên mã và cấu trúc của ARN - polimeraza



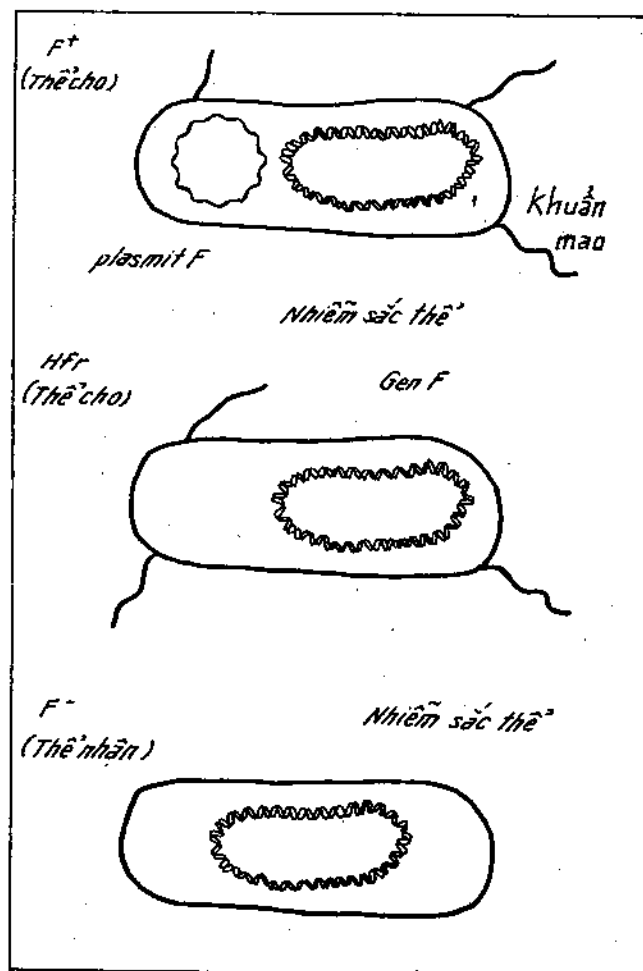
Phương thức gây đột biến của tác nhân đột biến hóa học

(a) Thay chất gây đột biến chui vào chuỗi xoắn kép

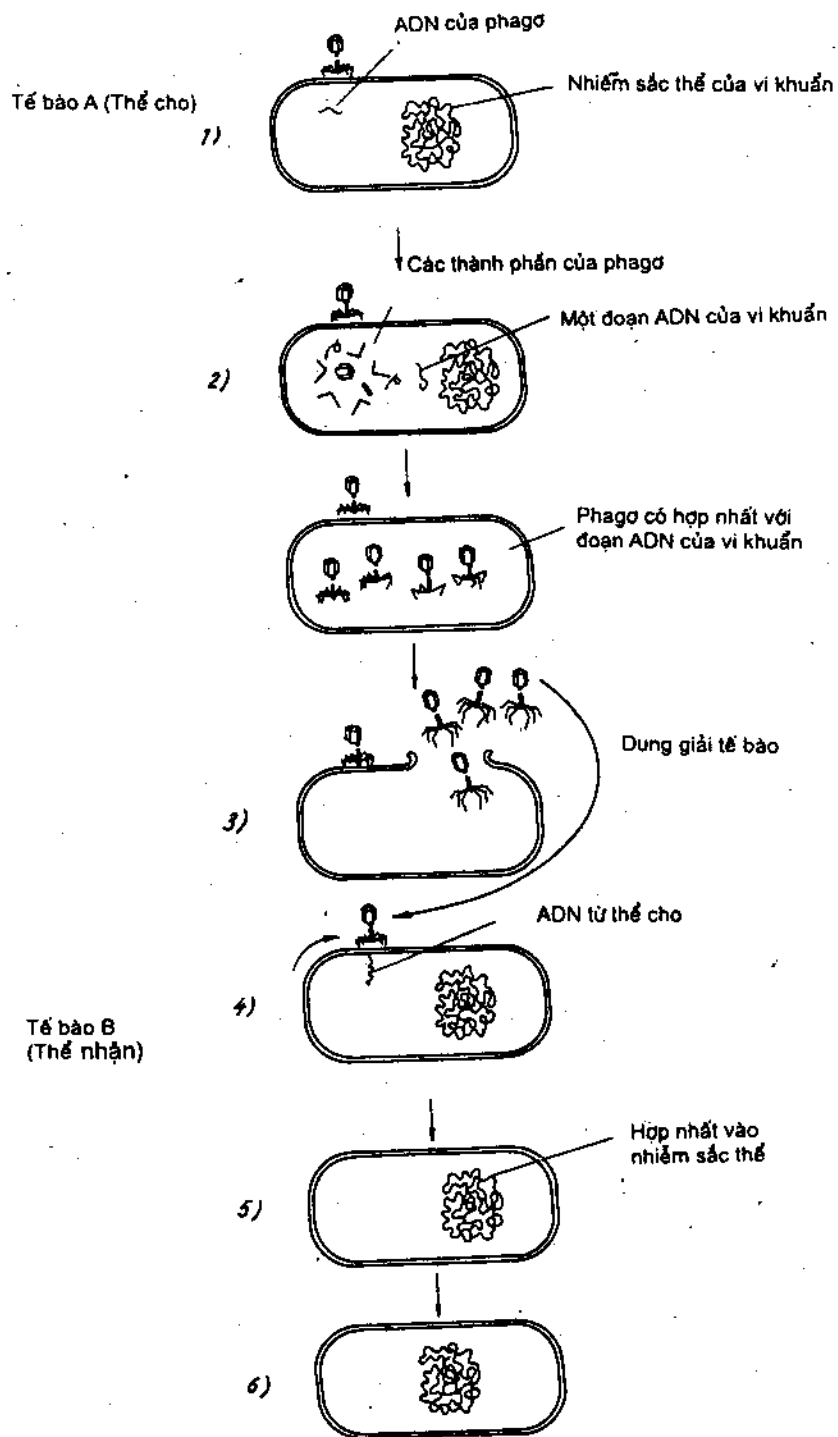
(b) Lắp chất tương tự bazơ (kháng chất trao đổi) vào ADN



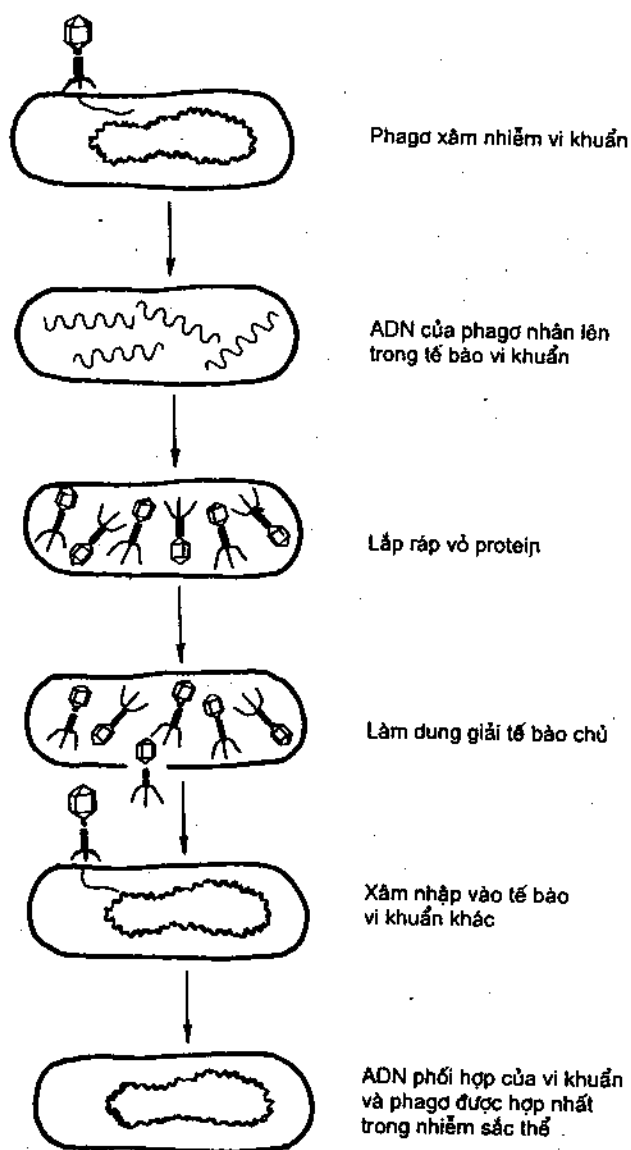
Sự tiếp hợp ở vi khuẩn



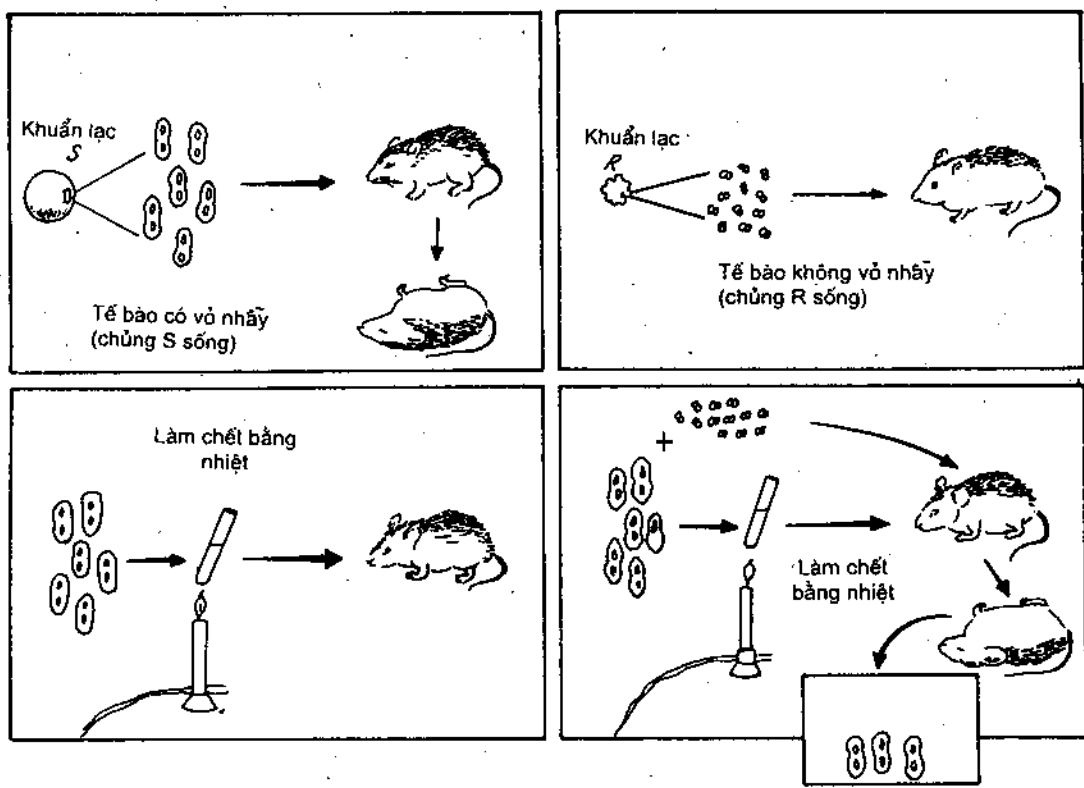
Các loại tế bào thể cho F⁺ và Hfr và tế bào thể nhận F⁻



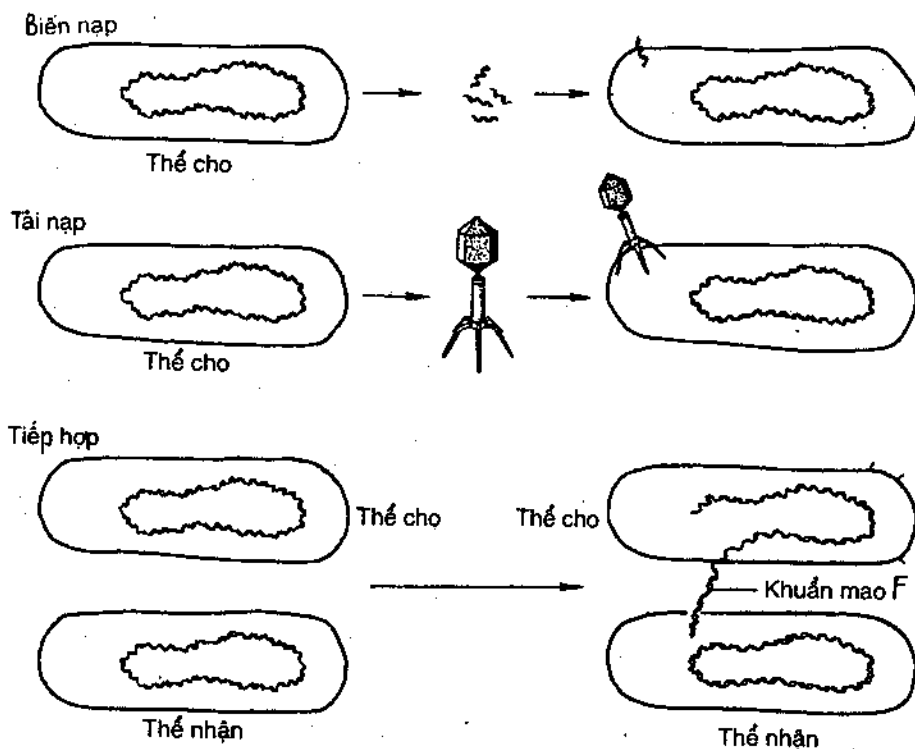
Quá trình tải nạp đặc biệt



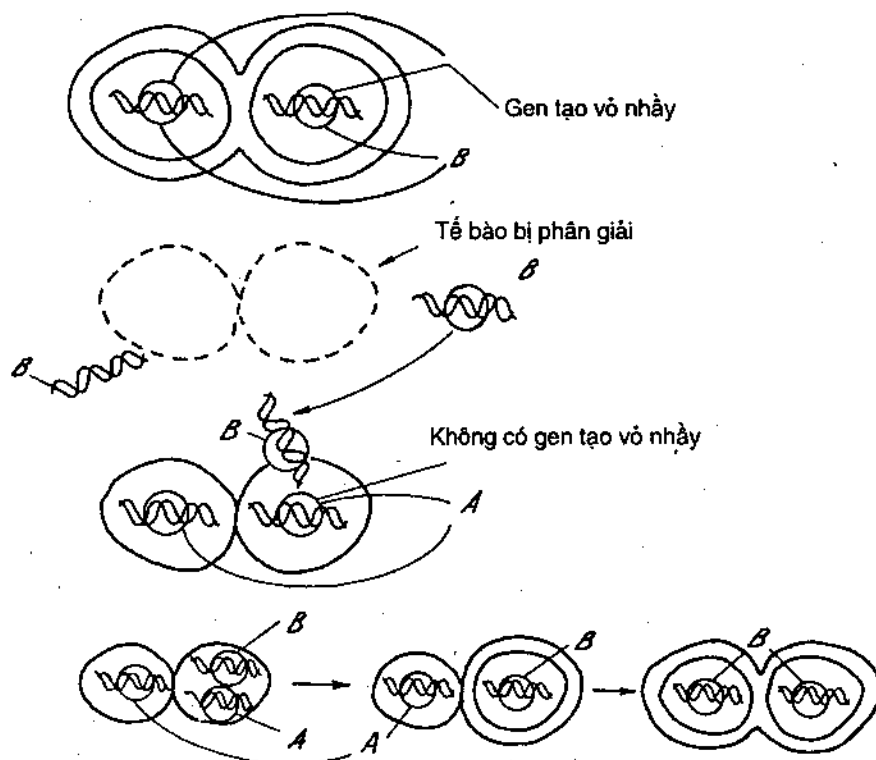
Chuyển ADN ở vi khuẩn bằng phương thức tải nạp nhờ phage (tải nạp phổ biến)



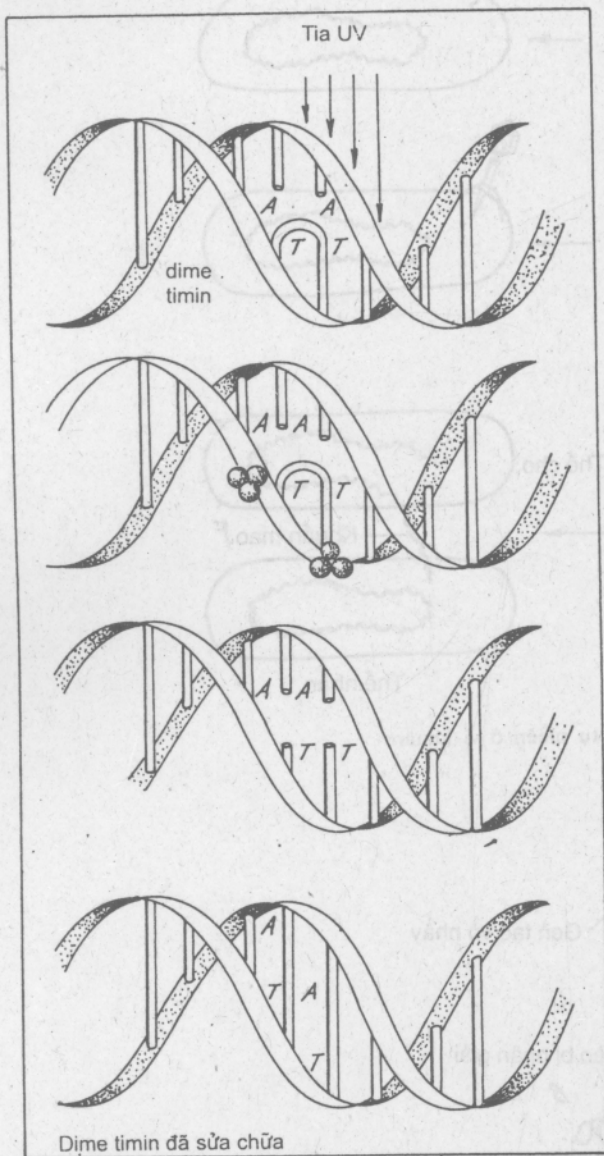
Thí nghiệm cổ điển của Griffith chứng minh khả năng biến nạp ADN của vi khuẩn *Streptococcus pneumoniae*



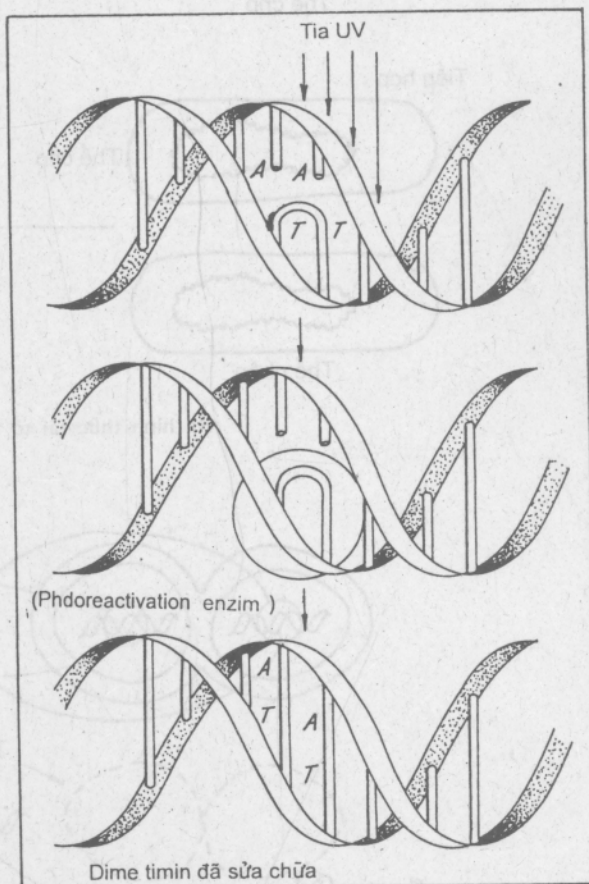
Ba hình thức tái tổ hợp tự nhiên ở vi khuẩn



Sự biến nạp ở vi khuẩn *Streptococcus (Diplococcus) pneumoniae*



a)

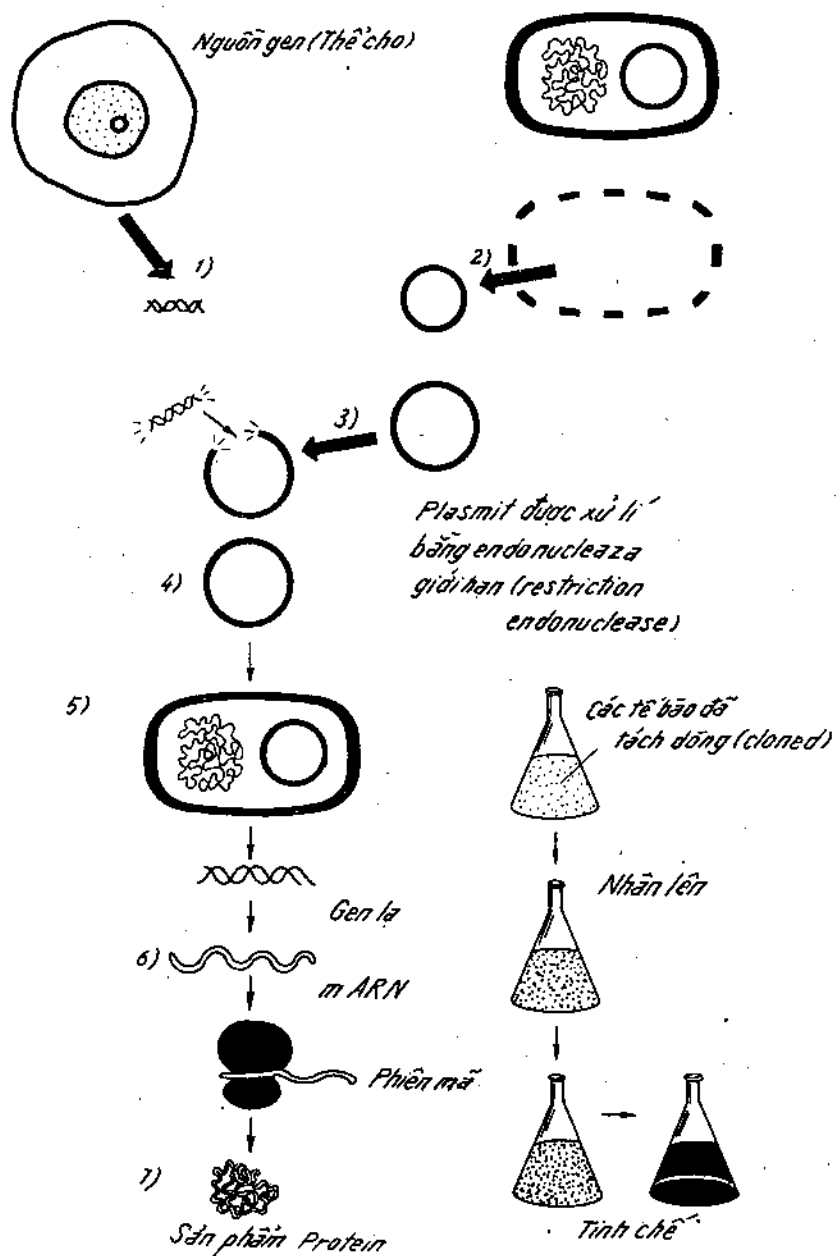


b)

Sửa chữa ADN đột biến (xuất hiện dime timin do chiếu tia tử ngoại) (tia UV)

(a) Sửa chữa cắt bazơ

(b) Sửa chữa trực tiếp



Các bước để tái tổ hợp ADN bằng kĩ xảo di truyền

CHƯƠNG X

MIỄN DỊCH

Miễn dịch (MD) là trạng thái bảo vệ đặc biệt của cơ thể chống lại các yếu tố gây bệnh (các vi sinh vật, độc tố của vi sinh vật, các phân tử lạ...) khi chúng xâm nhập vào cơ thể.

Ngày nay MD học đã trở thành một ngành khoa học được phát triển cao và chiếm vị trí quan trọng đặc biệt trong sinh học và y học. Kể từ khi có những phát kiến đầu tiên của Pasteur về vaccin, lịch sử MD học đã được dệt nên bởi những phát minh to lớn mang dấu ấn thời đại, thúc đẩy sự phát triển nhanh chóng của nhiều lĩnh vực của sinh học và y học. Nhiều giải thưởng Nobel mới đây về y học cũng nằm trong khuôn khổ các công trình nghiên cứu MD. Hàng loạt các công trình nghiên cứu về ung thư, AIDS, ứng dụng các chất hóa được v.v.... cũng không nằm ngoài phạm vi này.

Lịch sử miễn dịch học có thể chia ra làm năm thời kì : 1 - Thời kì phát hiện ra các vaccin, 2 - Thời kì huyết thanh học (phát kiến ra kháng thể và bổ thể), 3 - Thời kì xác định cấu trúc của các globulin MD (đồng thời với các phát triển về sinh học phân tử), 4 - Thời kì của MD trung gian tế bào và 5 - Thời kì phát kiến về quá trình điều hòa MD và sự hợp tác của các tế bào trong đáp ứng MD. Mặc dù chia làm 5 thời kì như vậy nhưng tất cả các vấn đề về MD vẫn đang tiếp tục được phát triển mạnh mẽ xen kẽ lẫn nhau như phát minh về vaccin thế hệ mới, MD ghép các cơ quan, MD ung thư, di truyền MD, sự tương tác giữa các tế bào trong đáp ứng MD.

1. CƠ CHẾ BẢO VỆ CƠ THỂ

Trong cuộc sống con người luôn phải đối mặt với các vi sinh vật gây bệnh, do vậy luôn phải tự bảo vệ mình bằng các cơ chế bảo vệ thích ứng. Tuyến phòng thủ đầu tiên ngăn cản sự xâm nhập của vi sinh vật vào cơ thể là các hàng rào vật lí, hóa học, vi sinh vật học - được gọi là bảo vệ không đặc hiệu, và hầu hết mang tính chất bẩm sinh.

Hàng rào vật lí bao gồm da, niêm mạc ở các đường hô hấp, tiêu hóa, lông mũi, phân xạ ho... có tác dụng ngăn chặn sự xâm nhập của vi sinh vật gây bệnh từ vòng ngoài.

Hàng rào hóa học bao gồm khả năng tiết ra một số chất ức chế sinh trưởng của vi sinh vật như lizozim có trong nước mắt, nước mũi, trong âm đạo có thể phân giải thành tế bào vi khuẩn. Protein liên kết sắt như lactoferrin, transferrin có trong nước mắt, tinh dịch, mật, sữa mẹ, trong các chất tiết phế quản, mũi, hầu, đường tiêu hóa,

trong huyết thanh. Do bị liên kết nên nồng độ sắt tự do trong máu và trong các mô thấp hơn so với nhu cầu cần cho sự phát triển của vi sinh vật, làm cho chúng không sinh trưởng được. Cơ thể cũng còn tiết ra interferon α , β (do tế bào mô bị nhiễm) và γ (do tế bào T) để ức chế virus và vi khuẩn. Hàng loạt protein của huyết thanh như β lizin, poliamin, kinin cũng có khả năng kháng khuẩn. Độ pH axit ở da, dịch dạ dày, âm đạo cũng cản trở sự sinh trưởng của vi sinh vật gây bệnh. Hàng rào vi sinh vật cũng tham gia tích cực vào công việc bảo vệ cơ thể. Các vi sinh vật này sống trên bề mặt cũng như bên trong cơ thể. Đó là khu hệ vi sinh vật bình thường, chúng không gây hại mà còn có lợi cho cơ thể do chúng chiếm trước các vị trí mà vi sinh vật gây bệnh sẽ đến, chúng làm giảm nồng độ oxy, cạnh tranh thức ăn và nhiều hơn nữa còn tiết ra các chất diệt khuẩn... Khu hệ vi sinh vật bình thường trong đường tiêu hóa còn tiết ra biotin, riboflavin và một vài loại vitamin khác cung cấp cho cơ thể.

Nếu vi sinh vật gây bệnh lọt qua các phòng tuyến trên để chui vào máu thì chúng sẽ vấp phải sự chống trả của hệ bạch huyết. Có các loại bạch cầu khác nhau là bạch cầu có hạt, do nguyên sinh chất chứa nhiều hạt (gồm bạch cầu kiềm, trung tính và ưa axit), và bạch cầu không hạt (gồm bạch cầu đơn nhân và các tế bào limpho). Bạch cầu đơn nhân biệt hóa thành đại thực bào, có trong gan, lách, hạch limpho và máu.

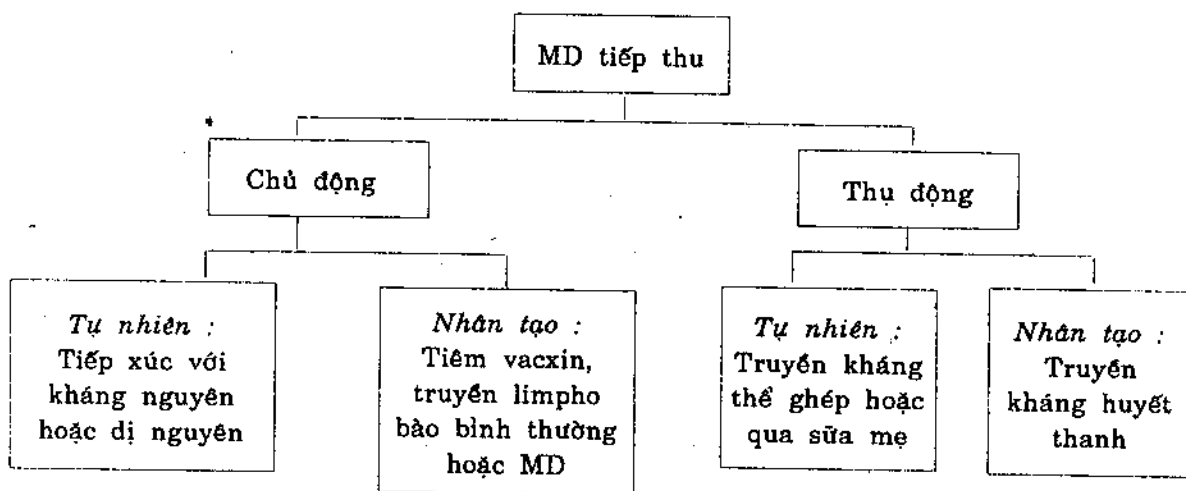
Bạch cầu trung tính và đại thực bào là các tế bào chính làm nhiệm vụ thực bào, bắt giữ và giết các vi sinh vật lạ theo kiểu amip bắt mồi. Đại thực bào còn làm nhiệm vụ chế biến và trình diện kháng nguyên cho tế bào T trong MD đặc hiệu.

MD đặc hiệu sẽ xuất hiện khi các phòng tuyến trên không thể ngăn chặn được sự nhiễm trùng. MD đặc hiệu bao gồm 1- MD tế bào, tức MD có sự tham gia của một số tế bào T, thể hiện dưới hình thức gây độc tế bào và hình thức viêm *kiểu quá mẫn muộn*. Miễn dịch này đóng vai trò quan trọng trong các bệnh do vi sinh vật kí sinh bên trong tế bào gây ra, trong thải bỏ mô ghép và trong MD chống ung thư. 2- MD thể dịch được thể hiện bằng sự sản xuất kháng thể có khả năng tương tác đặc hiệu với kháng nguyên. MD này chống vi sinh vật ở ngoài tế bào và trong thể dịch của cơ thể.

Tùy theo tính chất của miễn dịch mà người ta chia ra MD *tự nhiên* hay *bẩm sinh* và MD *tiếp thu*. MD bẩm sinh, chủ yếu là MD không đặc hiệu có sẵn từ khi sinh ra và mang tính di truyền trong các cơ thể cùng loài. Nhiều loài động vật không mắc bệnh của người và ngược lại. Ví dụ gà không mắc bệnh than, trâu bò không mắc bệnh giang mai và thương hàn của người.

MD tiếp thu là trạng thái MD xuất hiện sau khi cơ thể tiếp xúc với kháng nguyên. MD này lại được chia ra làm MD thu được chủ động và MD thu được thụ động. MD thu được chủ động bao gồm *chủ động tự nhiên* là trạng thái MD do tiếp xúc ngẫu nhiên với kháng nguyên và vi sinh vật có trong môi trường xung quanh. MD thu được chủ động nhân tạo là trạng thái MD thu được nhờ tiêm vaccin hoặc do truyền tế bào limpho thường hoặc limpho MD, ít khi là do ghép.

MD thụ động cũng được chia ra làm MD thụ động tự nhiên và MD thụ động nhân tạo. MD thụ động tự nhiên là trạng thái MD thu được do kháng thể ghép hoặc truyền từ sữa mẹ, còn MD thụ động nhân tạo là MD nhờ kháng thể chuyển từ bên ngoài do truyền kháng huyết thanh.



2. CHẤT SINH MIỄN DỊCH VÀ KHÁNG NGUYÊN

Bất kì một chất nào khi đưa vào cơ thể động vật ở điều kiện thích hợp gây ra đáp ứng MD đều được gọi là chất sinh MD. Bất cứ một chất nào khi gắn với thành phần của đáp ứng MD (kháng thể hoặc tế bào limpho hoặc cả hai) đều được gọi là kháng nguyên. Tất cả các chất sinh MD đều là kháng nguyên, song một số chất được coi là kháng nguyên nhưng không gây đáp ứng MD. Ví dụ hapten là các chất có khối lượng phân tử thấp có thể gắn với kháng thể đặc hiệu nhưng bản thân nó không kích thích tạo kháng thể. Hapten bao gồm các phân tử đường, axit amin, các polime nhỏ và nhiều loại chất kháng sinh.

2.1. Điều kiện bắt buộc của một chất sinh MD phải có 3 yếu tố sau đây :

- *Tính lạ* : Chất được gọi là kháng nguyên trước hết phải là một chất lạ với cơ thể, bởi vì bình thường cơ thể không đáp ứng bảo vệ với các chất của bản thân. Chất càng lạ với cơ thể bao nhiêu, khả năng kích thích tạo kháng thể càng mạnh bấy nhiêu.

- *Khối lượng phân tử lớn* : Nhìn chung kháng nguyên có khối lượng phân tử > 10000 dalton. Nếu < 1000 dalton (penixilin, progesteron, aspirin...) thì không có tính sinh MD. Từ 1000 đến 6000 dalton (insulin) có thể có hoặc không có khả năng đáp ứng MD.

- *Cấu trúc phân tử phức tạp* : Một chất có tính sinh MD phải là chất có cấu trúc hóa - lý tương đối phức tạp. Các chất có cấu trúc càng phức tạp thì tính sinh MD càng cao. Ví dụ polilizin là một polime có khối lượng phân tử 30000 dalton nhưng không gây đáp ứng MD vì có cấu trúc đơn giản, trong khi đó hapten tuy có khối lượng phân tử nhỏ và không có tính sinh MD, nhưng khi gắn với chất có khối lượng phân tử cao (chẳng hạn protein) lại trở thành một chất sinh MD.

Như vậy một chất muốn có tính sinh MD phải đạt 3 tiêu chuẩn : tính lạ, khối lượng phân tử lớn và cấu trúc đủ phức tạp. Nếu thiếu một trong 3 tiêu chuẩn này thì cũng phải gắn với chất mang để làm tăng khối lượng phân tử hoặc có mức độ phức tạp về cấu trúc.

2.2. Tính đặc hiệu của kháng nguyên

Sự liên kết giữa kháng nguyên với kháng thể hay giữa kháng nguyên với tế bào limpho luôn mang tính đặc hiệu cao. Tính đặc hiệu này tương tự như giữa enzym và cơ chất, nghĩa là phải khớp với nhau như khóa với chìa. Kháng thể hay tế bào limpho không phải liên kết với toàn bộ phân tử kháng nguyên mà chỉ với những phần nhất định của kháng nguyên, gọi là *quyết định kháng nguyên* hay là *epitop*. Phần tương ứng với nó trên mỗi kháng thể gọi là *vị trí kết hợp kháng nguyên* hay *paratop*. Phần tương ứng với quyết định kháng nguyên nằm trên tế bào limpho gọi là thụ thể. Chẳng hạn thụ thể của tế bào T là TCR (T - cell receptor).

Kích thước của epitop khoảng $7 \times 12 \times 35$ Å gồm 5 - 7 axit amin. Paratop và TCR cũng có kích thước tương tự. Mỗi epitop chỉ gắn đặc hiệu với một paratop của kháng thể hoặc TCR và chỉ sinh ra một dòng kháng thể đặc hiệu. Một kháng nguyên có nhiều epitop khác nhau sẽ tạo thành nhiều dòng kháng thể khác nhau tương ứng với từng epitop.

3. CÁC TẾ BÀO THAM GIA VÀO HỆ THỐNG MIỄN DỊCH

Hệ thống MD bao gồm nhiều cơ quan và nhiều loại tế bào nằm rải rác khắp cơ thể, tác động qua lại với nhau theo nhiều cách để dẫn đến đáp ứng MD cuối cùng.

Tế bào chủ chốt tham gia vào đáp ứng MD là tế bào limpho, cho nên bất kì tổ chức nào chứa các tế bào limpho và tham gia vào đáp ứng MD cũng đều được xem như *tổ chức limpho*. Limpho bào có nguồn gốc từ các tế bào nguồn, còn gọi là tế bào gốc, không biệt hóa trong tủy xương.

Từ tế bào nguồn, nhiều dòng tế bào có chức năng khác nhau được biệt hóa rồi sau đó trải qua quá trình thành thực hay chín khi kết hợp với các tổ chức chuyên hóa. Ở đây chúng ta chỉ dừng lại để xem xét các tế bào limpho và đại thực bào, là hai loại tế bào chính của hệ thống MD.

3.1. Tế bào limpho

Limpho bào phân tán khắp cơ thể trong hệ tuần hoàn máu và bạch huyết và là một trong những tế bào thịnh hành nhất của động vật có vú. Ở người lớn trung bình có 10^{12} tế bào limpho. Có hai loại tế bào limpho: Limpho bào B (gọi tắt là tế bào B) và limpho bào T (gọi tắt là tế bào T) là cần cho đáp ứng MD. Tuy cả hai đều được biệt hóa từ tế bào nguồn nhưng quá trình chín của tế bào B được thực hiện trong tủy xương (Bonemarrow - nên kí hiệu là B). Ở gia cầm, tế bào B chín trong một cơ quan chức năng chuyên hóa, gọi là túi Bursa Fabricicus (Bursa - nghĩa là túi, cũng bắt đầu bằng chữ B), là một tuyến ở ống tiêu hóa phía dưới.

Tế bào T chín trong cơ quan chức năng là tuyến ức (Thymus, nên kí hiệu là T). Do tủy xương và tuyến ức có vai trò lớn trong sự phát triển ban đầu và chín của tế bào B và tế bào T, nên chúng được gọi là các *cơ quan limpho trung tâm*.

Sau khi chín, các tế bào B và T phân tán khắp cơ thể thông qua hệ tuần hoàn máu và bạch huyết, rồi đến cư trú tại hạch limpho hoặc lách. Các cơ quan này được gọi là *cơ quan limpho ngoại vi*. Chúng nằm trong hệ tuần hoàn máu và bạch huyết và hoạt động như một bộ máy lọc. Đại thực bào làm nhiệm vụ bắt kháng nguyên khi chúng đi qua các cơ quan này và cũng ở đây các tế bào B và T thực hiện đáp ứng MD.

Tế bào B thực hiện tương tác với kháng nguyên và tạo kháng thể. Tế bào B khác với tế bào T ở chỗ trên bề mặt của nó có chứa kháng thể. Kháng thể bề mặt này sẽ dùng để sao ra các kháng thể mà chúng sẽ sản ra trong quá trình phát triển sau này.

Trên bề mặt tất cả các tế bào T đều có thụ thể đặc hiệu kháng nguyên cho nên nó có khả năng tương tác đặc hiệu với kháng nguyên.

Quần thể tế bào T lại được biệt hóa thành các tiểu quần thể có chức năng khác nhau gọi là các quần thể tế bào T phân lớp. Có 2 quần thể phân lớp chính của tế bào T phân biệt với nhau bởi sự có mặt của các protein thụ thể CD_4 và CD_8 . Quần thể tế bào TCD4 lại được biệt hóa thành hai phân lớp nữa có chức năng khác nhau. Một loại gọi là tế bào T hỗ trợ, kí hiệu là T_H (từ chữ T - helper) có nhiệm vụ kích thích tế bào B sản xuất nhiều kháng thể. Một loại gọi là tế bào T quá mẫn muộn, kí hiệu là T_D (từ chữ Delayed type hypersensitivity). Tế bào T_D tham gia vào các phản ứng trung gian tế bào T, nhưng không tương tác với tế bào B mà chịu trách nhiệm hoạt hóa các tế bào không đặc hiệu, chẳng hạn như đại thực bào.

Quần thể tế bào TCD8 cũng lại biệt hóa ít nhất ra làm hai phân lớp. Một loại là tế bào T độc, kí hiệu là T_C (từ chữ T - cytotoxic) làm nhiệm vụ tương tác và phá hủy trực tiếp các tế bào có kháng nguyên trên bề mặt. Còn một loại là tế bào T ức chế, kí hiệu là T_S (từ chữ T - suppressor) làm nhiệm vụ điều hòa đáp ứng MD, ức chế tác động của các tế bào MD như tế bào B (xem bảng so sánh giữa tế bào B và tế bào T).

Bảng so sánh giữa limpho bào B và T

<i>Tế bào T</i>	<i>Tế bào B</i>
Nguồn gốc : Tủy xương	Nguồn gốc : Tủy xương
Nơi chín : Tuyến ức	Nơi chín : Tủy xương
Thời gian sống : nhiều tháng đến nhiều năm	Thời gian sống lâu : Nhiều tháng đến nhiều năm
	Thời gian sống ngắn : Nhiều ngày đến nhiều tuần
Lưu động	Không lưu động
Có thụ thể tế bào T	Có thụ thể với bề mặt
Tính đặc hiệu kháng nguyên hẹp	Tính đặc hiệu kháng nguyên hẹp
Khi có kháng nguyên kích thích sẽ tăng sinh	Khi có kháng nguyên kích thích sẽ tăng sinh để tạo tế bào B - plasma và tế bào nhớ
Thể hiện quá mẫn muộn (T_D)	
Hỗ trợ tế bào B sản xuất kháng thể (T_H)	Sản ra kháng thể.
Kiểm tra đáp ứng MD (T_S)	
Sản ra limphokine	

3.2. Đại thực bào

Đại thực bào là các tế bào có kích thước lớn có khả năng bắt giữ, nuốt và phá hủy kháng nguyên, cũng như hợp tác với các tế bào limpho để sản xuất kháng thể đặc hiệu. Thực bào có hai phân nhóm: Các tế bào đơn nhân và các tế bào đa nhân

có hạt (hay bạch huyết cầu đa nhân). Tế bào đơn nhân có thể biệt hóa để trở thành đại thực bào.

Thuật ngữ *đại thực bào* chủ yếu dùng để mô tả các thực bào gắn cố định trên bề mặt tổ chức, còn thuật ngữ *bạch cầu đơn nhân* dùng để mô tả thực bào lưu động tự do. Đại thực bào có nhiều trong tổ chức limpho và lách, còn bạch cầu đơn nhân có nhiều trong máu và bạch huyết.

Khi một kháng nguyên xâm nhập vào biểu mô sẽ tiếp xúc với thực bào, chẳng hạn đại thực bào. Tế bào này sẽ bắt giữ, nuốt các tế bào có kích thước lớn như vi khuẩn và tiết ra các enzym thủy phân như proteinaza, nucleaza, lipaza và lizozim để tiêu hóa chúng. Khi tế bào vi khuẩn bị phân hủy sẽ giải phóng ra các kháng nguyên chứa trong đại thực bào. Các kháng nguyên này cùng với các kháng nguyên do đại thực bào nuốt trực tiếp từ bên ngoài sẽ được dùng để bắt đầu giai đoạn sớm của quá trình tổng hợp kháng thể. Ở đây đại thực bào làm nhiệm vụ tế bào trình diện kháng nguyên, kí hiệu là APC (Antigen presenting cell). Sở dĩ gọi như vậy vì chúng đẩy kháng nguyên lạ ra bề mặt tạo điều kiện cho kháng nguyên tiếp cận với tế bào B và T. Sự nhận mặt kháng nguyên của hai loại tế bào này là bước khởi đầu của sự tạo thành kháng thể. Khác với các tế bào B và T, đại thực bào và tế bào đơn nhân không có khả năng phân biệt kháng nguyên, do đó không mang tính đặc hiệu. Chúng bắt giữ và nuốt bất cứ chất lạ nào mà chúng gặp bất kể có tính kháng nguyên hay không. Tuy nhiên trong thực tế vì nhiều cao phân tử là kháng nguyên và các tế bào lạ có chứa nhiều kháng nguyên, cho nên phần lớn các hạt lạ do các tế bào này nuốt cũng là kháng nguyên.

Động tác trình diện kháng nguyên của đại thực bào đóng vai trò rất quan trọng trong sản xuất kháng thể, bởi vì một số lớn kháng nguyên chỉ có thể kích thích các tế bào limpho thông qua đại thực bào.

4. KHÁNG THỂ

Kháng thể là các globulin trong máu của động vật, có khả năng liên kết đặc hiệu với kháng nguyên đã kích thích sinh ra nó. Kháng thể theo định nghĩa trên đây gọi là kháng thể MD (immunoglobulin - kí hiệu là Ig) hay kháng thể đặc hiệu. Kháng thể chủ yếu được tìm thấy trong huyết thanh của động vật, do vậy huyết thanh chứa kháng thể đặc hiệu kháng nguyên được gọi là *kháng huyết thanh*.

Kháng thể cũng có thể được tìm thấy trong các thể dịch khác của cơ thể, như sữa. Những kháng thể có sẵn trong sữa hay huyết tương của người và động vật từ trước khi có sự tiếp xúc với kháng nguyên được gọi là *kháng thể tự nhiên* hay *kháng thể không đặc hiệu*.

Ở đây chúng ta chỉ xem xét loại kháng thể MD.

4.1. Bản chất và tính chất của kháng thể

Trong huyết thanh của người và động vật có vú chứa albumin, α , β và γ globulin thì γ - globulin là kháng thể. Vì bản chất kháng thể là protein nên các tác nhân hóa, lí như nhiệt độ, axit, kiềm... làm biến tính protein thì cũng có thể phá hủy kháng thể.

Hoạt tính kháng thể phụ thuộc vào pH môi trường và vào nhiều yếu tố khác. Sunphat amon, sunphat Na, cồn ở 5°C có thể kết tủa được kháng thể nhưng không làm mất tính chất của chúng, do đó người ta lợi dụng tính chất này để tinh khiết kháng thể.

Có 5 loại Ig là IgG, IgA, IgM, IgD và IgE.

4.2. Cấu trúc của kháng thể miễn dịch

Tất cả các Ig đều có cấu trúc giống nhau. IgG là kháng thể lưu hành phổ biến nhất nên ta xem xét kĩ hơn như một mô hình chung cho các lớp kháng thể khác. IgG chiếm 80% tổng số Ig trong huyết thanh người, có khối lượng phân tử 160.000, hằng số lắng 7S chứa 2,5 cacbon hidrat. IgG chứa 4 chuỗi polipeptit. Hai chuỗi nhẹ (ngắn) kí hiệu là L và hai chuỗi nặng (dài) kí hiệu là H, được gắn với nhau bởi cầu disunphua (S - S). Trình tự axit amin ở kháng thể giống hệt nhau theo từng đôi chuỗi nặng và từng đôi chuỗi nhẹ. Mỗi chuỗi nhẹ chứa 212 axit amin, còn mỗi chuỗi nặng chứa khoảng 450 axit amin. Cả phân tử có cấu tạo đối xứng.

Dưới tác dụng của enzym phân giải protein - papain phân tử được phân giải thành ba mảnh nhỏ. Hai mảnh nhỏ chứa toàn bộ chuỗi nhẹ cộng với nửa chuỗi nặng có đầu amin ($-NH_2$). Đây là nơi gắn với kháng nguyên và được gọi là đoạn Fab (từ chữ Fragment of antigen binding). Mảnh còn lại là hai nửa có đầu cacboxyl ($COOH$) của hai chuỗi nặng. Phần này không gắn được với kháng nguyên nhưng có khả năng kết tinh nên được gọi là phần F_c (từ chữ Fragment crystallizable).

Như vậy phân tử IgG chứa hai vị trí kết hợp kháng nguyên do đó có hai hóa trị. Vị trí này chiếm khoảng 1% diện tích bề mặt của IgG. Vị trí kết hợp kháng nguyên nằm ở phần nhỏ phía đầu amin của hai chuỗi nặng và nhẹ.

IgG cũng còn chứa một lượng nhỏ cacbon hidrat, gồm chủ yếu là đường hexozo và hexozamin. Cacbon hidrat không dính dáng đến vị trí kết hợp kháng nguyên.

Các chuỗi nhẹ : Mỗi chuỗi nhẹ của IgG chứa hai vùng axit amin. Một vùng mà trật tự axit amin có thể thay đổi gọi là vùng biến đổi. Vùng này nằm ở phía đầu amin. Vùng còn lại có trật tự axit amin không thay đổi, gọi là vùng cố định. Vùng này nằm ở phía đầu cacboxyl.

Trật tự axit amin vùng cố định của chuỗi nhẹ luôn giống nhau kể cả ở các IgG kết hợp với các kháng nguyên khác nhau. Sở dĩ như vậy vì ở phần cố định này chỉ có một trong hai kiểu trật tự axit amin : Trật tự lamda (λ) hoặc trật tự kappa (κ). Một phân tử IgG chỉ chứa hoặc hai chuỗi nhẹ lamda hoặc hai chuỗi nhẹ kappa mà không bao giờ chứa cả hai loại. Ngược lại, ở vùng biến đổi của chuỗi nhẹ, trật tự axit amin luôn khác nhau, kể cả đối với các Ig do cùng một tế bào sinh ra.

Các chuỗi nặng : Mỗi chuỗi nặng IgG chứa bốn vùng axit amin : Một vùng biến đổi và ba vùng cố định. Cũng tương tự như ở chuỗi nhẹ, tất cả các globulin miễn dịch thuộc lớp IgG, đều có trật tự axit amin ở đoạn đầu cacboxyl giống nhau. Các vùng này được kí hiệu là C_H1 , C_H2 , C_H3 .

Ở mỗi chuỗi nặng, đoạn có đầu amin (nơi có vị trí kết hợp kháng nguyên) có trật tự axit amin biến đổi, do vậy bảo đảm tính đa dạng của phân tử. Vùng này kí hiệu là V_H .

Vùng nằm giữa C_H1 và C_H2 của chuỗi nặng gọi là khớp nối, có tác dụng như chiếc bản lề, làm cho phân tử có cấu tạo hình chữ Y, nên có thể điều chỉnh doãng ra hay khép lại giúp cho việc gắn, phù hợp với hai quyết định kháng nguyên. IgG gắn với bề thể và đi vào nhau thai nên có thể truyền từ mẹ sang thai. IgG ở người có bốn phân lớp khác nhau là IgG1, IgG2, IgG3 và IgG4. Các phân lớp này khác nhau ở các phần của chuỗi nặng và số lượng cầu nối disunphua gắn giữa hai chuỗi nặng. Các phân lớp IgG như trên cũng có ở chuột nhưng không có ở thỏ.

Các globulin miễn dịch khác :

- IgM chiếm 5 - 10% tổng globulin của huyết thanh và là globulin lớn nhất, có khối lượng phân tử 900.000, hằng số lắng 19S và chứa 10% cacbon hidrat.

IgM có cấu tạo gồm hai chuỗi nhẹ kappa hoặc lamda và hai chuỗi nặng muyn nên được kí hiệu là $K_2\mu_2$ hoặc $\lambda_2\mu_2$. Năm globulin cụm lại với nhau thành ngôi sao năm cánh nhờ cấu nối disunphua và chuỗi peptit nhỏ (chuỗi J) nên IgM có tới 10 vị trí kết hợp kháng nguyên và vì thế hoạt tính mạnh hơn hoạt tính IgG từ 60 đến 180 lần. IgM xuất hiện sớm, đầu tiên trong các bệnh virut, sau đó IgG xuất hiện muộn và thay thế IgM. IgM cũng đáp ứng với polisaccarit vỏ nhầy của nhiều loài vi khuẩn nên được dùng để chống các vi khuẩn này. IgM dạng đơn (monome) có trên bề mặt limpho B và làm nhiệm vụ như thụ thể dành cho kháng nguyên.

Trong máu của một số loài, IgM ở dạng monome, ở một số loài khác là tetrame hoặc hexame.

- IgA có khối lượng phân tử 140.000 - 300.000, hằng số lắng 7S. Cấu tạo gồm hai chuỗi nhẹ kappa hoặc lamda và hai chuỗi nặng α nên được kí hiệu là $K_2\alpha_2$ hoặc $\lambda_2\alpha_2$. Trong huyết thanh người có ít IgA ở dạng dime hoặc trime gắn với nhau nhờ chuỗi peptit J, còn chủ yếu chúng có trong dịch nhầy. Chúng được tổng hợp chủ yếu nhờ tế bào B trong niêm mạc ruột, đường hô hấp và thực hiện chức năng chống vi khuẩn trên bề mặt niêm mạc.

- IgD chiếm 0,2 - 1% tổng globulin và có nồng độ trong huyết thanh rất thấp (0,5 - 40mg/100ml). Cấu tạo gồm hai chuỗi nhẹ kappa hoặc lamda và hai chuỗi nặng delta, nên được kí hiệu là $K_2\delta_2$, $\lambda_2\delta_2$. IgD có trên bề mặt tế bào B, nên có thể làm nhiệm vụ như thụ thể dành cho kháng nguyên.

- IgE có khối lượng phân tử 180.000, hằng số lắng 8S. Cấu tạo gồm hai chuỗi nhẹ kappa hoặc lamda và hai chuỗi nặng epsilon, nên được kí hiệu là $K_2\epsilon_2$, $\lambda_2\epsilon_2$. Nồng độ trong huyết thanh rất thấp, chỉ bằng 1/50.000 nồng độ IgG, nhưng sẽ được tăng lên nhanh khi bị dị ứng hoặc nhiễm trùng do kí sinh (giun).

5. THỤ THỂ TẾ BÀO T (TCR)

Như ta biết, tế bào T đóng vai trò khác nhau trong đáp ứng MD. Mặc dù không tạo kháng thể nhưng chúng nhận diện kháng nguyên và quá trình nhận diện này do thụ thể nằm trên tế bào T, viết tắt là TCR (T - cell receptor) thực hiện. Thụ thể tế bào T có tính đặc hiệu kháng nguyên theo kiểu kháng thể MD nhưng khác với đa số kháng thể MD ở chỗ chúng cắm vào màng của tế bào T. Tất cả các tế bào T, cả CD_4 lẫn CD_8 đều được trang bị thụ thể bề mặt để nhận diện kháng nguyên.

Vậy quá trình nhận diện diễn ra như thế nào ở mức độ phân tử.

Cấu trúc của thụ thể tế bào T : Các tế bào T có tính đặc hiệu cao. Ví dụ tế bào T_C có thể phân biệt được mỗi loại virut khi chúng xâm nhập vào cơ thể.

Thụ thể tế bào T (TCR) có nhiều nét giống kháng thể và trong các giai đoạn tiến hóa chúng là các phân tử có mối quan hệ họ hàng. TCR cũng có cấu tạo gồm hai chuỗi peptit gắn với nhau bằng cấu nối disunphua, gọi là chuỗi anpha và beta. TCR có ở 85% tế bào T chín. Các tế bào T còn lại chứa các chuỗi polipeptit gamma và delta. Cả hai loại TCR đều có vùng trật tự axit amin biến đổi mạnh - gọi là vùng

chức năng (domain). Vùng này nằm ở đầu amin của mỗi chuỗi và sẽ gắn với vị trí kết hợp kháng nguyên của kháng thể.

Các TCR cũng có vùng cố định. Trật tự axit amin của vùng này ở tất cả các TCR tương ứng đều không đổi. Kích thước của vùng biến đổi và cố định của TCR hoàn toàn tương ứng với kích thước vùng biến đổi, và cố định của vị trí kết hợp kháng nguyên ở kháng thể.

TCR là protein nguyên màng. Các nghiên cứu về chuỗi polipeptit gấp cho thấy cấu trúc bậc hai của vùng cố định ở TCR bao gồm các dải tương đối cứng, trong khi đó vùng biến đổi (nơi có vị trí kết hợp kháng nguyên, kể cả xoắn α) lại có khả năng uốn rất lớn. Dạng xoắn α của cấu trúc bậc hai là lí tưởng nhất cho sự hình thành vị trí kết hợp kháng nguyên. Tương tự như vậy, ở kháng thể vùng cố định cũng là các dải β , còn vùng biến đổi cũng là các dải α .

6. KHÁNG NGUYÊN PHÙ HỢP TỔ CHỨC

Kháng thể nhận diện kháng nguyên trong thể dịch. Mặc dù về mặt cấu trúc, thụ thể tế bào T rất giống với kháng thể, nhưng nó lại chỉ có thể nhận diện được các protein kháng nguyên quen thuộc (của mình hoặc cùng loài với mình) nằm trên bề mặt các tế bào bình thường (các tế bào có nhân của nhiều loại mô). Các protein này được mã hóa bởi vùng gen của tất cả động vật có xương sống và vùng gen đó được gọi là *phức hợp phù hợp tổ chức chính* viết tắt là MHC (major histocompatibility complex). Kháng nguyên MHC được phát hiện lần đầu tiên khi nghiên cứu hiện tượng thải ghép. Khi cấy mô ghép cho một cơ thể khác không giống nhau về các kháng nguyên này (không phù hợp với tổ chức) thì chúng sẽ kích thích cơ thể nhận, sinh đáp ứng MD, dẫn đến thải bỏ mô ghép. Các kháng nguyên phù hợp tổ chức chính của chuột là các kháng nguyên trong hệ thống phù hợp tổ chức H_2 và của người là các kháng nguyên trong hệ thống phù hợp tổ chức HLA - tức là các kháng nguyên bề mặt bạch cầu người.

Ngày nay chúng ta biết rằng protein MHC hoạt động như là phân tử trình diện kháng nguyên. Nó tương tác đặc hiệu với cả kháng nguyên và TCR, và vì vậy nó là loại nhóm thứ 3 của các phân tử kết hợp kháng nguyên và đóng vai trò trong toàn bộ đáp ứng MD.

Bây giờ chúng ta hãy xem xét cấu trúc, cơ sở di truyền và chức năng của protein MHC ở người.

6.1. Cấu trúc protein MHC

Các gen MHC mã hóa cho hai loại protein gọi là protein MHC lớp I và protein MHC lớp II. Toàn bộ vùng MHC có nhiều gen mã cho protein lớp I, còn chỉ có các gen phụ mã cho protein lớp II. Cả phân tử lớp I và lớp II đều là các protein bề mặt làm nhiệm vụ nhận diện kháng nguyên. Cần nhớ rằng protein MHC lớp I có trên bề mặt của *tất cả* các tế bào có nhân ở động vật có xương sống, còn protein MHC lớp II chỉ có trên bề mặt của *limpho bào B*, *dại thực bào* và các tế bào trình diện kháng nguyên (viết tắt là APC - antigen presenting cell).

Protein MHC lớp I có cấu tạo gồm hai chuỗi polipeptit. Một chuỗi được mã hóa bởi vùng gen MHC và là glicoprotein chuỗi α cắm sâu vào màng sinh chất. Chuỗi kia

gọi là microglobulin β -2 (viết tắt là β_2m) được mã bởi gen nằm ngoài vùng MHC. β_2m là một polipeptit nhỏ không tương đương với chuỗi α .

Protein MHC lớp I có hình dạng đặc trưng cho phép chúng tương tác với kháng nguyên và các tế bào của hệ thống MD. Chuỗi α của phân tử protein lớp I tạo ra ba vùng chức năng tách ra phía ngoài mặt tế bào.

Giữa hai vùng chức năng có một rãnh rộng. Chính tại rãnh này phân tử MHC sẽ gắn với kháng nguyên lạ. Trong hình ta sẽ thấy kháng nguyên lạ gắn vào rãnh protein MHC và mối tương tác giữa kháng nguyên lạ - MHC với TCR trong đáp ứng miễn dịch. Protein MHC lớp II cũng có cấu tạo từ hai chuỗi polipeptit là α và β . Các polipeptit này đều cắm sâu vào màng nguyên sinh và nhô ra ngoài mặt tế bào.

Cấu trúc protein MHC trong cùng một loài sinh vật cũng không giống nhau. Các cá thể khác nhau trong một loài thường biểu hiện sự khác nhau về trật tự axit amin trong phân tử MHC. Chẳng hạn đối với người có thể có tới 100 protein MHC khác nhau đối với mỗi vị trí gen, nhưng ở mỗi cá thể chỉ có hai dòng protein MHC được biểu hiện: Một bắt nguồn từ bố và một bắt nguồn từ mẹ. Sự thay đổi có giới hạn trật tự axit amin của MHC được xem là hiện tượng đa hình xảy ra ở cả hai lớp kháng nguyên MHC.

Sự khác nhau về cấu trúc chủ yếu của protein MHC luôn tồn tại giữa các loài động vật khác nhau, thậm chí giữa các cá thể trong cùng loài. Điều này giải thích tại sao khi ghép mô của cá thể này cho cá thể khác lại bị nhận diện là thể lạ (không phải của mình) và thường bị thải loại.

Giới hạn do MHC: Các limpho T (T_C hoặc T_H) chỉ có thể nhận diện được các kháng nguyên lạ trên bề mặt tế bào khác khi các kháng nguyên lạ này đã gắn được với các kháng nguyên "của mình", tức là gắn với các kháng nguyên MHC của mình.

Limpho T_C thường đáp ứng với kháng nguyên lạ khi kháng nguyên này đã gắn với kháng nguyên MHC lớp I, ngược lại tế bào T_H đáp ứng với kháng nguyên lạ khi kháng nguyên này đã gắn với kháng nguyên MHC lớp II. Điều này rất quan trọng vì nó giải thích chức năng của limpho T. Tuy nhiên đối với bất kì cá thể bình thường nào thì chức năng này cũng không quan trọng, bởi vì tất cả các tế bào của chúng đều là "của mình", nhưng đối với các cá thể sime (chimera) - tức là các cá thể chứa các dòng tế bào khác biệt về di truyền mà không sinh đáp ứng MD chống lại chúng, như trường hợp ghép tủy xương, thì chức năng lại rất quan trọng.

6.2. Chức năng của protein MHC

Protein MHC làm nhiệm vụ như là nơi trung chuyển phân tử. Nhìn chung, khi một kháng nguyên lạ bị tế bào kí chủ bắt giữ, nó sẽ bị chế biến hoặc phân hủy. Kháng nguyên đã qua chế biến sẽ gắn vào protein MHC tạo thành phức hệ kháng nguyên - MHC. Phức hệ này xuyên qua màng sinh chất và nằm trên bề mặt tế bào. Tế bào T thông qua TCR của mình sẽ gắn với MHC, sau đó nhận mặt được kháng nguyên lạ vì chúng đã gắn vào MHC. Các kháng nguyên lạ không gắn được vào protein MHC thì không được tế bào T nhận diện.

Có hai sơ đồ trình diện kháng nguyên. Một cho protein lớp I và một cho protein lớp II. Theo sơ đồ lớp I kháng nguyên sau khi được tế bào kí chủ chế biến nhờ các enzym phân giải, sẽ được gắn với protein MHC lớp I trong lưới nội chất. Cách gắn kháng nguyên này rất quan trọng trong nhiễm trùng virus, nơi tế bào chủ chế biến protein virus. Các peptit virus được giải phóng ra là kháng nguyên lạ (không phải của

mình), sẽ tạo phức hợp với protein lớp I rồi chuyển đến bề mặt tế bào. Ở đây chúng được tế bào T_C đặc hiệu peptit nhận mặt thông qua TCR đặc hiệu với phức hệ kháng nguyên MHC, cùng với sự trợ giúp của đồng thụ thể CD_8 . Về phần mình, tế bào T được kích thích sản ra limphokin, làm tan tế bào nhiễm.

Trong cơ thể, tế bào T_C thường xuyên rà soát toàn bộ quần thể tế bào để tìm kiếm các tế bào có biểu hiện kháng nguyên lạ trên bề mặt.

Thông thường các tế bào lành biểu hiện tất cả protein lớp I lên bề mặt, nhưng vì các phân tử lớp I chứa peptit "của mình" nên không được các tế bào T nhận mặt. Tuy nhiên tế bào T sẽ nhận ra tế bào nhiễm virus bởi vì trên bề mặt của chúng chứa kháng nguyên virus "không phải của mình" nằm giáp với phân tử MHC lớp I là "của mình". Do vậy TCR trên mặt tế bào T phải tương tác cả với vị trí đặc hiệu kháng nguyên lạ lẫn vị trí đặc hiệu phân tử MHC "của mình".

Sơ đồ trình diện kháng nguyên thứ hai đòi hỏi phân tử lớp II. Protein lớp II được hình thành trong lưới nội chất và được tích lũy cùng với protein bao vây, đó là chuỗi không đổi P_1 . Chuỗi này ngăn cản lớp II gắn với các peptit khác cũng được tạo ra trong lưới nội chất. Sau đó protein lớp II cùng P_1 được chuyển vào hạch nhân.

Kháng nguyên lạ sau khi bị các tế bào APC nuốt cũng được chuyển vào endosom. Ở đây nhờ proteinaza chúng được tiêu hóa cùng với protein I_1 . Các peptit lạ được giải phóng ra sẽ gắn với protein lớp II tạo phức hệ chui ra ngoài màng sinh chất để trình diện tế bào T_H . Về phần mình, tế bào T_H thông qua TCR và đồng thụ thể CD_4 nhận mặt phức hệ kháng nguyên lạ MHC lớp II trên bề mặt tế bào APC. Khi tiếp xúc với peptit lạ, tế bào T_H hoạt hóa và tiết ra limphokin - phân tử tiết (interlokin I, interlokin II) để kích thích dòng tế bào B tạo kháng thể.

7. MIỄN DỊCH TRUNG GIAN TẾ BÀO

Trước đây thuật ngữ MD trung gian tế bào dùng để mô tả khái niệm MD không cần có sự tham gia của kháng thể. Tuy nhiên ngay sự tạo thành kháng thể cũng có sự tham gia của nhiều loại tế bào khác nhau, do vậy khái niệm này cần được hiểu rộng hơn. Ngày nay miễn dịch tế bào được dùng để chỉ bất kì đáp ứng MD nào có sự tham gia trực tiếp của các tế bào thuộc hệ thống MD, nhưng sự tạo thành kháng thể hoặc sự tham gia của kháng thể chỉ đóng vai trò thứ yếu.

MD tế bào khác với MD trung gian kháng thể ở chỗ đáp ứng MD không thể được truyền từ cá thể này sang cá thể khác nhờ kháng thể hoặc huyết thanh chứa kháng thể mà chỉ được truyền các tế bào limpho từ máu. Các tế bào limpho đảm nhiệm chức năng trong việc truyền MD tế bào là các tế bào T đã hoạt hóa. Đa số các tế bào limpho lưu động trong máu là tế bào T còn tế bào B chủ yếu là cố định và khu trú trong tổ chức limpho.

Bây giờ chúng ta hãy xem xét đến sự hoạt động của các tế bào T phân lớp bao gồm tế bào T - độc, T - quá mẫn muộn, T - giết và vai trò của chúng trong MD tế bào.

Tế bào limpho T độc được gọi tắt là tế bào T_C . Ngoài đại thực bào, tế bào T_C cũng thực hiện chức năng giết tế bào lạ. Tế bào T_C nhận mặt kháng nguyên lạ khi chúng gắn với phân tử MHC lớp I. Bất cứ tế bào nào mang kháng nguyên lạ, chẳng hạn các tế bào mô ghép không tương đồng, các tế bào chứa virus, đều có thể bị tế bào T_C tiêu diệt.

Nếu ghép mô giữa hai loài khác nhau hoặc thậm chí giữa hai chủng của cùng một loài nhưng có kháng nguyên phù hợp tổ chức khác nhau thì tế bào T_C sẽ đáp lại bằng cách diệt mô lạ và làm bong mảnh ghép. Chính vì vậy mà trước khi tiến hành ghép da hoặc các cơ quan ở người, một thủ tục bắt buộc là phải tiến hành thử chéo giữa các mô của người cho và người nhận xem kháng nguyên phù hợp tổ chức có giống nhau không.

Để làm tan tế bào lạ (tế bào đích) thì tế bào T_C phải có sự tiếp xúc với chúng. Mặc dù cơ chế tan bào còn chưa rõ, nhưng có lẽ là kết quả của chất độc do tế bào T_C tiết ra.

Điều đáng chú ý là đối với đại thực bào, việc diệt các tế bào đích không mang tính đặc hiệu, còn đối với tế bào T_C thì chỉ diệt các tế bào đích đặc hiệu chứa kháng nguyên lạ. Đối với các tế bào khác thì tần số làm tan bào rất thấp.

Tế bào giết tự nhiên gọi tắt là NK (natural killer cell) là lớp phụ của tế bào limpho và đóng vai trò phá hủy tế bào lạ. Tế bào NK không phải là tế bào lạ. Tế bào NK không phải là T hay B. Về khả năng giết tế bào lạ thì giống với T_C nhưng khác ở chỗ không cần có sự kích thích của kháng nguyên đặc hiệu. Chẳng hạn tế bào NK có thể phá hủy invitro các tế bào u ác tính và các tế bào nhiễm virut mà không cần tiếp xúc với kháng nguyên lạ. Tuy nhiên cũng giống như tế bào T_C , trước tiên tế bào NK phải tiếp xúc với tế bào chứa kháng nguyên lạ, sau đó mới tiết ra độc tố để giết tế bào. Cho đến nay người ta vẫn chưa tìm thấy thụ thể của tế bào NK cần cho việc làm tan tế bào đích.

Lymphokin và xitokin : Các tế bào T, đại thực bào, các loại bạch cầu, tế bào NK đều có thể hạn chế các vi sinh vật và các chất lạ khác khi xâm nhập vào cơ thể bằng cách tiết ra các phân tử gọi là lymphokin (nếu do tế bào limpho sản ra) hoặc xitokin (do các tế bào khác sản ra).

Các chất tham gia vào đáp ứng MD do tế bào sinh ra này gọi là các tác nhân điều biến. Chúng có thể có nhiều chức năng, thí dụ interlekin 1, interlekin 2, interlekin 3, interlekin 4 và interferon có liên quan đến sự điều hòa các tế bào MD khác, Interlekin 2 do tế bào T hoạt hóa kháng nguyên sản ra chủ yếu dùng để hoạt hóa tế bào T, trong khi đó interlekin 4, lymphokin do các tế bào T khác sinh ra gây nên sự tăng sinh tế bào B để tổng hợp kháng thể. Các lymphokin khác như *nhân tố hoạt hóa bạch cầu*, *nhân tố hóa hướng động*, *nhân tố ức chế di tản* lại hoạt động như chất điều chỉnh chức năng đại thực bào.

- *Nhân tố hóa hướng động* hấp dẫn đại thực bào vào nơi tập trung kháng nguyên.
- *Nhân tố hoạt hóa đại thực bào* kích thích tế bào này trở thành tế bào giết hiệu quả hơn.
- *Nhân tố ức chế di tản* ngăn trở sự di chuyển của đại thực bào ra khỏi kháng nguyên.
- *Nhân tố kích thích khuẩn lạc* kích thích tất cả các loại tế bào bạch huyết dạng thực bào phân chia và biệt hóa.
- Các xitotoxin khác gây nên đáp ứng quá mẫn muộn hoặc dùng như một protein độc đối với tế bào ung thư.

Hoạt hóa đại thực bào : Đại thực bào đóng vai trò trung tâm trong cả MD trung gian kháng thể và MD trung gian tế bào. Như ta biết, đại thực bào gắn, chế biến và trình diện kháng nguyên, song vì là thực bào nên nó cũng bắt và giết cả các tế bào lạ nhất định, khả năng này do tế bào T kích thích.

Đặc điểm chủ yếu của đại thực bào đã hoạt hóa là có thể giết vi khuẩn không cho chúng nhân lên. Nhưng ngược lại cũng có các loài có thể nhân lên trong đại thực bào như *Mycobacterium tuberculosis* (gây bệnh lao), *M. Leprae* (gây bệnh phong), *Listeria monocytogenes* (gây bệnh listeriosis) và nhiều loài *Brucella* gây sốt hồi quy và gây sảy thai.

Nếu động vật được tiêm *M. tuberculosis* với liều lượng vừa phải sẽ thoát khỏi nhiễm trùng nhờ đáp ứng miễn dịch trung gian tế bào T. Các cơ thể đã được MD kiểu này sẽ sẵn sàng diệt các vi sinh vật khác, chẳng hạn *Listeria*, và nhất là sẵn sàng diệt các vi sinh vật khi chúng xâm nhập lần sau.

8. THUYẾT CHỌN LỘC DÒNG (CLONE) CỦA BURNET VÀ DUNG NẠP MIỄN DỊCH

8.1 Thuyết chọn lọc

Theo Burnet mọi thông tin cần thiết cho tổng hợp kháng thể phải có sẵn trong cơ thể từ trước khi có kháng nguyên xâm nhập. Khi có kháng nguyên xâm nhập, chúng sẽ lựa chọn các tế bào limpho tương ứng có thụ thể bề mặt phù hợp để kích thích tăng sinh. Các tế bào limpho sẽ tiếp tục phân chia bằng con đường gián phân để tạo thành "dòng". Các tế bào không được lựa chọn, tức là không có thụ thể bề mặt phù hợp thì không được phân chia và không tạo dòng. Tuy nhiên các tế bào limpho phải phân biệt được các kháng nguyên lạ với kháng nguyên của bản thân (tự kháng nguyên). Dòng tế bào phản ứng với kháng nguyên bản thân sẽ bị bất hoạt và loại trừ. Khả năng không gây MD đặc hiệu đối với kháng nguyên bản thân được gọi là *dung nạp* và xảy ra cả ở tế bào B và T.

8.2. Dung nạp miễn dịch

Dung nạp MD là hiện tượng không có đáp ứng MD đặc hiệu, là cơ thể không có đáp ứng MD thể dịch hoặc đáp ứng MD tế bào với một loại phân tử kháng nguyên hay một loại quyết định kháng nguyên được đưa vào cơ thể theo một cách nào đó (mà có thể đưa theo cách khác cơ thể vẫn có đáp ứng MD). Dung nạp MD còn là hiện tượng cơ thể có thể vẫn có đáp ứng MD với các kháng nguyên này, mà lại không có đáp ứng MD với kháng nguyên khác. Đó là tính đặc hiệu của dung nạp MD và là cơ sở để giải thích sự tự dung nạp MD của cơ thể, mà khi phá vỡ sự dung nạp này sẽ dẫn đến các quá trình đáp ứng tự miễn và các bệnh tự miễn.

8.2.1. Các phương pháp và điều kiện thực nghiệm của dung nạp MD.:

Muốn gây được trạng thái dung nạp miễn dịch phải có những điều kiện thực nghiệm nhất định và theo các con đường như sau:

Gây dung nạp bằng cách đưa kháng nguyên vào bào thai, hoặc động vật mới sinh, khi cơ thể chưa phát triển các cơ quan có trách nhiệm miễn dịch.

Ví dụ: Hiện tượng dung nạp MD giữa 2 cá thể sinh đôi khác trứng, chúng có gen khác nhau nhưng vì sinh đôi nên có sự trao đổi máu qua lại trong thời kì bào thai, chúng không sinh ra đáp ứng MD lẫn nhau và do vậy có thể dung nạp mảnh ghép của nhau. Một thí nghiệm khác của Medewar. Lấy các tế bào lách sống của chuột thuần chủng dòng A tiêm vào bào thai nằm trong tử cung chuột CBA (hai dòng chuột này thuần chủng và hoàn toàn không phù hợp tổ chức). Khi chuột CBA ra đời và lớn

lên có khả năng dung nạp mảnh ghép lấy từ chuột A trong khi đó vẫn có thái ghép với các mảnh ghép lấy từ chuột dòng khác.

Gây dung nạp ở cơ thể trưởng thành bằng cách đưa lượng lớn các kháng nguyên không phụ thuộc tuyến ức.

Muốn tạo dung nạp kiểu này phải đưa liều kháng nguyên không phụ thuộc tuyến ức lớn 10-100 lần liều gây đáp ứng MD. Dung nạp xảy ra được do không có đáp ứng của các tế bào B và các kháng nguyên này không cần có sự hỗ trợ của tế bào T, ví dụ như : Các polisaccarit của phế cầu.

Gây dung nạp ở cơ thể trưởng thành với các kháng nguyên protein hòa tan phụ thuộc tuyến ức bằng một trong 3 cách sau :

- Sử dụng các biện pháp ức chế MD kết hợp với đưa kháng nguyên vào cơ thể.
- Đưa kháng nguyên liều thật thấp hoặc thật cao để gây dung nạp, dựa vào khái niệm hai vùng cảm ứng dung nạp : dung nạp liều thấp và dung nạp liều cao.
- Tiêm kháng nguyên hòa tan không có lẫn các phân tử bị ngưng tụ hoặc polime hóa vào tĩnh mạch, tránh bị bắt và xử lý bởi các đại thực bào.

Trong tất cả các trường hợp gây dung nạp trên, phải chú ý đến các điều kiện thực nghiệm sau :

- Khả năng đáp ứng MD của cơ thể
- Tính sinh MD của kháng nguyên
- Đường vào của kháng nguyên
- Trạng thái hóa lý của kháng nguyên
- Liều kháng nguyên.

8.2.2. Vai trò của các tế bào T và B trong dung nạp miễn dịch

Từ các thí nghiệm trên động vật thực nghiệm, người ta đã rút ra các kết luận sau :

- Cả limpho T và B đều có thể trở nên dung nạp kháng nguyên.
- Trạng thái nhạy cảm với dung nạp của limpho T và limpho B khác nhau về liều kháng nguyên gây dung nạp và thời gian từ lúc tiêm kháng nguyên vào cho đến lúc xuất hiện trạng thái dung nạp.
- Thời hạn duy trì trạng thái dung nạp của limpho B ngắn hơn thời hạn đó của limpho T.
- Đối với kháng nguyên phụ thuộc tuyến ức, trạng thái dung nạp của cơ thể có thời hạn bằng thời hạn dung nạp của limpho T.

8.2.3. Cơ chế của dung nạp miễn dịch

Trạng thái dung nạp MD đặc hiệu có thể xảy ra do tình trạng dung nạp của tế bào T hoặc dung nạp của tế bào B hoặc dung nạp của cả 2 loại tế bào.

- Thoái hóa dòng ở các tế bào T :

Quá trình phát triển dung nạp tế bào T xảy ra trong tuyến ức. Tế bào T phát triển và chín trong tuyến ức nên tuyến này là cơ quan limpho. Giai đoạn chín ban đầu của tế bào T gọi là *chọn lọc dương tính*. Limpho bào trở thành tiền tế bào T rời khỏi tủy xương qua ống limpho rồi vào tuyến ức. Tại đây thụ thể phát triển trên mặt

tế bào T và thông qua thụ thể này, tế bào T gắn với phân tử MHC bản thân ở tuyến ức. Các tế bào T không tương tác được với MHC sẽ dừng phát triển và chết, trong khi các tế bào gắn được với MHC tuyến ức vẫn tiếp tục chín. Như vậy sự lựa chọn dương tính là thủ tục đầu tiên nhằm giữ lại các tế bào có thể nhận diện protein MHC bản thân và loại bỏ tế bào T không có khả năng nhận diện này.

Giai đoạn 2 phát triển tế bào T là *chọn lọc âm tính*. Sau khi tăng sinh tế bào T chọn lọc dương tính tiếp tục phản ứng với MHC, đã gắn với kháng nguyên bản thân trong tuyến ức. Loại tế bào T này rất nguy hiểm vì có thể phá hủy mô của bản thân. Do vậy chúng phải bị loại trừ. Tuyệt đại đa số các tế bào T này gắn chặt vào mô tuyến ức và bị chết ngay. Chỉ có các tế bào T tương tác với MHC bản thân (của mình) nhưng không tương tác với kháng nguyên bản thân (tự kháng nguyên) mới được rời khỏi tuyến ức (vì chúng không gắn chặt vào mô tuyến ức). Loại tế bào T này tìm đến kháng nguyên lạ và tương tác với các tế bào trình diện kháng nguyên (APC) và tế bào B. Cơ chế tạo dung nạp gọi là sự thoái hóa dòng. Trong quá trình phát triển, dòng tế bào T nào không có lợi, thậm chí có hại sẽ bị loại bỏ.

Còn một vấn đề nữa trong dung nạp là đôi khi dòng tế bào T tự phản ứng bằng cách nào đó loại bỏ sự thoái hóa dòng, trở nên sẵn sàng phản ứng với kháng nguyên bản thân thông qua mối tương tác trong cơ quan limpho ngoại vi. Cơ chế này được gọi là *vô ứng dòng* hay *tế liệt dung nạp*. Tuy nhiên dòng tế bào này vẫn còn lại trong hệ tuần hoàn và sau này có thể tái hoạt trở lại trạng thái ban đầu. Dòng tế bào phản ứng bản thân khi hoạt động sẽ gây các bệnh tự miễn. Có được dung nạp MD ở tế bào B cũng rất cần thiết bởi vì kháng thể do tế bào B tự phản ứng sinh ra (*tự kháng thể* - autoantibody) có thể phá hủy mô cơ thể. Cơ chế cho dung nạp tế bào B cũng giống như ở tế bào T.

Tế bào B cũng trải qua sự thoái hóa dòng để loại bỏ các tế bào B tự phản ứng. Ở đây sự vô ứng cũng có vai trò quan trọng. Các tế bào B tự phản ứng sẽ không phát triển được nếu nó gắn được với kháng nguyên bản thân. Có thể giải thích sự vô ứng dòng tế bào B là do luôn có nồng độ cao kháng nguyên bản thân. Các kháng nguyên này chiếm giữ hết thụ thể bề mặt tế bào B, làm cho chúng không có khả năng phản ứng với kháng nguyên một cách bình thường. Vô ứng tế bào B cũng có thể là do các tế bào T tự phản ứng do đã bị loại trừ trong quá trình chín, nên không còn để giúp tế bào B sản xuất kháng thể.

9. CƠ CHẾ HÌNH THÀNH KHÁNG THỂ MIỄN DỊCH

Một câu hỏi đặt ra là làm sao cơ thể có khả năng sản ra một lượng lớn và đa dạng các loại kháng thể đến như thế để đáp ứng mỗi khi có sự xâm nhập của vi khuẩn, virus, các cao phân tử. Để giải đáp câu hỏi này trước hết ta phải tìm hiểu xem làm thế nào các tế bào của hệ thống MD tương tác được với nhau để tạo kháng thể khi bị kích thích bởi kháng nguyên và sau nữa là làm sao kháng thể được sinh ra lại đa dạng như vậy.

Việc cơ thể sản ra kháng thể khi có sự kích thích của kháng nguyên là một quá trình phức tạp đòi hỏi sự tham gia của tế bào T, tế bào B, các tế bào trình diện kháng nguyên (APC, chẳng hạn đại thực bào) và phải có mối tương tác giữa các phân tử bề mặt của các tế bào khác nhau. Như ta biết APC tiêu hóa kháng nguyên không mang tính đặc hiệu. Một khi kháng nguyên bị chế biến, APC sẽ trình diện nó cho cặp tế

bào T và B. Sau khi nhận mặt, tế bào T tiết ra các chất kích thích để tế bào B tổng hợp kháng thể. Mặc dù mối tương tác ban đầu giữa kháng nguyên và APC có thể không đặc hiệu, nhưng ở các bước sau của quá trình tổng hợp kháng thể, tính đặc hiệu lại rất cao. Các phân tử thụ thể trên bề mặt cả tế bào T (TCR) lẫn tế bào B (kháng thể) sẽ bảo đảm chắc chắn rằng nếu một kháng thể được tạo thành để đáp ứng với một kháng nguyên nào đó thì nhất định nó sẽ đặc hiệu với kháng nguyên ấy.

Kiểm tra di truyền hình thành kháng thể cũng là một quá trình rất phức tạp. Người ta dự tính rằng một động vật có vú có khả năng tổng hợp một tỉ phân tử kháng thể khác nhau về cấu trúc. Điều này thật khó hình dung, nếu chúng ta nghĩ rằng mỗi gen cần cho một chuỗi polipeptit đơn, thì rõ ràng cần phải có đến hàng tỉ gen để sản xuất kháng thể, như thế nó sẽ vượt quá tiềm năng mã di truyền của cơ thể. Sự thật thì động vật chỉ dùng một lượng gen tương đối nhỏ (vài trăm gen) để sản xuất và bảo đảm tính đa dạng của kháng thể. Điều này có được là do kết quả của những biến đổi đặc biệt xảy ra trong ADN của các tế bào xoma, hay nói khác đi là sự sắp lại gen. Trong quá trình phát triển của các tế bào limpho trong tủy xương, trong tế bào B xảy ra sự sắp lại gen và sự khuyết đoạn để tạo ra hai đơn vị sao mã hoàn chỉnh. Một đơn vị mã cho tổng hợp chuỗi nặng đặc hiệu, còn đơn vị kia mã cho chuỗi nhẹ của Ig. Cách sắp lại gen như vậy thì dù với số lượng gen ít cũng tạo nên tính đa dạng của kháng thể.

Sự sắp lại gen cũng xảy ra trong quá trình phát triển của tế bào T để tạo nên tính đa dạng của thụ thể tế bào T (TCR).

Ở mục sau chúng ta sẽ xem xét chi tiết các bước tổng hợp kháng thể bắt đầu từ khi có kháng nguyên xâm nhập cho đến khi kháng thể đặc hiệu với kháng nguyên ấy được tạo thành.

9.1 Tiếp cận kháng nguyên

Trước khi tìm hiểu cơ chế hình thành kháng thể, ta hãy xem xét điều gì xảy ra với kháng nguyên trong cơ thể động vật. Kháng nguyên được đưa tới mọi nơi trong cơ thể nhờ hệ máu và bạch huyết. Nơi kháng nguyên đến cư trú là hạch limpho, lách và gan. Kháng thể được tạo thành ở cả lách và hạch limpho nhưng không được tạo thành ở gan. Nếu ta tiêm kháng nguyên vào tĩnh mạch thì lách sẽ là nơi tạo nhiều kháng thể nhất, ngược lại nếu tiêm dưới da, trong da hay màng bụng thì kháng thể sẽ được tạo thành nhiều trong hạch limpho. Lấy một mẫu hạch limpho hay lách của động vật đã MD để nuôi cấy mô hay tiêm vào động vật chưa MD thì chúng tiếp tục tạo kháng thể.

Sau khi có sự xâm nhập đầu tiên của kháng nguyên là thời kì tiềm ẩn. Lúc này không thấy bất kì kháng thể nào xuất hiện trong máu. Sau đó nồng độ kháng thể tăng dần rồi lại giảm xuống. Phản ứng với mũi tiêm lần một gọi là *đáp ứng kháng thể nguyên phát*. Khi tiêm kháng nguyên lần hai (tiếp cận kháng nguyên lần hai) sau vài ngày hay vài tuần, nồng độ kháng thể sẽ tăng lên nhanh chóng, đạt đến 10 - 100 lần nhiều hơn nồng độ tiêm lần thứ nhất. Sự tăng nhanh chóng nồng độ kháng thể này, được gọi là *đáp ứng kháng thể thứ phát*. Nồng độ kháng thể sẽ giảm dần theo

thời gian, nhưng ở các lần tiêm sau nữa nó sẽ lập lại. Đáp ứng thứ phát là cơ sở của quy trình tiêm vaccine.

9.2 Sự hình thành kháng thể

Các tế bào B, T và APC hợp tác với nhau như thế nào trong quá trình hình thành kháng thể? Trước hết kháng nguyên phải được APC trình diện. APC dùng trong tổng hợp kháng thể là đại thực bào. Bản thân tế bào B cũng có thể là APC hiệu lực nhất.

- APC là các tế bào B thông qua thụ thể (là các globulin MD bề mặt của tế bào B) có khả năng nhận dạng đặc hiệu kháng nguyên. Kháng nguyên được đưa vào tế bào rồi tiêu hóa trong hạch nhân. Các peptit tạo thành được đưa trở lại ra bề mặt gắn với phức hệ kháng nguyên - MHC lớp II.

- APC là đại thực bào cũng hoạt động như vậy nhưng chúng không có thụ thể đặc hiệu kháng nguyên. Chúng có thể bắt và nuốt kháng nguyên lạ một cách hữu hiệu, sau đó chế biến và trình diện ra bề mặt nhờ phức hệ kháng nguyên - MHC lớp II, giống như trường hợp APC là tế bào B.

Bước tiếp theo là APC trình diện phức hệ kháng nguyên - MHC cho tế bào T thông qua thụ thể của nó là TCR. Phân tử MHC lớp II trên bề mặt APC sẽ tương tác với phân tử CD_4 trên bề mặt tế bào T_H . Do được tiếp xúc thông qua kháng nguyên làm trung gian, tế bào T_H kích thích tế bào B sản ra interleukin. Chất này lại kích thích tế bào B phân chia. Kết quả là dòng tế bào B được tạo thành. Dòng này chỉ sản ra một loại kháng thể đặc hiệu. Sau đó lại xảy ra sự biệt hóa tiếp theo của dòng tế bào B đã hoạt hóa dẫn đến tạo thành một lượng lớn các tế bào tiết kháng thể gọi là tế bào plasma và một dòng tế bào B đặc biệt gọi là tế bào B nhớ. Tế bào plasma có đời sống ngắn (dưới một tuần) nhưng lại tiết ra một lượng lớn kháng thể. Ngược lại tế bào nhớ có đời sống dài và khi có dịp tái ngộ với kháng nguyên đã kích thích lần đầu, chúng sẽ nhanh chóng biến thành tế bào plasma để sản xuất kháng thể. Trí nhớ MD cũng là đáp ứng thứ phát dẫn tới việc sản xuất kháng thể một cách nhanh chóng, kịp thời và với số lượng lớn khi có sự kích thích lặp lại của kháng nguyên.

Một số kháng nguyên có thể kích thích tạo kháng thể ở mức độ thấp mà không cần có mối tương tác với tế bào T được gọi là *kháng nguyên không phụ thuộc tuyến ức*. Đa số các kháng nguyên này là các polyme chứa các quyết định kháng nguyên lặp lại (ví dụ polisaccarit). Kháng thể chống kháng nguyên không phụ thuộc tuyến ức thường là lớp IgM, có ái lực thấp. Tế bào B đáp ứng kháng nguyên không phụ thuộc tuyến ức không có trí nhớ MD.

Những điểm nói trên miêu tả nguyên tắc cơ bản của sự tạo thành kháng thể. Mỗi kháng nguyên hay đúng hơn là mỗi quyết định kháng nguyên, thông qua hoạt động của APC và T_H sẽ xúc tác cho sự phát triển một dòng tế bào B nhất định. Trong mỗi trường hợp, mỗi tế bào B được tạo thành là khả năng di truyền sản xuất kháng thể, có thể phản ứng đặc hiệu với kháng nguyên đã kích thích sinh ra nó. Với cách này, một con vật có thể đáp ứng với hàng tỉ kháng nguyên khác nhau nhờ sự phát triển dòng tế bào B đặc hiệu phù hợp với nó.

10. DI TRUYỀN VÀ TIẾN HÓA CÁC PHÂN TỬ IG VÀ THỤ THỂ TẾ BÀO T

10.1. Tổ chức gen

Nếu tế bào B sản ra kháng thể có một tính đặc hiệu thì về mặt lý thuyết nó chỉ cần một gen mã cho hai chuỗi nặng giống nhau và một gen mã cho hai chuỗi nhẹ giống nhau. Nhưng thực tế đâu phải như vậy. Một chuỗi nhẹ hoặc một chuỗi nặng thực ra được mã bởi nhiều gen khác nhau. Các gen này được hình thành do hàng loạt sự sắp lại rất phức tạp các gen trong quá trình chín của tế bào B ở trong tủy xương. Chúng ta hãy xem sự kiện này xảy ra như thế nào.

Muốn hiểu rõ di truyền tổng hợp kháng thể ta cần dừng lại nghiên cứu chi tiết cấu trúc kháng thể.

Các kháng thể khác nhau có trật tự axit amin khác nhau ở vùng biến đổi. Trong vùng biến đổi lại có những vùng nhỏ gọi là vùng biến đổi mạnh (vùng siêu biến). Chính các nơi đó là vị trí kết hợp với quyết định kháng nguyên. Nhìn vào sơ đồ ta thấy mỗi vùng biến đổi của chuỗi nhẹ cũng như chuỗi nặng chứa 3 vùng biến đổi mạnh. Trừ vùng biến đổi mạnh thứ 3 nằm trên chuỗi nặng có một phần được mã bởi một gen riêng gọi là gen D (từ chữ diversity - đa dạng). Còn thì các vùng biến đổi mạnh đều được mã bởi các gen vùng biến đổi (gen V). Ngoài ra tại vị trí nối giữa các gen vùng đa dạng (D) và vùng cố định (C) có một đoạn dân các nucleotit gọi là vùng J (joining) được mã bởi một gen riêng - gen J. Như vậy vùng biến đổi mạnh thứ 3 được mã bởi một phần gen V, toàn bộ gen D và các gen J. Cuối cùng, phần cố định xác định các lớp phân tử Ig được mã bởi các gen riêng của chúng - gen C (constant).

Chuỗi nhẹ được mã bởi các gen vùng biến đổi (V), các gen vùng nối (J), các gen vùng cố định (C) riêng của mình, nhưng không chứa các gen vùng đa dạng (D) như ở chuỗi nặng.

10.2. Sắp xếp lại gen

Tất cả tính đa dạng di truyền cần cho việc tạo thành kháng thể đều nằm trong các tế bào limpho, bởi vì chính các tế bào này đã được hình thành từ các tế bào nguồn của tủy xương. Ở mỗi tế bào B chứa chín, cho chuỗi nhẹ có 150 gen vùng biến đổi (V), 5 trật tự liên kết khác nhau (J) và 2 gen vùng cố định (C). Trong khi đó, cho chuỗi nặng có 100 - 200 gen vùng biến đổi (V), 4 trật tự liên kết (J), 50 gen vùng đa dạng (D) và 5 gen vùng cố định (C). Các gen V, J, D và C không nằm liên kế nhau mà tách biệt bởi các trật tự không làm nhiệm vụ mã hóa, gọi là intron. Đó là đặc trưng cho sự sắp lại gen ở Eukaryota. Suốt quá trình chín, trong mỗi tế bào B xảy ra tái tổ hợp di truyền dẫn tới việc cấu trúc nên gen hoạt tính chuỗi nặng và gen hoạt tính chuỗi nhẹ. Các gen này sẽ được sao và dịch mã để tạo ra chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của Ig, đặc trưng cho tế bào B. Nếu các đoạn V, J và C bị lựa chọn sai thì sẽ bị các enzym phân giải và loại bỏ tất cả các đoạn ADN không đúng xen vào. Như trên đã nói, trong quá trình biệt hóa của tế bào B luôn xảy ra sự mất đoạn nên nó sẽ ghép nối một trong những vùng gen V với một trong những vùng gen D và gen J. Khi được sao mã đoạn chuỗi VDJ là đỉnh 5' của bản sao ARN sơ cấp. Sự sao mã

tiếp tục dọc theo suốt cả vùng gen ổn định (C). Sự cắt ghép ARN kế tiếp nối kết các vùng CDJ với vùng C tạo ra mRNA, để rồi sau đó dịch mã thành phân tử chuỗi nặng. Đối với chuỗi nhẹ thì không gắn với gen D. Sự ghép nối ADN này gọi là *ghép nối tổ hợp* bởi vì có thể tạo ra nhiều tổ hợp khác nhau của các vùng VDJ một cách ngẫu nhiên. Tần số xuất hiện các tổ hợp có thể có là như nhau. Số lượng các tổ hợp là rất lớn, do vậy số phân tử Ig khác nhau cũng rất lớn. Chẳng hạn chuỗi nhẹ được hình thành bởi tổ hợp của 150 gen V, 5 gen J và 2 gen C sẽ cho ra $150 \times 5 \times 2 = 1500$ chuỗi khác nhau. Đối với chuỗi nặng có khoảng 200 gen V, 4 gen J và 50 gen D, 5 gen C, tạo ra $200 \times 4 \times 5 \times 50 = 20.000$ chuỗi khác nhau. Vì một chuỗi nhẹ bất kì có thể liên kết với một chuỗi nặng bất kì nên ta có tối thiểu là $20.000 \times 1500 = 3.10^7$ loại kháng thể. Điều gây ấn tượng là một lượng khổng lồ các phân tử Ig được tạo thành mà chỉ được mã hóa bởi một lượng ADN tương đối nhỏ.

Tính đa dạng thu được do sự sắp lại gen trong tế bào limpho đã ảnh hưởng đến kiến thức của chúng ta về di truyền Eukaryota. Nó luôn được cho rằng mỗi tế bào của cơ thể đa bào đều giống nhau về mặt di truyền (tất nhiên không kể sự đột biến của các tế bào soma) và sự khác nhau của mỗi loại tế bào là do sự biểu hiện của các gen khác nhau. Điều này rõ ràng không nằm trong trường hợp của tế bào limpho, bởi vì có hàng triệu (nếu không nói là hàng tỉ tế bào limpho khác biệt về di truyền là sản phẩm tái tổ hợp của tế bào soma ở động vật có xương sống).

Điều còn chưa rõ là phải chăng các tế bào limpho chỉ sản ra dòng tế bào Eukaryota có khả năng sắp lại gen kiểu này hay cơ chế xáo trộn gen này có thể tạo ra tính đa dạng của các phân tử. Sự tuyển chọn các tế bào B ban đầu nào đó làm nguồn tạo dòng sinh kháng thể là nhiệm vụ của kháng nguyên. Từ cái kho limpho bào chín đa dạng ấy, các tế bào B đặc hiệu được kháng nguyên kích thích sẽ phát triển tạo thành dòng tế bào B với tất cả đặc điểm di truyền riêng. Thuyết chọn lọc dòng dự đoán rằng nhiều loại tế bào B sinh ra và "thăm lặn" mãi trong cơ thể động vật do không có dịp tiếp cận với kháng nguyên phù hợp. Tuy nhiên cái kho đa dạng kháng thể ấy còn cần trong tương lai nếu chạm trán với chất sinh MD.

10.3. Di truyền thụ thể tế bào T

Trước đây ta đã thảo luận về cấu trúc của thụ thể tế bào T. TCR nhận mặt kháng nguyên khi nó gắn vào MHC trên bề mặt tế bào APC. Do vậy TCR phải nhận mặt được cả các vùng của MHC lẫn quyết định kháng nguyên đặc hiệu. Vậy trong phạm vi di truyền điều này xảy ra như thế nào?

Cũng giống như kháng thể, TCR chứa vùng cố định và vùng biến đổi, nên không có gì lạ là nó cũng phải có các gen mã cho các vùng biến đổi. Ở chuột nhắt chuỗi α của TCR có khoảng 100 gen vùng biến đổi (V) và 50 gen đoạn liên kết (J), trong khi đó chuỗi β có 25 gen biến đổi, 2 gen đa dạng và 12 đoạn liên kết. Ngoài ra có một số đoạn nhỏ bổ sung chứa từ 1 đến 6 nucleotit xen kẽ vào giữa các đoạn gen vùng biến đổi, gen đa dạng và gen liên kết. Như vậy số lượng các tổ hợp về trật tự gen có thể có là rất lớn, ước tính lên đến 10^{15} thậm chí còn cao hơn số tổ hợp của kháng thể MD mà ta nghĩ có thể có. Do sự giống nhau về cấu trúc di truyền giữa phân tử Ig và TCR, ta có thể hình dung dễ dàng rằng chúng có mối quan hệ gần gũi với nhau về mặt tiến hóa.

11. KHÁNG THỂ ĐƠN DÒNG

Mỗi quyết định kháng nguyên sẽ kích thích tạo thành một kháng thể đặc hiệu. Khi một kháng nguyên có nhiều quyết định kháng nguyên (đa giá) sẽ cho một phức hợp kháng thể. Muốn nhận được một kháng thể trong phức hợp ấy thì phải tiến hành tách tinh khiết. Tuy nhiên ngày nay người ta có thể nhận được kháng thể tinh khiết bằng kĩ thuật kháng thể đơn dòng. *Kháng thể đơn dòng là kháng thể do một dòng limpho bào sinh ra để chống lại một kháng nguyên nhất định.*

Sản xuất kháng thể đơn dòng. Năm 1975 Kohler và Milstein tiến hành lai tế bào u tủy (myeloma) với tế bào B đã hoạt hóa (bằng phương pháp dung hợp). Ưu điểm của tế bào u tủy là có khả năng phân chia rất nhanh trong môi trường nhân tạo. Sau đó tách riêng từng tế bào lai nuôi trong môi trường nhân tạo để chúng phân chia tạo ra dòng tế bào sinh kháng thể. Kháng thể này gọi là kháng thể đơn dòng, có khả năng chống một quyết định kháng nguyên nhất định.

Kháng thể đơn dòng được áp dụng rất rộng rãi và thay thế một số phương pháp miễn dịch và huyết thanh học thông thường trong nhiều lĩnh vực. Sau đây là một số ví dụ :

- Phát hiện một kháng nguyên chưa biết trên bề mặt tế bào.
- Xác định mức hormone để đánh giá chức năng nội tiết.
- Xác định một số protein có ý nghĩa trong chẩn đoán ung thư. Ví dụ trong ung thư gan nguyên phát có α - foetoprotein. Khi phát hiện chất này sẽ loại bỏ khối u giai đoạn sớm.
- Xác định vi sinh vật.
- Xác định các loại thuốc cấm sử dụng có trong máu (ví dụ doping). Kiểm tra nồng độ thuốc trong máu nhằm đảm bảo liều dùng không vượt quá ngưỡng độc.
- Ước chế phản ứng thải loại ghi ghép cơ quan. Thí dụ tạo kháng thể đơn dòng chống kháng nguyên đặc hiệu của limpho T.
- Miễn dịch hóa thụ động chống lại kháng nguyên tham gia vào quá trình sinh sản (tránh thai bằng phương pháp MD).

12. BỔ THỂ

Năm 1994 Pfeiffer khi trộn kháng huyết thanh chuột lang kháng *Vibrio cholerae* vào vi khuẩn này thì *V. cholerae* sẽ bị ly giải. Nhưng nếu xử lí kháng huyết thanh ở 56°C trong 30 phút thì vi khuẩn không bị ly giải nữa, nhưng tính MD vẫn truyền được từ chuột lang này sang chuột lang khác. Nếu lại thêm huyết thanh tươi vào huyết thanh đã xử lí nhiệt, khả năng ly giải lại xuất hiện. Như vậy đã có một yếu tố không bền nhiệt có mặt trong huyết thanh chuột lang cần cho sự ly giải *V. cholerae* in vitro. Về sau này Erlich gọi yếu tố đó là bổ thể (complement) và giải thích rằng khi đun nóng, bổ thể bị phá hủy nhưng kháng thể vẫn còn nguyên vẹn hoạt tính. Khi thêm huyết thanh tươi làm nguồn bổ sung bổ thể thì lại gây ly giải vi khuẩn.

Bổ thể gồm một nhóm protein huyết thanh. Tùy thuộc vào trình tự phản ứng và điều kiện biểu hiện hoạt lực của chúng mà được kí hiệu khác nhau. Hệ thống bổ thể gồm 9 protein được kí hiệu từ C₁ đến C₉ (theo trình tự phản ứng mà chúng tham gia, riêng C₄ là kí hiệu thứ tự phát hiện bổ thể). Các bổ thể từ C₁ đến C₅ là các enzym

esteraza ở dạng bất hoạt. Các bộ thể muốn hoạt động phải được hoạt hóa. Sự hoạt động này theo kiểu phản ứng dây chuyền và theo một trật tự nhất định. Một bộ thể sau khi được hoạt hóa lại có khả năng kích thích sự hoạt hóa của bộ thể tiếp theo. Sự hoạt hóa bộ thể chỉ xảy ra với các kháng thể thuộc lớp IgG (IgG₁, IgG₂, IgG₃, và IgM). Có hai con đường hoạt hóa bộ thể : con đường cổ điển và con đường nhánh. Các bước hoạt hóa bộ thể theo con đường cổ điển có thể tóm tắt như sau :

- 1 - Có sự gắn kháng nguyên với kháng thể.
- 2 - Nhận mặt phức hệ kháng nguyên kháng thể bởi C₁.
- 3 - C₄ và C₂ gắn vào vị trí liên kế với C₁ trên màng sinh chất.
- 4 - Hoạt hóa C₃. C₃ đóng vai trò trung tâm của hệ thống bộ thể
- 5 - Hình thành phức hệ C₅ - C₆ - C₇, gây nên sự hấp dẫn bạch cầu.
- 6 - Tạo phức hệ C₈ - C₉ gây li giải tế bào. Thực ra quá trình này phức tạp hơn

- Đầu tiên cần một đôi kháng thể nhận mặt và kết hợp với kháng nguyên. Protein bộ thể C₁ (gồm 3 thành phần C_{1q}, C₁₅, C_{1r}) gắn vào giữa hai kháng thể nằm gần nhau, tại phần F_c. Như vậy là C₁ được hoạt hóa.

- C₁ đã hoạt hóa lại kích thích để hoạt hóa C₂ và C₄. Điều này được thực hiện như là một enzym phân giải protein và tách protein C₂ và C₄. C₂ được tách thành C_{2a} và C_{2b}, còn C₄ được tách thành C_{4a} và C_{4b}. Rồi C_{2b} và C_{4b} kết hợp với nhau tạo thành enzym phân giải protein khác. Enzym này hoạt hóa C₃ để tách nó thành hai phần, C_{3a} và C_{3b}.

- C_{3b} bắt đầu cho một dây phản ứng gồm C₅, C₆, C₇, C₈ và C₉, được gọi dưới cái tên *phức hệ tấn công màng* (MAC - membrane attack complex). Các thành phần hoạt hóa của các protein này cùng với C₉ đóng vai trò chính trong việc tấn công màng tế bào xâm nhập.

- Tạo một lỗ thủng gọi là kênh xuyên màng, làm thất thoát nội chất của tế bào. Theo con đường nhánh thì không cần có sự tham gia của kháng thể.

- Bước đầu cần có sự tương tác giữa polisaccarit nhất định của vi khuẩn (chặng hạn của thành tế bào) và một số phức hệ kháng nguyên nhất định với các nhân tố B, nhân tố D và nhân tố P (properdin). Các nhân tố này phản ứng với C₃ để tạo thành C_{3b} lưu động trong huyết thanh. Con đường này bắt đầu khi C_{3b}, các nhân tố B, D và P gắn với polisaccarit. Con đường này không cần có sự tham gia của C₁, C₂ và C₄ và có tầm quan trọng đối với vi khuẩn Gram âm vì chúng chứa polisaccarit.

Hiệu quả sinh học của cả hai con đường đều tương tự nhau.

Viêm. C_{3a} là sản phẩm tách từ C₃. C_{5a} là sản phẩm tách từ C_{5a}. C_{3a} và C_{5a} gắn vào tế bào Mast, tế bào ưa kiềm, tiểu cầu làm thoát histamin, làm tăng tính thấm thành mạch. C_{5a} cũng có chức năng như nhân tố hướng động hấp dẫn thực bào đến vị trí cố định của bộ thể.

Opsonin hóa. Khi gắn xung quanh bề mặt tế bào vi sinh vật, C_{3b} có thể tương tác với thụ thể của đại thực bào để làm tăng khả năng thực bào. Hiện tượng này cũng gọi là opsonin hóa.

Như vậy hiện tượng opsonin hóa là sự bao bọc kháng nguyên bởi kháng thể hoặc bởi bộ thể làm cho chúng hấp dẫn hơn với đại thực bào. Thụ thể của đại thực bào sẽ gắn tới phần F_c của kháng thể hoặc với C_{3b} của bộ thể. Như vậy không phải chỉ riêng kháng thể mà C_{3b} cũng là một opsonin.

Chất gây phản vệ (Anaphylatoxin). Chất gây phản vệ là chất phá vỡ các bong nhỏ trong tế bào Mast và bạch cầu kiềm làm giải phóng histamin. Histamin gây viêm, làm tăng tính thấm của mao quản và gây co thắt cơ trơn, liên quan đến sốc phản vệ. Sốc phản vệ là một loại dị ứng và một số bộ thể có liên quan đến sốc phản vệ, mặc dù đa số đáp ứng dị ứng loại này chỉ liên quan đến hoạt động của kháng thể IgE. Phản vệ xảy ra trong quá trình hoạt hóa bộ thể C_{3a} và C_{5a} và có cả sự tham gia của C_{4a} . Về chi tiết sẽ được trình bày trong phần Miễn dịch bệnh II.

13. MIỄN DỊCH BỆNH LÝ

13.1. Quá mẫn

Thuật ngữ quá mẫn dùng để chỉ các đáp ứng kháng nguyên với các thành phần của đáp ứng miễn dịch đã hình thành trước đó, tức là khi cơ thể tiếp xúc với kháng nguyên lần thứ 2. Kháng nguyên này đôi khi gọi là dị nguyên. Khi kháng nguyên tái xuất hiện, hệ thống MD của cơ thể mẫn cảm sẽ phản ứng kịp thời bằng biện pháp phá hủy gây rối loạn hoạt động của cơ thể. Có 4 loại phản ứng quá mẫn như sau :

Loại phản ứng	Thời gian xuất hiện dấu hiệu lâm sàng	Đặc điểm	Ví dụ
Tip I (Quá mẫn phản vệ)	< 30 ph	IgE gắn với tế bào Mast hoặc tế bào ưa kiềm, phá vỡ bong trong các tế bào này giải phóng các chất hoạt tính như histamin	Sốc phản vệ do tiêm thuốc, do nọc côn trùng. Hen
Tip II (Quá mẫn gây độc tế bào, phụ thuộc kháng thể)	5 - 12 giờ	Kháng nguyên tạo kháng thể gắn với tế bào đích rồi kết hợp với bộ thể phá hoại tế bào đích	Truyền nhóm máu và Rh không phù hợp
Tip III (Phức hợp MD)	3 - 8 giờ	Hình thành phức hợp MD gồm kháng nguyên, kháng thể bộ thể gây phản ứng viêm	Bệnh huyết thanh, phản ứng Arthus
Tip IV (Quá mẫn trung gian tế bào hay quá mẫn muộn)		Không có sự tham gia của kháng thể. Kháng nguyên kích thích tạo thành tế bào T độc (T_c) để	Loại bỏ mô ghép. Tiếp xúc với da (Sơn ta)

13.1.1. Các phản ứng quá mẫn tip I (hay phản vệ)

Các phản ứng phản vệ (anaphylaxis, từ tiếng Hi Lạp phylaxis - bảo vệ, ana - phản lại tức là ngược lại với cơ chế bảo vệ của cơ thể) thường xảy ra trong vài phút sau khi người mẫn cảm tiếp xúc với kháng nguyên. Phản ứng xảy ra khi kháng nguyên phản ứng với kháng thể bám trên bề mặt tế bào Mast hay bạch cầu ưa kiềm, làm vỡ các tế bào này và giải phóng các chất trung gian hoạt mạch, chẳng hạn như histamin. Trường hợp này cũng còn gọi là *quá mẫn tức khắc* (immediate hypersensitivity) bởi vì nó xảy ra trong thời gian ngắn 5 - 30 phút sau khi tiếp xúc với kháng nguyên. Kháng nguyên gây ra đáp ứng này gọi là kháng nguyên gây dị ứng hay *dị nguyên*.

Bản chất của dị ứng. Khi không có sự hỗ trợ của các chất điều biến do tế bào T tiết ra, dòng limpho B gắn với dị nguyên không gây đáp ứng MD thông thường mà hình thành tế bào plasma tạo kháng thể IgE. Ở người bị dị ứng, thụ thể F_c của IgE gắn với vị trí đặc hiệu nằm trên tế bào Mast và bạch cầu ái kiềm. Bề mặt tế bào Mast có tới 500.000 thụ thể dành cho IgE.

Khi IgE kháng dị nguyên được tạo thành sẽ vận chuyển theo máu đến tế bào Mast và gắn với thụ thể tế bào Mast. Lần sau nếu cơ thể tái tiếp xúc với dị nguyên ấy thì dị nguyên sẽ phản ứng trực tiếp với IgE nằm trên tế bào Mast nhiều hơn là kích thích tế bào limpho B tạo kháng thể.

Hai kháng thể IgE nằm kế nhau trên bề mặt tế bào Mast sẽ nối với nhau bởi hai vị trí hoạt động của dị nguyên và làm cho tế bào Mast tăng khả năng thấm ion Ca^{++} . Ion này hoạt hóa enzym tăng cường tạo thành ATP để cung cấp năng lượng. Sự liên kết giữa IgE và kháng nguyên đã làm thay đổi không gian của thụ thể, gây biến đổi tại chỗ màng và làm thoát các bọng (degranulation) giải phóng histamin, heparin, serotonin, các nhân tố hoạt hóa tiểu cầu và hấp dẫn bạch cầu ưa axit, và bạch cầu thực bào. Mỗi chất hóa học trung gian trên đây tham gia vào phản ứng dị ứng theo cách riêng của mình.

Sự liên kết tế bào Mast với dị nguyên cũng tạo ra *prostagladin* và *leukotrien*. Mối tương tác giữa kháng nguyên và tế bào Mast làm hoạt hóa enzym esterase serin bắt đầu một loạt phản ứng tạo photphatidyl cholin. Khi Ca^{2+} chui vào tế bào, enzym photpholipaza A_2 được hoạt hóa sẽ thúc đẩy việc chuyển hóa photphatidyl cholin thành lisophotphatridyl cholin và axit arachidonic. *Prostagladin* và *leukotrien* được tạo thành từ axit arachidonic theo hai con đường enzym.

- Con đường *prostagladin* : Enzym xiclooxigenaza biến axit arachidonic thành *prostagladin* G_2 và H_2 để sau đó lại biến thành *prostagladin* D_2 , E_2 , F_2 và I_2 và *tromboxan* A_2 là các chất gây co thắt cơ trơn phế quản, còn *prostagladin* E_2 có tác dụng ngược lại, làm giãn phế quản. Các chất trung gian gây quá mẫn này đều bắt nguồn từ axit arachidonic. Các thành viên của nhóm *prostagladin* cũng tác dụng lên hoạt động của tuyến nhầy và độ dính của tiểu huyết cầu.

- Con đường *leukotrien* : Axit arachidonic chuyển hóa thành hỗn hợp các chất *leukotrien* và được gọi là các chất phản ứng chậm của phản vệ (SRS-A : slow reacting substance of anaphylaxis). *Leukotrien* có khả năng gây co thắt phế quản gấp 100 - 1000 lần histamin và *prostagladin*.

Việc đột nhiên thoát một lượng lớn các chất hoạt mạch (histamin) và các chất có hoạt tính được khác như heparin, nhân tố hoạt hóa tiểu cầu, serotonin, SRS-A từ tế bào Mast và bạch cầu ưa kiềm, đưa vào dòng máu có thể gây nên sốc phản vệ, làm co cơ trơn phế quản, dẫn đến ngạt thở... Nhiều loại phấn hoa, hạt bụi nhỏ, nọc côn

trùng, một số dược phẩm, thực phẩm có thể gây ra các phản ứng quá mẫn phản vệ kiểu này. Nhiều dị ứng gây ra bởi các chất có khối lượng phân tử thấp như penixilin tác động như một hapten. Các triệu chứng có thể là phát ban, đau thắt bụng, ỉa chảy, nôn mửa, khó thở và thậm chí dẫn đến tử vong.

Nếu các dị nguyên chui vào cơ thể qua đường tiêu hóa gây nên các triệu chứng nôn mửa, ỉa chảy, nổi mề đay... thì có thể điều trị có kết quả bằng antihistamin. Chất này trung hòa các chất trung gian của đáp ứng sinh lý và ngăn cản hoạt động cơ cơ của histamin. Nếu dị ứng tác động đến đường hô hấp dưới gây hen, thở dốc và khô khè thì chất trung gian gây co thắt đường hô hấp dưới không phải histamin mà là SRS-A. Do vậy antihistamin không dùng chữa hen mà dùng epinephrin, aminophilin hay teophilin.

Người ta cũng có thể dùng biện pháp giải mẫn cảm để điều trị dị ứng. Trường hợp này cần phải xác định rõ kháng nguyên và xử lý bằng các liều tiêm nhắc lại kháng nguyên ở dưới da. Kháng nguyên sẽ kích thích tạo kháng thể IgG hơn là IgE. IgG được tạo thành sẽ lưu động và gắn với kháng nguyên trước khi chúng kịp gắn với IgE trên tế bào Mast.

13.1.2. Quá mẫn gây độc tế bào (típ II)

Quá mẫn xảy ra khi truyền máu không phù hợp.

- *Nhóm máu ABO.* Đầu những năm 1900 Karl Landsteiner phát hiện thấy ở người có 4 nhóm máu và được kí hiệu là A, B, AB và O. Sự khác nhau giữa các nhóm máu ABO ở người là do có hoặc không có cacbon hidrat ở màng hồng cầu (xem bảng)

Nhóm máu	Kháng nguyên hồng cầu	Kháng thể	Nhóm có thể nhận
AB	A và B	Không có kháng thể	A, B, AB, O (nhận toàn năng)
A	A	KT kháng B	A, O
B	B	KT kháng A	B, O
O	Không KN	KT kháng A và kháng B	O (cho toàn năng)

Khi truyền máu không phù hợp, chẳng hạn truyền máu nhóm B cho người mang máu nhóm A, kháng nguyên trên hồng cầu B sẽ phản ứng với kháng thể kháng B có trong huyết thanh người nhận. Phản ứng kháng nguyên - kháng thể sẽ hoạt hóa bổ thể và gây hiện tượng tan hồng cầu người cho máu.

- *Hệ nhóm máu Rh.* Vào những năm 1930 người ta phát hiện các kháng nguyên bề mặt khác nhau trên hồng cầu người. Khi lấy hồng cầu khỉ Rhesus tiêm vào thỏ thì huyết thanh thỏ chứa kháng thể gây ngưng kết hồng cầu khỉ, đồng thời cũng gây ngưng kết hồng cầu của một số người. Điều đó chứng tỏ cả hồng cầu khỉ và người đều có kháng nguyên chung. Kháng nguyên này được gọi là nhân tố Rh. Ở các nước 85% dân số có kháng nguyên này, tức có hồng cầu bị ngưng kết, gọi là Rh⁺. Người không có kháng nguyên này chiếm 15% dân số gọi là Rh⁻. Kháng thể kháng Rh không có sẵn trong huyết thanh mà chỉ được tạo ra khi đưa kháng nguyên Rh vào. Trong truyền máu, nếu người cho có máu Rh⁺ còn người nhận có máu Rh⁻ thì hồng cầu

người cho sẽ kích thích tạo kháng thể kháng Rh ở người nhận. Nếu người nhận sau này được truyền máu Rh⁺ thì phản ứng tan máu sẽ xảy ra nhanh chóng.

Bệnh tan máu ở trẻ sơ sinh : Việc truyền máu không phải là con đường duy nhất để người có máu Rh⁻ trở nên miễn cảm với máu Rh⁺. Khi bố là Rh⁺ và mẹ là Rh⁻ thì 50% đứa trẻ chào đời là Rh⁺. Nếu đứa trẻ là Rh⁺ thì mẹ sẽ miễn cảm với kháng nguyên Rh trong lúc sinh. Khi màng nhau bị rách, hồng cầu Rh⁺ của bào thai sẽ vào tuần hoàn máu mẹ kích thích tạo kháng thể IgG. Nếu bào thai lần có mang sau là Rh⁺ thì kháng thể Rh sẽ lọt qua nhau và phá hủy hồng cầu bào thai. May thay ở Việt Nam bệnh này không đáng lo ngại vì gần 100% phụ nữ nước ta có hồng cầu Rh⁺. Ngày nay bệnh tan máu ở trẻ sơ sinh được loại trừ bằng phương pháp MD thụ động. Tiêm kháng thể kháng Rh (RhoGAM) có bán trên thị trường cho người mẹ Rh⁻ lần đầu để giúp loại bỏ nhân tố Rh từ bào thai lọt vào máu mẹ trước khi hệ thống MD của mẹ kịp phản ứng với kháng nguyên Rh. Nếu bệnh không được loại trừ vì trong máu đứa trẻ Rh⁺ đã nhiễm kháng thể kháng Rh của mẹ thì cần phải thay máu không nhiễm bằng truyền máu.

Phản ứng gây độc tế bào do thuốc : Hiện tượng tiểu cầu (thrombocyte) bị phá hủy do phản ứng gây độc tế bào do thuốc được gọi là *bệnh ban xuất huyết*. Phân tử thuốc thường là hapten, vì chúng có khối lượng phân tử quá nhỏ nên chưa trở thành kháng nguyên. Tuy nhiên chúng có thể gắn phủ trên bề mặt tiểu cầu và khi đó chúng lại mang tính kháng nguyên (chẳng hạn phân tử quinín). Để làm tan tiểu cầu cần có sự tham gia của cả kháng thể và bổ thể. Vì tiểu cầu rất cần cho sự đông máu, nên nếu thiếu tiểu cầu sẽ dẫn đến *xuất huyết trên da*.

Phân tử thuốc cũng có thể gắn tương tự với bạch cầu hoặc hồng cầu. Sự phá hủy các bạch cầu hạt do MD gọi là *bệnh bạch cầu hạt* và ảnh hưởng đến quá trình bảo vệ cơ thể bằng thực bào. Trường hợp hồng cầu bị phá hủy theo cách này thì gọi là *bệnh thiếu máu do tan máu*.

13.1.3. Phức hợp MD (típ III)

Phức hợp MD là phản ứng bao gồm kháng nguyên, kháng thể và bổ thể gây ra phản ứng viêm. Phản ứng típ III đòi hỏi kháng thể chống kháng nguyên hòa tan lưu động trong huyết thanh, còn phản ứng típ II đòi hỏi kháng thể nằm trên bề mặt tế bào hoặc các tổ chức. Phức hợp MD chỉ được tạo thành khi có tỉ lệ kháng nguyên, kháng thể nhất định. Kháng thể ở đây là IgG. Khi lượng kháng thể vượt quá mức sẽ dẫn đến tạo thành phức hợp gắn với bổ thể rồi nhanh chóng loại khỏi cơ thể nhờ hiện tượng thực bào. Khi lượng kháng nguyên quá mức sẽ tạo thành phức hợp hòa tan không gắn với bổ thể và do đó không gây phản ứng viêm. Ở một tỉ lệ kháng nguyên, kháng thể nhất định, thường là thừa kháng nguyên, phức hợp hòa tan được tạo thành ít và thoát khỏi thực bào. Các phức hợp này lưu động trong máu, chui qua gian bào của các tế bào màng trong của mạch máu và bị mắc ở màng. Ở đây chúng hoạt hóa bổ thể gây *phản ứng viêm khu trú*. Khi kháng nguyên cùng loại xâm nhập vào cơ thể lần sau sẽ dẫn đến phản ứng viêm nghiêm trọng hơn. Sự phá hủy do tạo thành phức hợp MD kiểu này lần đầu tiên được quan sát thấy khi tiêm nhắc lại huyết thanh ngựa cho chó đã MD. Tại nơi tiêm, sau mỗi lần tiêm, đều bị sưng đỏ hơn và cuối cùng bị hoại tử. Kiểu đáp ứng này được gọi là *phản ứng Arthus* (mang tên người phát hiện).

Bệnh viêm cầu thận là một phức hợp MD gây viêm cầu thận ở vị trí lọc máu. Kháng thể được tạo thành sẽ đáp ứng protein M của liên cầu khuẩn là nguyên nhân

gây bệnh này. Đa số các trường hợp bệnh nhân có thể chữa khỏi bằng thuốc chống viêm, tuy nhiên một số trường hợp gây nguy hại cho thận.

13.1.4. Các phản ứng quá mẫn trung gian tế bào (tip IV) hay quá mẫn muộn

Phản ứng tip IV gắn liền với đáp ứng MD trung gian tế bào và chủ yếu do tế bào T gây ra sau khi người mẫn cảm tiếp xúc lần hai với kháng nguyên. Phản ứng xảy ra không tính bằng phút hay bằng giờ như ở các tip trên, mà tính bằng ngày hay nhiều ngày. Sở dĩ xảy ra chậm vì cần có thời gian để cho các tế bào T và đại thực bào di chuyển và tập trung gần kháng nguyên lạ. Tế bào T trong quá mẫn tip IV thường là tế bào T_D . Ở một số trường hợp quá mẫn chậm dẫn tới phá hủy tổ chức có thể có sự tham gia của tế bào T_C .

Nguyên nhân gây ra phản ứng tip IV : Khi có kháng nguyên xâm nhập, đại thực bào nuốt, chế biến và trình diện cho thụ thể tế bào T (TCR).

Sự tiếp xúc giữa vị trí quyết định kháng nguyên và tế bào T tương ứng sẽ thúc đẩy tế bào T tăng sinh và biệt hóa để trở thành tế bào T chín và tế bào T nhớ. Khi người mẫn cảm theo cách này có dịp tái tiếp xúc với kháng nguyên thì sẽ tạo phản ứng trung gian tế bào. Tế bào nhớ được tạo thành từ lần tiếp xúc đầu tiên với kháng nguyên sẽ hoạt hóa tế bào T. Khi tương tác với kháng nguyên, tế bào này sẽ sản ra xitokin - là nhân tố chủ yếu của phản ứng tip IV.

Phản ứng tip IV trên da : Các triệu chứng quá mẫn thường biểu hiện trên da. Có thể lấy phản ứng test trên da đối với vi khuẩn lao làm ví dụ. Vì vi khuẩn lao thường nằm trong đại thực bào, nên chúng có thể kích thích đáp ứng MD trung gian tế bào. Khi làm test, người ta tiêm protein vi khuẩn lao vào dưới da. Nếu người được tiêm đã từng nhiễm vi khuẩn lao thì chỉ sau 1- 2 ngày sẽ xuất hiện phản ứng viêm tại chỗ.

Viêm da tại chỗ cũng là một dạng biểu hiện của phản ứng tip IV, thường là do hapten gắn với protein của da gây đáp ứng MD. Các loại dị ứng kiểu này có thể do tiếp xúc với cây sơn, kim loại trong đồ nữ trang (đặc biệt là niken), đồ hóa mỹ phẩm.

13.2. Bệnh tự miễn

Bệnh tự miễn xuất hiện khi hệ thống MD hoạt động đáp ứng với kháng nguyên của bản thân và gây tổn thương cho các cơ quan của chính mình.

Sự mất tính tự dung nạp MD : Bệnh tự MD xảy ra khi tính tự dung nạp bị mất và hệ thống MD không còn khả năng phân biệt "của mình" hay "không phải của mình". Tính dung nạp được hình thành trong suốt thời kì phát triển của bào thai hoặc ngay sau khi sinh. Một khi bào thai đã có lần tiếp xúc với kháng nguyên thì sau khi sinh nếu lại tiếp xúc với kháng nguyên đó sẽ không sinh kháng thể hoặc tế bào T mẫn cảm. Tế bào T tiếp thu khả năng phân biệt vật quen (của mình) hay lạ (không phải của mình) trong suốt thời gian ở tuyến ức. Ở giai đoạn này nếu bất kì tế bào T nào nhầm vào tế bào bản thân đều sẽ bị ức chế (do khuyết dòng) hoặc bị làm bất hoạt. Điều này làm cho tế bào T không tấn công các tế bào của bản thân. Trong bệnh tự miễn khi mất tính tự dung nạp sẽ dẫn đến việc tạo kháng thể hoặc đáp ứng bởi tế bào T mẫn cảm. Bảng dưới đây là một số ví dụ về bệnh tự miễn.

Tên bệnh	Loại quá mẫn	Biểu hiện
Tan máu	II	Phá hủy hồng cầu.
Grave	II	Kháng thể gắn vào thụ thể dành cho hocmon tuyến giáp dẫn đến tăng sản tuyến giáp và tăng hocmon tuyến giáp.
Nhược cơ năng	II	Phong bế thụ thể axetylcolinesteraza ngăn cản truyền tín hiệu thần kinh.
Ban xuất huyết chảy máu	II	Phá hủy tiểu huyết cầu.
Viêm khớp dạng thấp	III	Viêm khớp do tích tụ phức hợp IgG với anti-IgG, IgM với anti-IgM.
Luput ban đỏ hệ thống	III	Phức hợp kháng nguyên kháng thể (bao gồm các kháng thể kháng ARN, IgG hồng cầu, nhiễm sắc thể) tích lại ở nhiều nơi gây viêm. Phức hợp kháng thể kháng ADN tích ở thận.
Addison	IV	Phá hủy tế bào tuyến thượng thận tạo hocmon vỏ gây teo vỏ và giảm chức năng vỏ thượng thận.
Viêm tuyến giáp Hashimoto	IV	Phá hủy tế bào tuyến giáp.
Tiểu đường phụ thuộc insulin	IV	Phá hủy tế bào đảo tụy sản insulin.

Các phản ứng tự miễn hoặc các bệnh do chúng gây ra, về bản chất là quá mẫn gây độc tế bào (típ II) hay phức hợp MD (típ III) hoặc quá mẫn trung gian tế bào (típ IV).

Phản ứng tự miễn típ II (độc tế bào): Bệnh Grave và nhược cơ năng (myastheniagravis) là hai ví dụ về bệnh tự miễn típ II. Cả hai bệnh đều đòi hỏi phải có phản ứng giữa kháng thể và kháng nguyên bề mặt tế bào.

- Bệnh Grave do kháng thể có tên là chất kích thích tuyến giáp kéo dài gây nên. Kháng thể này gắn với thụ thể của tế bào tuyến giáp dành cho hocmon kích thích tuyến giáp do tuyến yên sinh ra. Kết quả là tuyến giáp bị kích thích, sản ra một lượng ngày càng lớn hocmon tuyến giáp. Tín hiệu rõ thấy nhất của bệnh này là bướu cổ do tuyến giáp phát triển phình to.

- Bệnh nhược cơ năng làm cho cơ bị yếu. Nguyên nhân do kháng thể gắn vào thụ thể axetylcholin tại điểm nối nơi xung thần kinh dẫn đến cơ. Cơ không nhận được tín hiệu thần kinh cần thiết, hô hấp bị dừng lại và dẫn đến tử vong.

Phản ứng tự miễn típ III (phức hợp MD):

- Bệnh luput ban đỏ hệ thống là bệnh tự miễn hệ thống, bao gồm các phản ứng của phức hợp MD. Nguyên nhân gây bệnh còn chưa rõ hoàn toàn, nhưng ở đây cơ thể đã tạo kháng thể chống kháng nguyên bản thân, như ADN thoát ra trong quá trình

phân hủy bình thường của các mô, đặc biệt là da. Tác hại nhất của bệnh là khi phức hợp MD tích tụ trong cầu thận.

- *Bệnh viêm khớp dạng thấp* là bệnh do phức hợp MD của IgG, IgM và các thành phần tích tụ ở khớp. Phức hợp MD gọi là nhân tố thấp khớp có thể được hình thành do IgM gắn vào vùng F_c của IgG bình thường. Nhân tố này được thấy ở 70% những người bị thấp khớp.

Viêm mạn tính do sự tích tụ này gây ra dần dần sẽ phá hủy sụn và xương khớp.

Phản ứng tự miễn tipe IV (trung gian tế bào), bệnh viêm tuyến giáp Hashimoto là do tuyến giáp bị tổn thương trước hết vì tế bào T của hệ thống MD trung gian tế bào. Đây là một rối loạn thông thường và hay thấy ở các thành viên trong gia đình. *Bệnh tiểu đường phụ thuộc insulin* là do các tế bào tiết insulin của tụy bị phá hủy. Các tế bào T rõ ràng liên quan đến bệnh này, động vật giống nhau về mặt di truyền phát triển bệnh tiểu đường sẽ không bị bệnh nếu bị cắt tuyến ức lúc còn nhỏ.

13.3. Suy giảm miễn dịch

Suy giảm MD là sự không đáp ứng MD đầy đủ. Người ta chia ra làm hai loại : Suy giảm MD bẩm sinh và suy giảm MD mắc phải.

Suy giảm MD bẩm sinh có ở những người khi sinh ra hệ thống MD đã bị khiếm khuyết. Sự sai sót trong gen hoặc thiếu vắng một số gen nhận từ cha mẹ có thể dẫn đến suy giảm MD. Thí dụ có những người có dấu hiệu lặn có thể không có tuyến ức do đó không có MD trung gian tế bào. Dấu hiệu lặn cũng có thể làm giảm số lượng tế bào B, ảnh hưởng đến MD dịch thể.

- *Suy giảm MD mắc phải* : Hàng loạt loại thuốc, ung thư, tác nhân truyền nhiễm có thể gây nên suy giảm MD mắc phải. Ví dụ bệnh Hodgkin (ung thư) làm giảm đáp ứng MD trung gian tế bào. Nhiều loại virus có thể gây nhiễm và giết các tế bào limpho và do đó làm giảm đáp ứng MD.

HỘI CHỨNG SUY GIẢM MD MẮC PHẢI (Acquired immunodeficiency syndrom-AIDS) *Su nhiễm HIV*. HIV là Retrovirus mang genom ARN và có enzym sao mã ngược, có vỏ lipoprotein. Trên bề mặt vỏ có các gai là glicoprotein với khối lượng phân tử 120.000, nên được gọi tắt là gp 120. Các gai này cho phép HIV gắn vào thụ thể CD₄ của tế bào chủ. Các thụ thể này có ở tế bào T và đại thực bào đó là các tế bào đích chính của HIV. Ngoài ra thụ thể CD₄ còn có ở một số tế bào limpho khác và các tế bào biểu mô. Một số tế bào không có thụ thể CD₄ cũng có thể bị nhiễm HIV nhưng với tần số thấp.

Sau khi HIV xâm nhập vào tế bào, nhờ enzym sao mã ngược, sợi ARN của virus sẽ sao thành ADN, rồi gắn vào ADN nhiễm sắc thể của tế bào chủ dưới dạng tiền virus. Vì vậy kháng thể chống HIV không ngăn cản được bệnh. Virus cũng thoát khỏi sự bảo vệ MD bằng cách thay đổi tính kháng nguyên rất nhanh chóng. Tỷ lệ tạo thành ADN đột biến từ ARN rất cao, đến nỗi gần như mỗi lần sao bộ gen HIV đều có sai sót, nên mỗi hạt virus tạo thành ít nhất cũng khác nhau ở chỗ nào đó. HIV cũng có thể thoát khỏi hệ thống MD do chúng nằm trong không bào của đại thực bào. Hơn nữa các tế bào nhiễm cũng có thể dung hợp với các tế bào không nhiễm để nhân lên mà không phải chạm trán với kháng thể lưu động.

AIDS xảy ra ở cuối giai đoạn nhiễm HIV. Kể từ khi bắt đầu nhiễm virus đến khi xác định được kháng thể chống HIV mất khoảng 6 tháng. Quá trình tiến triển được chia làm 3 loại :

Loại A : Nhiễm trùng có thể không biểu hiện triệu chứng hoặc gây sưng hạch limpho. Nồng độ tế bào T CD₄ trong máu là 500/mm³ hoặc hơn.

Loại B : Xuất hiện các triệu chứng do tế bào T CD₄ trong máu giảm còn 200 - 499/mm³ và hệ thống MD bị yếu đi. Dễ bị nhiễm *Candida albicans* dai dẳng ở mồm, họng và âm hộ. Các triệu chứng phụ bao gồm mắc bệnh Zona, ỉa chảy dai dẳng, đốm trắng niêm mạc miệng, và có triệu chứng ung thư hoặc ung thư tiền phát, chẳng hạn u cổ.

Loại C : Là giai đoạn lâm sàng. Hàm lượng tế bào T CD₄ còn 200/mm³ hoặc ít hơn. Tế bào T CD₄ chiếm 14% tổng số tế bào T. Bắt đầu xuất hiện nhiều triệu chứng AIDS. Quan trọng nhất là nhiễm *Candida albicans* ở thực quản, phế quản và phổi, mất nhiễm citomegalo virus, lao, viêm não do Toxoplasma và ung thư Kaposi.

Nhiều bệnh xuất hiện kèm với HIV như các bệnh do động vật nguyên sinh, virus, vi khuẩn, nấm, ung thư hoặc ung thư tiền phát... Dưới đây là một số bệnh cơ hội đi kèm với AIDS.

Tác nhân gây bệnh	Bệnh
Động vật nguyên sinh <i>Pneumocystis carinii</i> <i>Cryptosporidium parvum</i> <i>Toxoplasma gondii</i> <i>Isospora belli</i>	Viêm phổi nguy kịch đến tính mạng Ỉa chảy dai dẳng Viêm não Viêm dạ dày - ruột
Vi rút <i>Cytomegalovirus</i> <i>Herpes simplex</i> <i>Varicella-zoster</i>	Sốt, viêm não, mù Bọng da và màng nháy Bệnh Zona (shingle)
Vi khuẩn <i>Mycobacterium tuberculosis</i> <i>Mycobacterium avium-intracellulare</i>	Lao Có thể nhiễm vào nhiều cơ quan, viêm dạ dày ruột, và các triệu chứng biến đổi khác.
Nấm <i>Blastoplasma capsulatum</i> <i>Cryptococcus neoformans</i> <i>Candida albicans</i>	Nhiễm phổi Viêm màng não nguy kịch tính mạng Bội nhiễm ở niêm mạc miệng và âm hộ (Loại B) Bội nhiễm ở thực quản phổi (loại C)
Ung thư hoặc trạng thái tiền ung thư <i>Ung thư Kaposi</i> <i>Leukoplakia</i>	Ung thư da và mạch máu Đốm trắng ở niêm mạc.

Thời gian kể từ khi nhiễm HIV đến khi phát bệnh là 10 năm. Do thời gian ủ bệnh lâu nên khó biết trung bình có bao nhiêu người nhiễm HIV chuyển thành AIDS. Một số người nhiễm HIV còn sống khá lâu. Tuy nhiên trẻ em nhiễm HIV do mẹ truyền vì thiếu hệ thống MD hoàn chỉnh như ở người lớn nên thường bị chết trong vòng một năm.

Cơ chế truyền HIV. Muốn truyền HIV cần có sự tiếp xúc với thể dịch của cơ thể. Quan trọng nhất là máu, thường chứa từ 10 đến 1000 hạt virus nhiễm trùng (IP - infection particles) trong 1 ml và tinh dịch chứa 10 - 50 IP/ml. Virus chứa trong tế bào lưu động trong thể dịch đặc biệt là đại thực bào. Sự nhiễm HIV thông qua : 1 - Truyền máu và tiêm thuốc có nhiễm máu, 2 - Cấy ghép mô, 3 - Quan hệ tình dục, 4 - Thông qua sữa mẹ và tiêm chích ma túy. Có lẽ nguy hiểm nhất vẫn là quan hệ tình dục vì rất khó kiểm soát. Thông thường truyền từ nam sang nữ nhiều hơn từ nữ sang nam. Các loại quan hệ tình dục kể cả đồng tính luyến ái, quan hệ tình dục bằng miệng đều có thể bị nhiễm HIV. Ở Sahara (châu Phi), tỉ lệ nhiễm HIV ở các cặp quan hệ tình dục khác giới giữa nam : nữ là 1 : 1, nhưng ở Mĩ là 13 : 1. Đặc biệt tỉ lệ nhiễm rất cao ở những người tiêm chích ma túy. Ở Việt Nam trong số những người nhiễm HIV, trên 70% là người tiêm chích ma túy. Những người tiêm chích ma túy, hành nghề mại dâm được xếp vào nhóm có nguy cơ nhiễm cao.

Nghiên cứu phòng trừ : Có hai phương hướng cơ bản : Nghiên cứu điều trị bằng thuốc và nghiên cứu vacxin phòng trừ.

Hóa trị liệu : Dịch tác dụng của thuốc là enzym sao mã ngược và proteinaza, ví dụ từ năm 1987 đã thử sử dụng điều trị AIDS bằng Zidovudin (AZT - 3' azido- 2'-3' dideoxymitidine). AZT tác động theo cơ chế cạnh tranh. Enzim sao mã ngược gắn AZT vào sợi ADN đang phát triển của virus, nơi timidin đáng lẽ được gắn bình thường. Phân tử ADN sẽ kết thúc tổng hợp vì nucleozit tiếp theo không thể được gắn vào AZT.

Từ thành công bước đầu về AZT, các nucleozit tương tự cũng được thử nghiệm. Năm 1991 đã thử ddI (dideoxyisidine) cho các bệnh nhân không đáp ứng với AZT. Nucleozit thứ ba là ddC (dideoxycytidine, đã được dùng thử vào giữa năm 1992. ddT được dùng cho bệnh nhân không đáp ứng với AZT và ddI.

Việc sử dụng immunotoxin gắn độc tố vào kháng thể, cũng bước đầu thành công. Gắn kháng thể vào glycoprotein nằm trên bề mặt tế bào nhiễm và độc tố sẽ giết tế bào đích. Có hai loại immunotoxin, một loại dùng ngoại độc tố của *Pseudomonas* độc tế bào và một loại dùng rixin (chất ức chế tổng hợp protein).

Các nhà sinh hóa tại Viện nghiên cứu ung thư Quốc gia (Mĩ) sử dụng ARN vô nghĩa gắn vào ARN thông tin do gen *rev* của virus sao làm cho protein của virus không được tổng hợp. Năm 1993, nhóm Flossie Wong - Staal ở trường đại học Tổng hợp California và San Diego đã thử nghiệm gen trị liệu (gen therapy) chống HIV ở người bệnh. Các tế bào T bị nhiễm sẽ được lấy ra từ mỗi bệnh nhân. Các tế bào từ một số bệnh nhân sẽ nhận được ADN chứa gen mã hóa ribozim. Các tế bào của bệnh nhân đối chứng nhận được ADN không có gen mã hóa ribozim. Các tế bào sẽ tạo dòng, sau đó lại được đưa vào người đã lấy chúng. Các test trong phòng thí nghiệm cho thấy ribozim đã cắt genom của virus và làm giảm rất đáng kể sự nhân lên của chúng.

Năm 1993 nhiều bệnh viện đã bắt đầu thử nghiệm liệu pháp tế bào gọi là "CELLector". Người ta dùng kháng thể đơn dòng để tách các tế bào TCD₈ khỏi bệnh phẩm AIDS. Các tế bào T_c nhận mặt HIV sẽ tạo dòng và hàng tỉ tế bào này sẽ được đưa trở lại vào người bệnh để diệt HIV.

Vacxin : Các vacxin thử nghiệm đang được chế tạo từ kháng nguyên gp 120 và các glycoprotein khác của vỏ virus HIV. Người ta cho rằng kháng thể kháng gp 120 không chỉ tấn công virus tự do mà còn phong bế gp 120 trên bề mặt tế bào T đã bị nhiễm, nhờ thế ngăn chặn sự dung hợp tế bào và sự truyền từ tế bào này sang tế bào khác. Các thử nghiệm trên người đã bắt đầu thực hiện để xác định khả năng gây

đáp ứng miễn dịch và tính an toàn của vaccin. Dương nhiên điều này rất khó vì người tình nguyện đang không bị nhiễm HIV sau khi tiêm vaccin lại bị nhiễm ngay giai đoạn sớm. Các nhà nghiên cứu không chờ đợi để biết liệu vaccin có thực sự ngăn cản AIDS trong vòng 3 - 5 năm, bởi vì bệnh này phát triển rất chậm.

Năm 1987 công ti Microgenesys sử dụng gp 160 làm vaccin. Người ta tách gen gp 160 khỏi HIV - nhận bằng phương pháp công nghệ di truyền rồi gắn vào baculovirus của bướm. Virut phát triển trong tế bào nuôi cấy mô, sau đó thu protein từ mô để làm vaccin.

Sự thành công của vaccin chống HIV không phải một sớm một chiều, tuy nhiên người ta tin rằng nhất định sẽ kích thích đáp ứng MD mạnh hơn ở người bệnh.

14. CÁC PHẢN ỨNG HUYẾT THANH

Nhiều phản ứng MD phụ thuộc vào phản ứng kháng nguyên, kháng thể. Như ta đã biết, kháng thể phản ứng đặc hiệu với kháng nguyên kích thích sinh ra nó. Kháng thể có trong huyết thanh, do đó những nghiên cứu in vitro về mối tương tác giữa kháng nguyên và kháng thể có sử dụng huyết thanh được gọi là *huyết thanh học*.

Vì kháng thể không thể nhìn thấy được bằng mắt thường, nên chỉ có thể xác định được khi chúng gắn với kháng nguyên đặc hiệu. Phản ứng kháng nguyên, kháng thể có thể được xác định thông qua sự kết tủa, ngưng kết, cố định bổ thể, sự phát huỳnh quang, hoạt tính enzym và gắn với chất đông vị phóng xạ. Có nhiều phương pháp khác nhau dùng để xác định mối tương tác giữa kháng nguyên và kháng thể.

Phản ứng kết tủa : Khi cho kháng thể đặc hiệu phản ứng với *kháng nguyên hòa tan* ở liều lượng chuẩn sẽ xuất hiện kết tủa có thể nhìn thấy bằng mắt thường. Phản ứng này được dùng phổ biến để phát hiện kháng nguyên khi đã có sẵn kháng thể đặc hiệu hoặc để phát hiện kháng thể khi đã có sẵn kháng nguyên hòa tan đặc hiệu. Phản ứng kết tủa bị ức chế khi có quá thừa kháng nguyên hoặc kháng thể. Sự kết tủa tối ưu khi có nồng độ kháng nguyên kháng thể thích hợp.

Phản ứng ngưng kết : Ở phản ứng kết tủa đòi hỏi phải có kháng nguyên hòa tan, còn ở phản ứng ngưng kết lại cần các kháng nguyên hữu hình. Đó là các kháng nguyên có kích thước lớn như hồng cầu và tế bào vi sinh vật. Kháng nguyên hữu hình có các epitop bề mặt có thể liên kết chéo với các kháng thể tạo thành từng cụm có thể nhìn thấy bằng mắt thường. Kháng thể trong phản ứng này gọi là kháng thể gây ngưng kết. Phản ứng ngưng kết nhạy hơn phản ứng kết tủa nên được dùng để định tính và bán định lượng kháng thể trong huyết thanh.

Đầu tiên cho kháng nguyên hữu hình vào dãy ống nghiệm có độ pha loãng tăng dần (ống 1 - $\frac{1}{20}$, ống 2 - $\frac{1}{40}$, ống 3 - $\frac{1}{80}$...). Hiệu giá kháng thể là độ pha loãng cao nhất mà vẫn xảy ra ngưng kết. Chẳng hạn ở ống thứ 3 có độ pha loãng lớn nhất mà vẫn quan sát thấy ngưng kết thì ta nói hiệu giá của kháng huyết thanh là 80.

Phương pháp cải tiến gọi là ngưng kết gián tiếp hay ngưng kết thụ động, có thể gây ngưng kết các kháng nguyên hòa tan nhưng trước đó đã gắn nó trên bề mặt các chất trợ hữu hình làm giá đỡ, như hồng cầu, hạt bentonit hoặc hạt latex. Các hạt này khi được kháng nguyên hòa tan, bao bọc sẽ phản ứng như thể chính chúng mang tính đặc hiệu của kháng nguyên phủ bên ngoài.

Phản ứng kết hợp bổ thể : Trong phản ứng này có 2 hệ thống (xem phần bổ thể).

Hệ thống 1 bao gồm kháng thể - kháng nguyên - bổ thể. Nếu kháng nguyên đặc hiệu với kháng thể thì sẽ kết hợp được với bổ thể, còn nếu không đặc hiệu với kháng thể thì không kết hợp được với bổ thể, nên bổ thể ở dạng tự do. Do phản ứng không nhìn thấy được nên phải dùng hệ thống 2 làm chỉ thị.

Hệ thống 2 bao gồm hồng cầu cừu, huyết thanh kháng hồng cầu cừu đã đun nóng để phá bổ thể.

- Nếu ở hệ thống 1 (tức khi ta xét nghiệm) kháng nguyên đặc hiệu với kháng thể thì sẽ không có bổ thể ở trạng thái tự do. Khi thêm hệ thống 2 vào phản ứng, hồng cầu cừu không bị tan : Phản ứng dương tính.

- Ngược lại nếu ở phản ứng ta xét nghiệm (hệ thống 1) kháng nguyên không đặc hiệu với kháng thể sẽ không kết hợp với bổ thể. Khi thêm hệ thống 2, bổ thể tự do sẽ kết hợp với hệ thống 2 và làm tan hồng cầu cừu : Phản ứng âm tính.

Kĩ thuật huỳnh quang MD : Trong kĩ thuật này kháng thể (hoặc kháng nguyên) được đánh dấu bằng thuốc nhuộm huỳnh quang. Kĩ thuật dựa trên tính chất của thuốc nhuộm khi được kích thích bởi bức xạ có bước sóng đặc hiệu sẽ phát sáng. Chẳng hạn fluorescein phát huỳnh quang màu vàng lục, còn rodamin phát huỳnh quang màu đỏ da cam. Kháng thể gắn thuốc nhuộm huỳnh quang gọi là kháng thể đánh dấu hoặc kháng thể huỳnh quang. Có hai phương pháp : *kĩ thuật huỳnh quang MD trực tiếp*. Ở kĩ thuật này chỉ có hai thành phần : Kháng nguyên và kháng thể, tạo ra hai lớp của phản ứng. Một trong hai thành phần được gắn trực tiếp với thuốc nhuộm huỳnh quang. Ví dụ khi xác định *Streptococcus pyogenes* từ họng bệnh nhân đầu tiên ta có định tiêu bản trên phiến kính sau đó phủ kháng thể huỳnh quang lên. Cho kháng thể gắn với tế bào vi khuẩn. Rửa để loại bỏ kháng thể không gắn rồi quan sát dưới kính hiển vi huỳnh quang. Chỉ có các vi khuẩn đặc hiệu với kháng thể huỳnh quang mới được quan sát.

Kĩ thuật huỳnh quang MD gián tiếp : Ở kĩ thuật này ngoài hai thành phần chính là kháng nguyên và kháng thể đặc hiệu tạo ra hai lớp của phản ứng còn có một thành phần nữa được gắn với thuốc nhuộm huỳnh quang, tạo lớp thứ ba. Lớp này có thể là kháng - kháng thể (kĩ thuật kháng thể huỳnh quang gián tiếp). Kháng thể tương tự với kháng thể trong lớp đầu (kĩ thuật bánh mì kẹp chả).

Các bước bao gồm : (a) - Cho kháng thể không đánh dấu (kháng huyết thanh bệnh nhân) phản ứng với kháng nguyên (vi khuẩn gây bệnh). (b) - Dùng kháng thể đánh dấu (kháng thể huỳnh quang kháng - kháng thể người) phản ứng đặc hiệu với kháng thể đã gắn với kháng nguyên. Rửa để loại bỏ kháng thể không gắn rồi soi dưới kính hiển vi huỳnh quang. Kĩ thuật này nhạy hơn và được dùng rộng rãi hơn kĩ thuật trực tiếp. Thường dùng để phát hiện kháng thể ở người bệnh vì không cần lượng lớn mẫu.

Thí nghiệm MD phóng xạ (Radioimmunoassay - RIA) : Đây là thí nghiệm do Rosalym Yalow đề nghị năm 1960 để xác định nồng độ insulin trong huyết tương. Nhờ phát minh này mà bà được tặng giải Nobel năm 1977. Ngày nay phương pháp này thường được dùng để xác định hormone, thuốc, glucagon, globulin MD, các kháng nguyên virus...

Phương pháp dựa trên sự cạnh tranh giữa kháng nguyên đánh dấu đồng vị phóng xạ (ví dụ ^{125}I) với kháng nguyên không đánh dấu phóng xạ gắn vào kháng thể đặc hiệu. Ở lò A (đối chứng), lấy một lượng nhất định kháng nguyên tinh khiết đánh dấu phóng xạ. Kháng nguyên này cùng loại với kháng nguyên trong mẫu thử nghiệm. Trộn

kháng nguyên đánh dấu trên với lượng tương đương kháng thể đặc hiệu, rồi ủ. Rửa kháng nguyên đánh dấu tự do (không gắn với kháng thể). Đo độ phóng xạ của phức hệ kháng nguyên - kháng thể (A).

Ở lô B (kiểm nghiệm), ngoài kháng nguyên đánh dấu và kháng thể như trên còn trộn thêm kháng nguyên không đánh dấu trong mẫu thử. Kháng nguyên không đánh dấu sẽ cạnh tranh với kháng nguyên đánh dấu gắn vào kháng thể. Rửa kháng nguyên đánh dấu tự do. Đo độ phóng xạ của phức hệ kháng nguyên - kháng thể (B). Dựa vào tỉ lệ độ phóng xạ đo được $\frac{A}{B}$ để xác định nồng độ kháng nguyên trong mẫu thử khi so với đường cong chuẩn.

ELISA - Kỹ thuật chất hấp phụ miễn dịch gắn enzym (Enzyme - Linked Immunosorbent Assay) : Đây là kỹ thuật khá nhạy và đơn giản, cho phép xác định kháng nguyên hoặc kháng thể ở nồng độ rất thấp (khoảng 0,1 ng/ml). So với kỹ thuật MD phóng xạ thì kỹ thuật này rẻ tiền và an toàn hơn mà vẫn bảo đảm độ chính xác như nhau.

Nguyên tắc của kỹ thuật này giống như kỹ thuật MD huỳnh quang, nhưng khác ở chỗ thay vì gắn kháng thể với thuốc nhuộm huỳnh quang thì người ta gắn kháng thể với một enzym. Khi cho thêm cơ chất thích hợp vào phản ứng, enzym sẽ thủy phân cơ chất thành một chất có màu. Sự xuất hiện màu chứng tỏ đã xảy ra phản ứng đặc hiệu kháng thể với kháng nguyên, và thông qua cường độ màu mà biết được nồng độ kháng nguyên cần phát hiện.

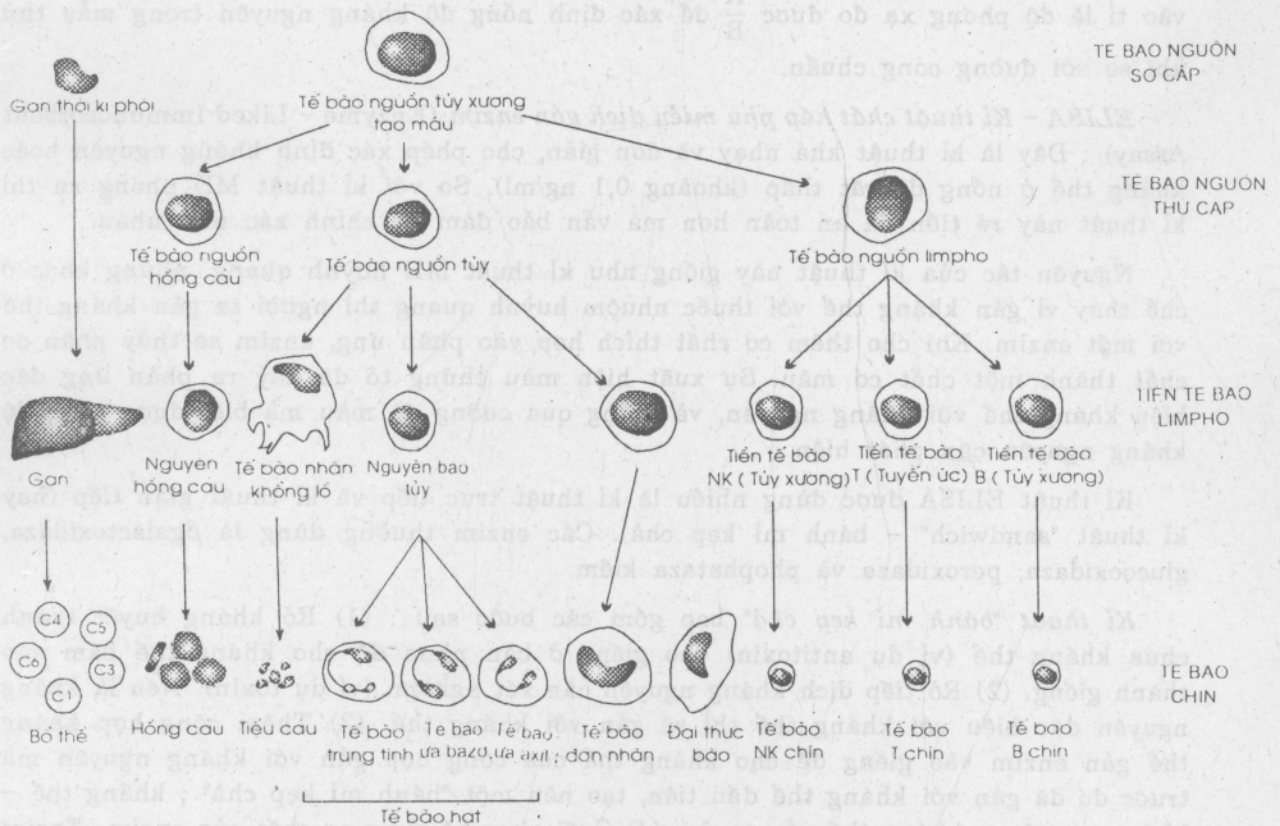
Kỹ thuật ELISA được dùng nhiều là kỹ thuật trực tiếp và kỹ thuật gián tiếp (hay kỹ thuật "sandwich" - bánh mì kẹp chả). Các enzym thường dùng là β galactoxidaza, glucosidaza, peroxidaza và phosphataza kiềm.

Kỹ thuật "bánh mì kẹp chả" bao gồm các bước sau : (1) Rửa kháng huyết thanh chứa kháng thể (ví dụ antitoxin) vào giếng ở bản nhựa để cho kháng thể bám vào thành giếng. (2) Rửa tiếp dịch kháng nguyên cần xét nghiệm (ví dụ toxin). Nếu là kháng nguyên đặc hiệu với kháng thể thì sẽ gắn với kháng thể. (3) Thêm cộng hợp kháng thể gắn enzym vào giếng để cho kháng thể của cộng hợp gắn với kháng nguyên mà trước đó đã gắn với kháng thể đầu tiên, tạo nên một "bánh mì kẹp chả" ; kháng thể - kháng nguyên - kháng thể gắn enzym. (4) Cuối cùng bổ sung cơ chất của enzym. Enzym thủy phân cơ chất làm thay đổi màu dung dịch. Tốc độ thủy phân của enzym tỉ lệ thuận với lượng kháng thể đã gắn enzym, cũng có nghĩa là tỉ lệ thuận với lượng kháng nguyên cần xét nghiệm. Sự thay đổi màu dung dịch có thể nhìn thấy bằng mắt thường hoặc đo được bằng quang phổ kế.

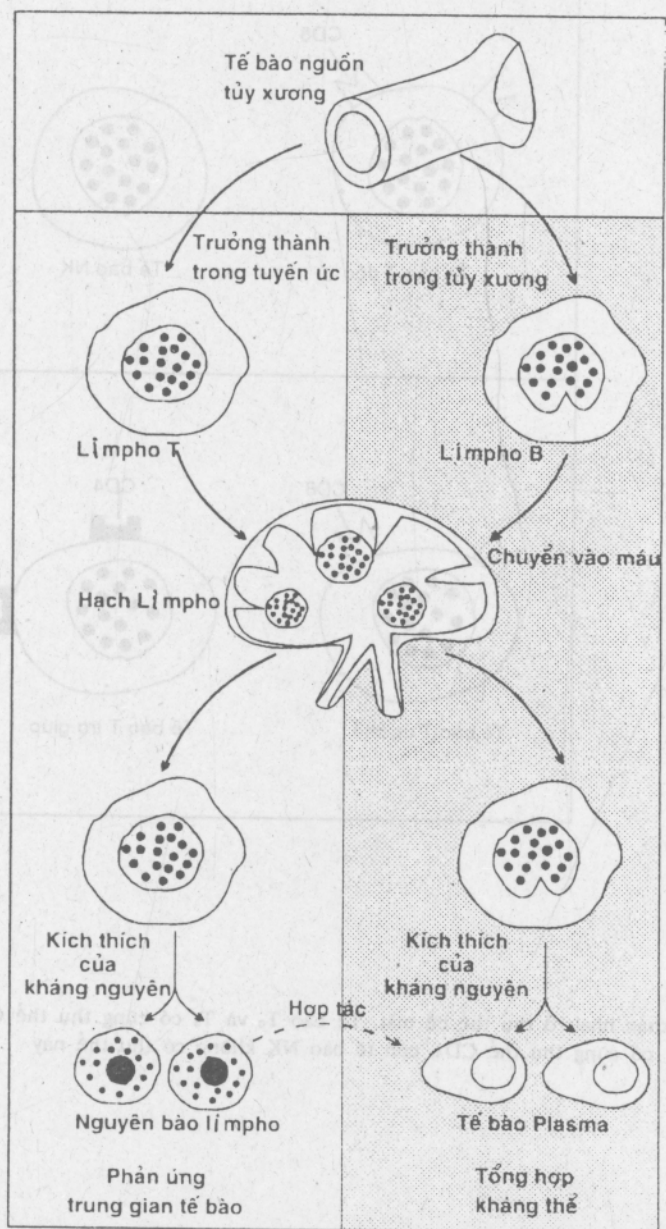
Kỹ thuật hấp phụ MD gián tiếp. Kỹ thuật này thường được dùng để định tính và định lượng kháng thể. Chẳng hạn dùng để xác định kháng thể kháng HIV.

(1). Rửa dịch kháng nguyên cho hấp phụ lên thành giếng. (2) Rửa tiếp kháng huyết thanh (chứa kháng thể) cần xét nghiệm rồi ủ. Nếu trong huyết thanh có chứa kháng thể đặc hiệu với kháng nguyên thì sẽ gắn với nó. (3) Thêm cộng hợp kháng - kháng thể đã gắn enzym. Kháng thể này được tạo thành để chống kháng thể người. (4) Thêm cơ chất của enzym. Tốc độ thủy phân cơ chất gắn liền với sự thay đổi màu dung dịch và tỉ lệ thuận với lượng kháng thể cần xác định trong mẫu. Sự thay đổi màu có thể quan sát bằng mắt thường hoặc bằng quang phổ kế.

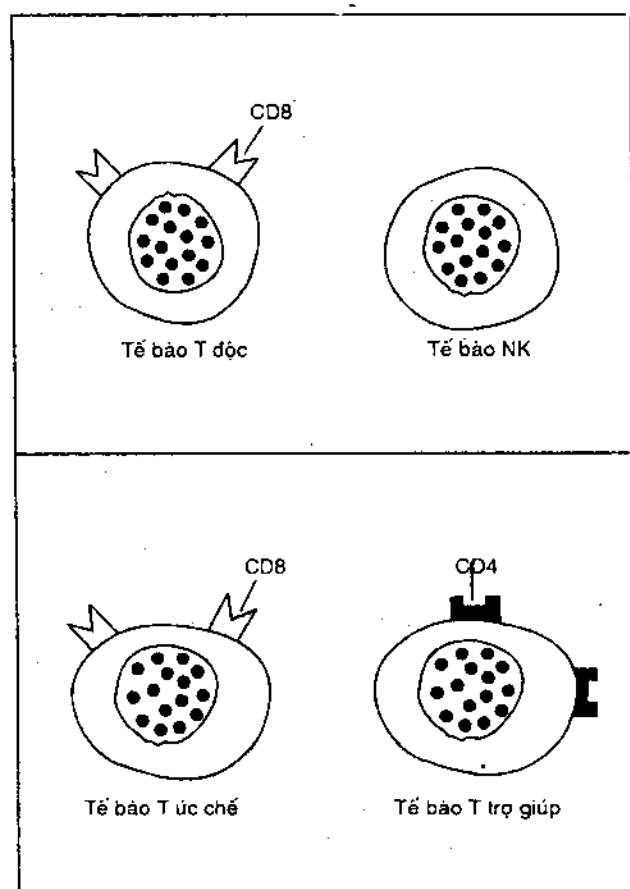
ELISA được dùng để xác định nhiều tác nhân gây bệnh như virus, vi khuẩn, nấm sợi, kí sinh (protozoa).



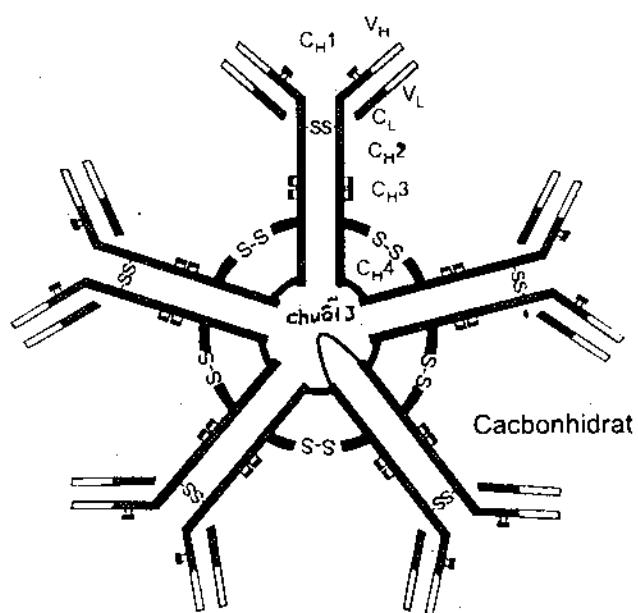
Nguồn gốc các tế bào tạo máu và tế bào tham gia vào hệ MD



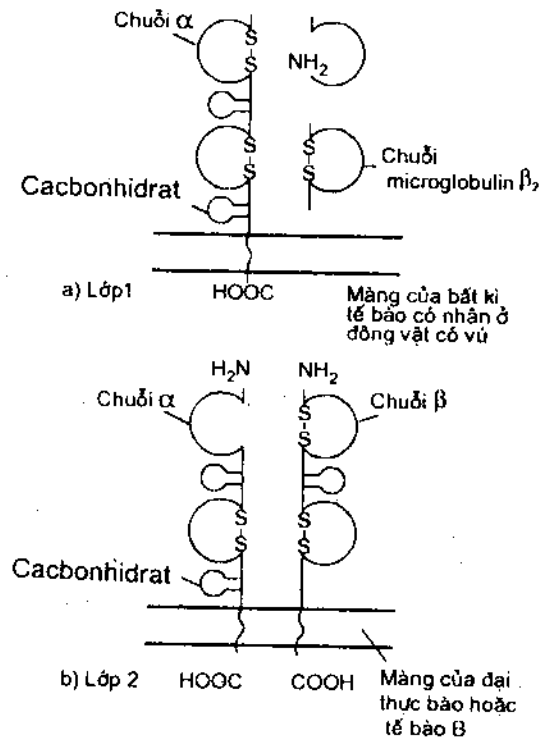
Tế bào T và B biệt hóa ở các nơi khác nhau trong cơ thể, trong tủy xương và trong tuyến ức, sau đó vận chuyển đến hạch limpho. Nếu bị kháng nguyên kích thích, tế bào T hoạt hóa tham gia vào phản ứng MD trung gian tế bào, còn tế bào B được hoạt hóa tham gia vào đáp ứng MD dịch thể



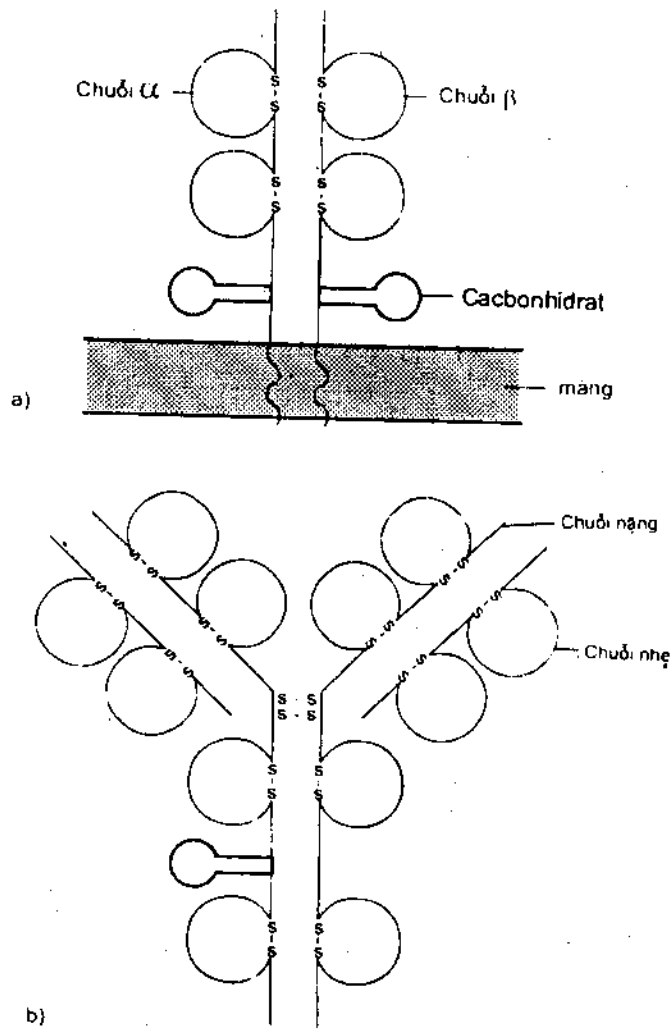
Các tế bào T biệt hóa, khác nhau ở thụ thể bề mặt. Tế bào T_c và T_s có cùng thụ thể CD_8 . Tế bào T_H và T_D có cùng thụ thể CD_4 , còn tế bào NK không có thụ thể này.



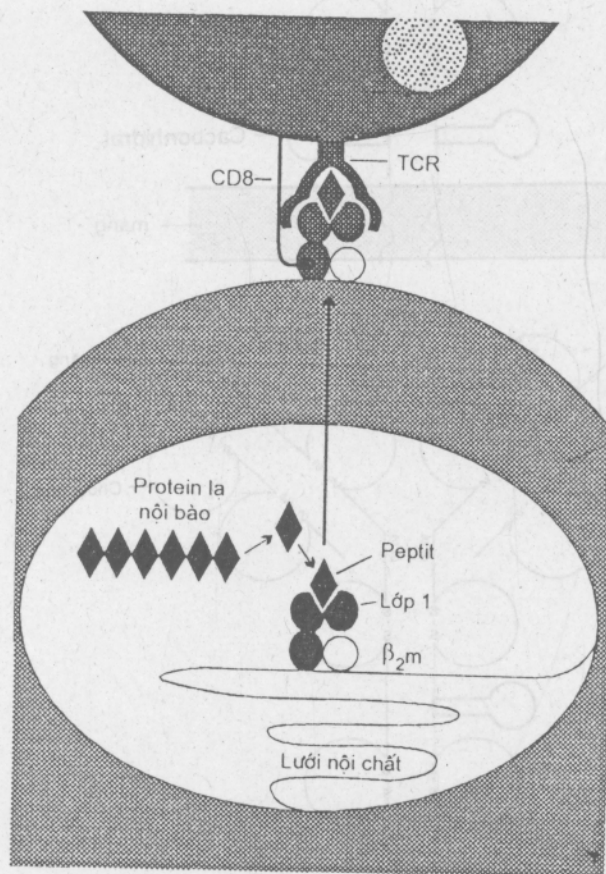
Cấu trúc I_gM. Kháng thể có kích thước lớn gồm 5 phân tử kết hợp với nhau thành hình sao, tạo ra 10 vị trí kết hợp kháng nguyên



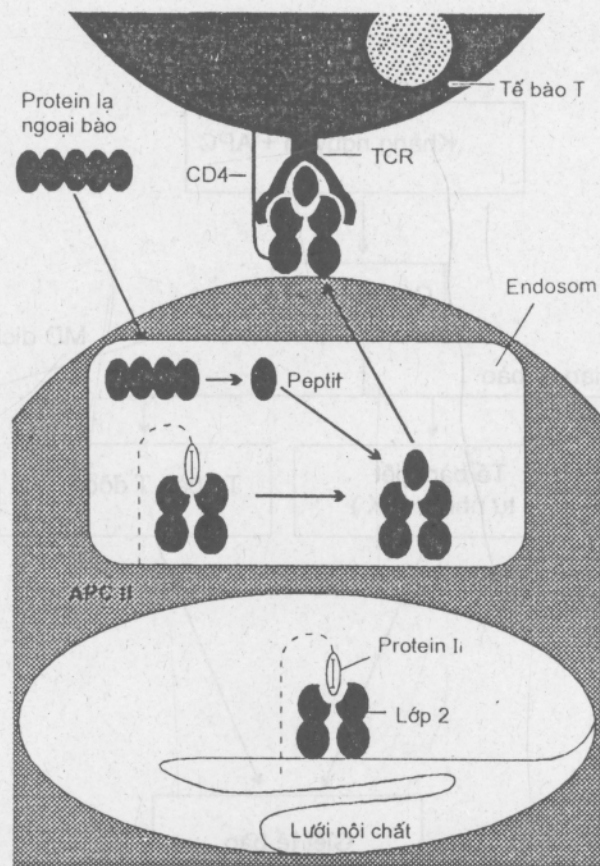
So sánh cấu trúc của thụ thể tế bào T (TCR) (a), với cấu trúc kháng thể (b)



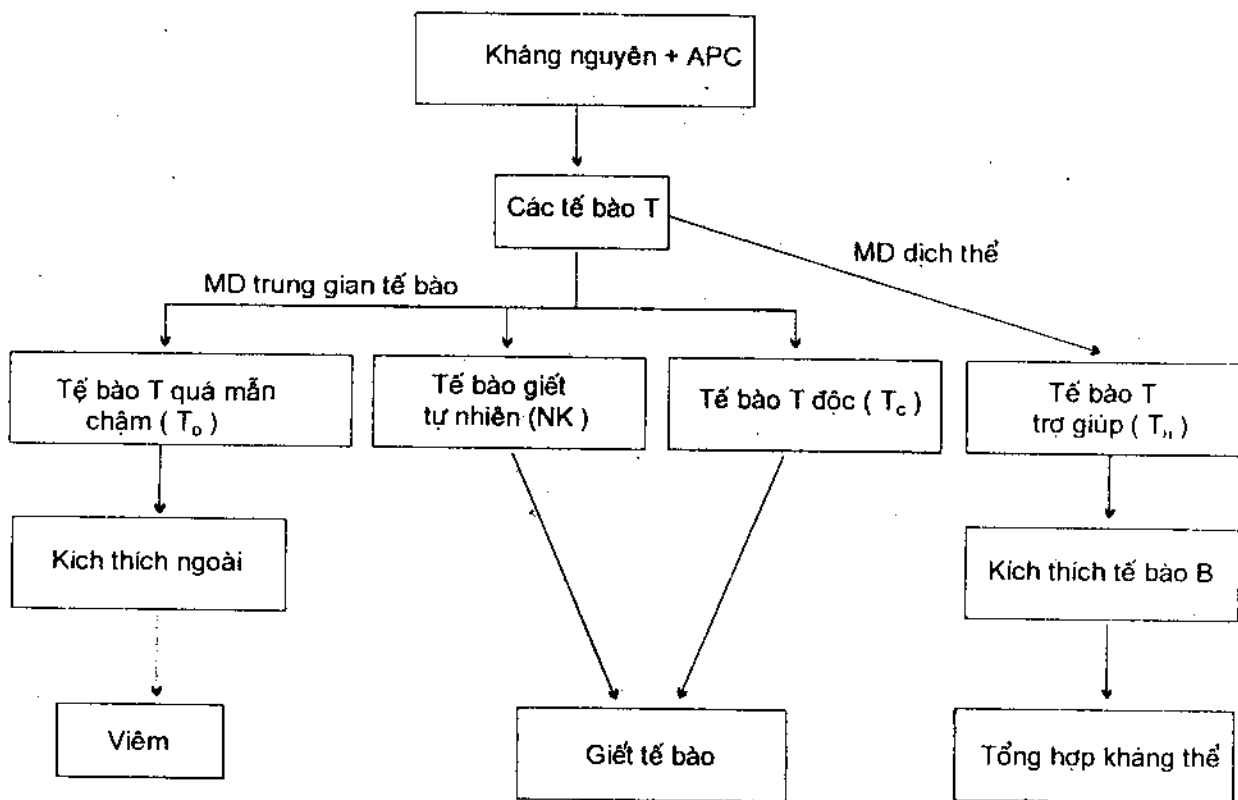
Cấu trúc của protein phù hợp tổ chức chính : (a) lớp I, (b) lớp II. Nhớ rằng các phân tử lớp I nằm trên bề mặt tất cả các tế bào có nhân, còn các phân tử lớp II chỉ có trên bề mặt các tế bào trình diện kháng nguyên đã biệt hóa, chẳng hạn đại thực bào và tế bào B



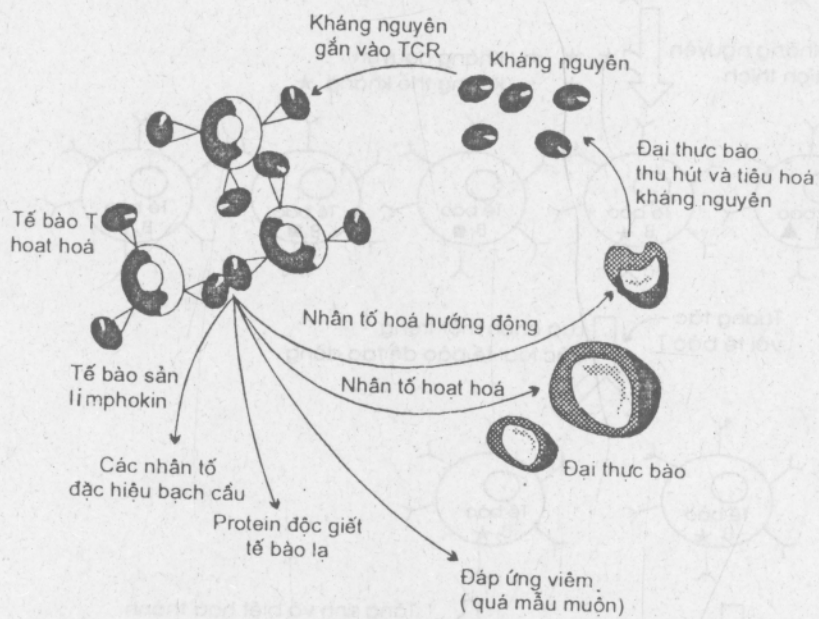
Nhận diện kháng nguyên nhờ protein MHC lớp I. Protein lớp I được tạo thành và tích lũy trong lưới nội chất, cùng với các protein khác (như kháng nguyên virus và ung thư). Một số protein này bị tiêu hóa trong lưới nội chất tạo thành peptit. Các peptit này gắn với protein lớp I rồi chuyển ra mặt tế bào. Ở đây chúng tương tác với TCR trên mặt tế bào Tc. Đồng thụ thể CD8 trên mặt tế bào Tc cũng đồng thời gắn với MHC lớp I tạo nên phức hệ mạnh hơn, sau đó tế bào Tc sản ra limphokine, và xitokine là các protein diệt tế bào đích. Bất kì tế bào có nhân nào cũng có thể hoạt động như một tế bào trình diện kháng nguyên (APC) cho phân tử lớp I



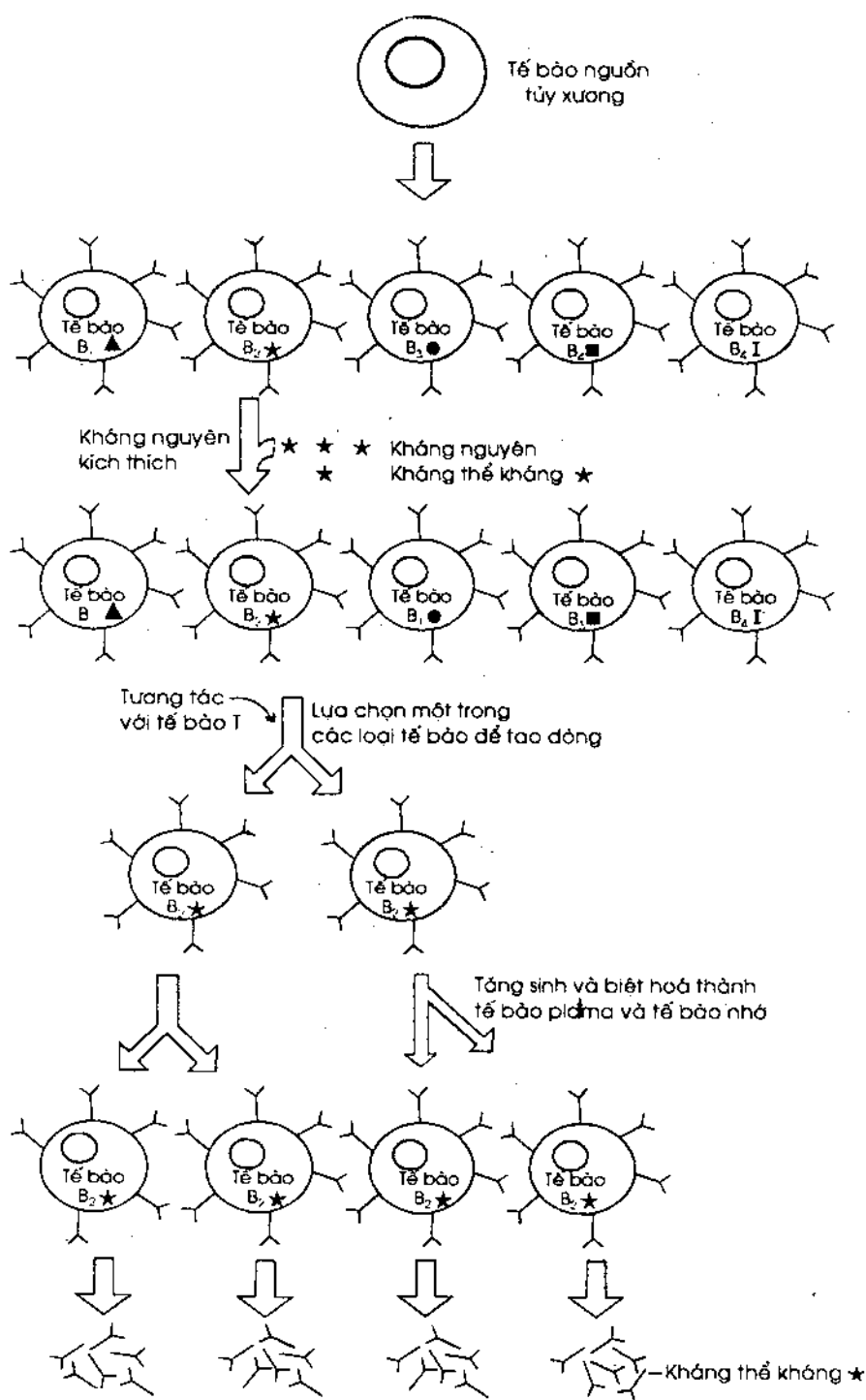
Sự nhận diện kháng nguyên nhờ phân tử protein lớp II. Protein lớp II được tạo thành và tích lũy trong lưới nội chất cùng với protein chặn (blocking protein) P_i (invariant chain) chuỗi không đổi. Chuỗi này ngăn không cho lớp II gắn với các peptit khác cũng được tạo thành trong lưới nội chất. Sau đó lớp II đi vào hạch nhân. Tại đây protein P_i và protein lạ từ bên ngoài vào sẽ bị tiêu hóa nhờ enzym protein lớp II lại được gắn với peptit lạ đã tiêu hóa tạo phức hợp đưa ra mặt tế bào. Phức hợp này tương tác với TCR và đồng thụ thể CD_4 của tế bào T_H . Tế bào này sản ra limphokin kích thích tế bào B tạo kháng thể. Tế bào APCII là đại thực bào hoặc tế bào B



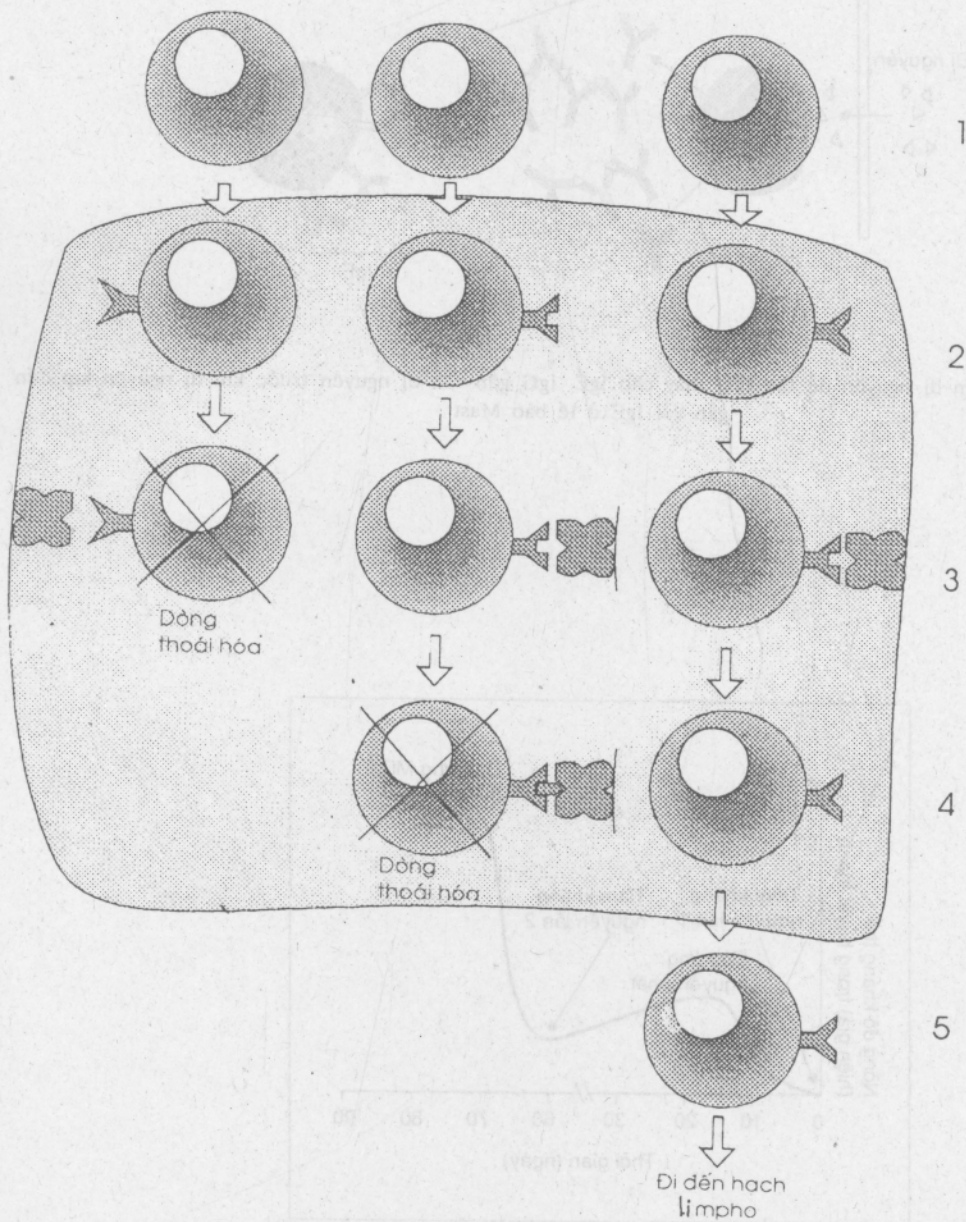
Sơ đồ tổng quát về MD trung gian tế bào và mối quan hệ với MD dịch thể



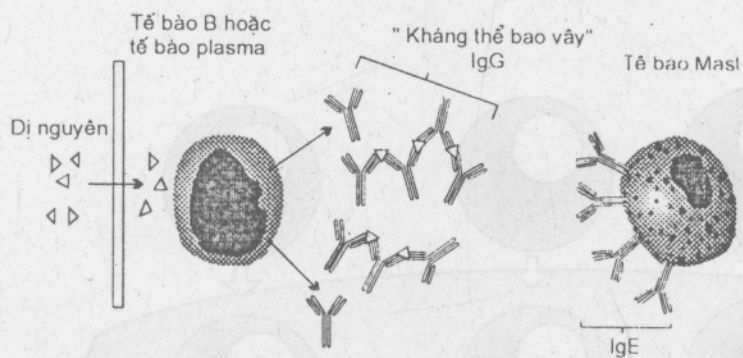
Hoạt tính của lymphokin trong MD tế bào



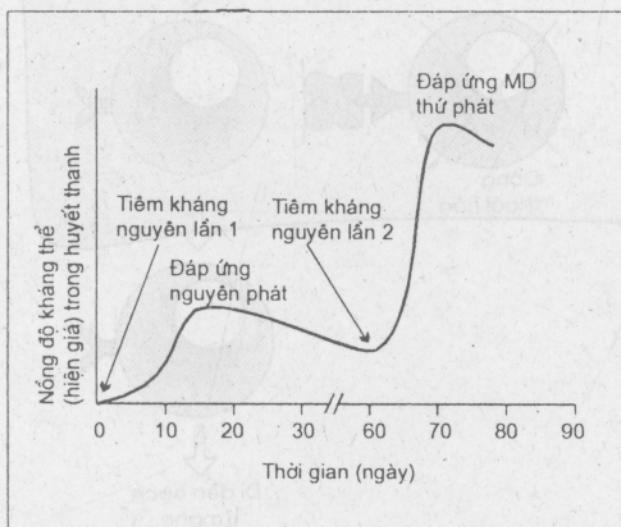
Mô hình thuyết chọn lọc dòng. Kháng nguyên lựa chọn loại tế bào B phù hợp, kích thích tạo dòng tế bào B tổng hợp kháng thể



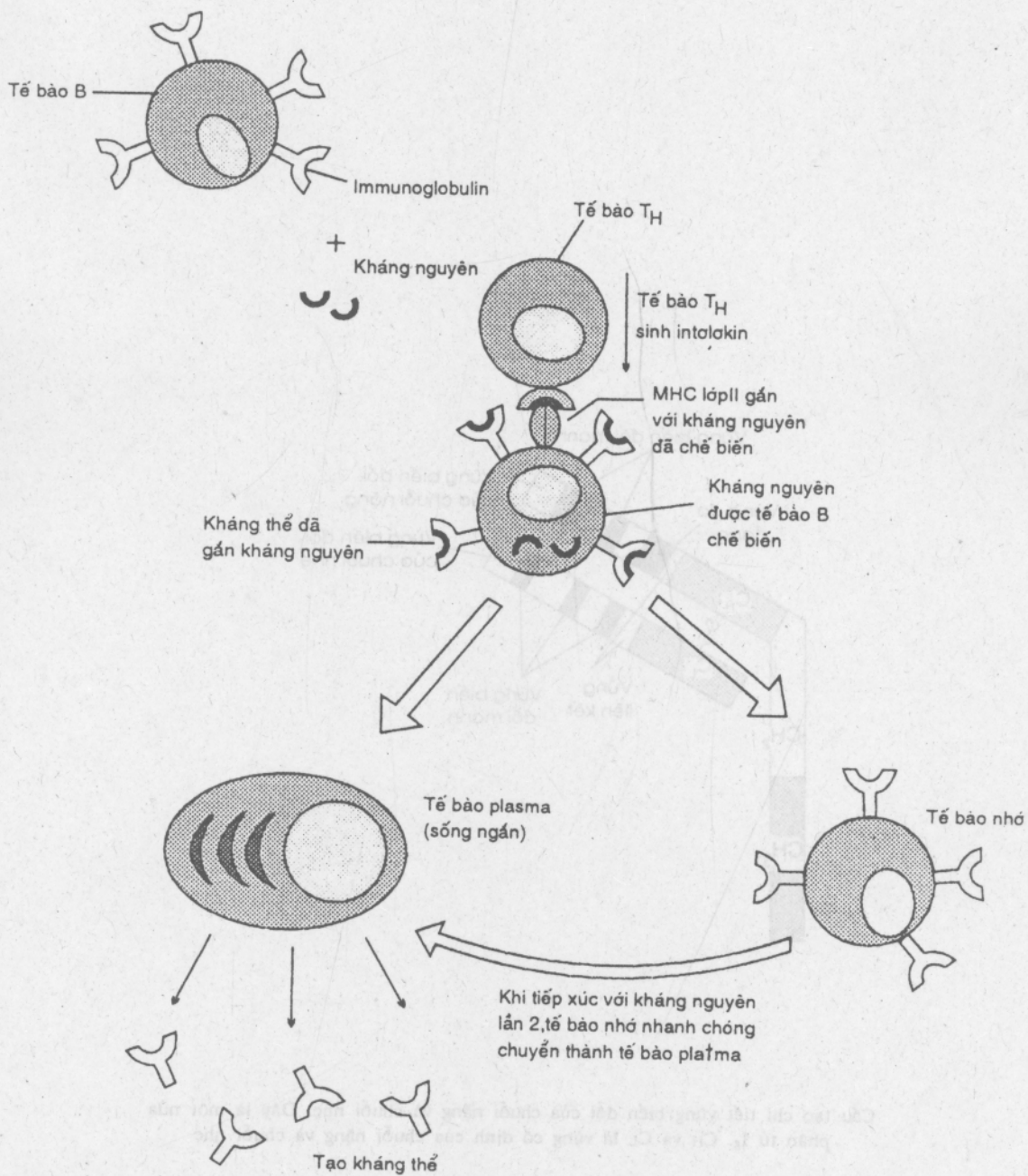
Dung nạp tế bào T (ghi chú theo hàng ngang). Hàng 1 : Tiền tế bào T bắt nguồn từ tủy xương. Hàng 2 : Thu thể tế bào T phát triển trên mặt tế bào T ở tuyến ức. Hàng 3 : *Chọn lọc dương tính* : Tế bào T tương tác với MHC trong tuyến ức, phân chia và tăng sinh (giữa và phải). Tế bào T không tương tác được với MHC sẽ ngừng tăng sinh và chết - dòng thoái hóa (trái). Hàng 4 : *Chọn lọc âm tính*. Nếu tế bào T tương tác với kháng nguyên bản thân và MHC sẽ bị chết - dòng thoái hóa (giữa). Hàng 5 : Tế bào T tương tác với kháng nguyên lạ, sau đó rời tuyến ức vào hạch bạch huyết



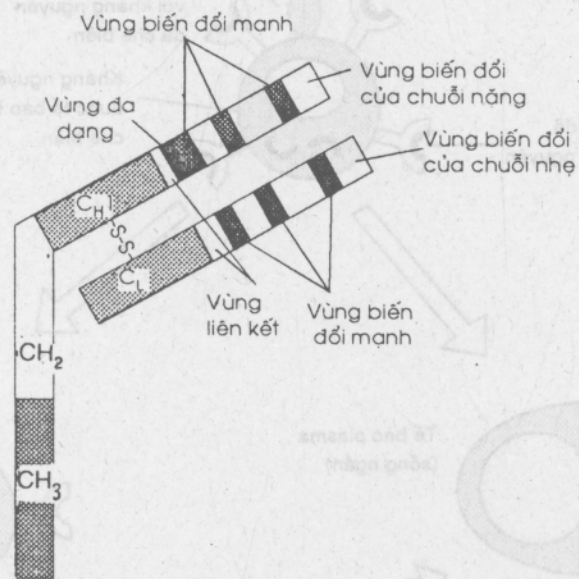
Giải mẫn cảm. Tiêm dị nguyên để tạo IgG thay cho IgE. IgG gắn vào dị nguyên trước khi dị nguyên kịp đến gắn với IgE ở tế bào Mast



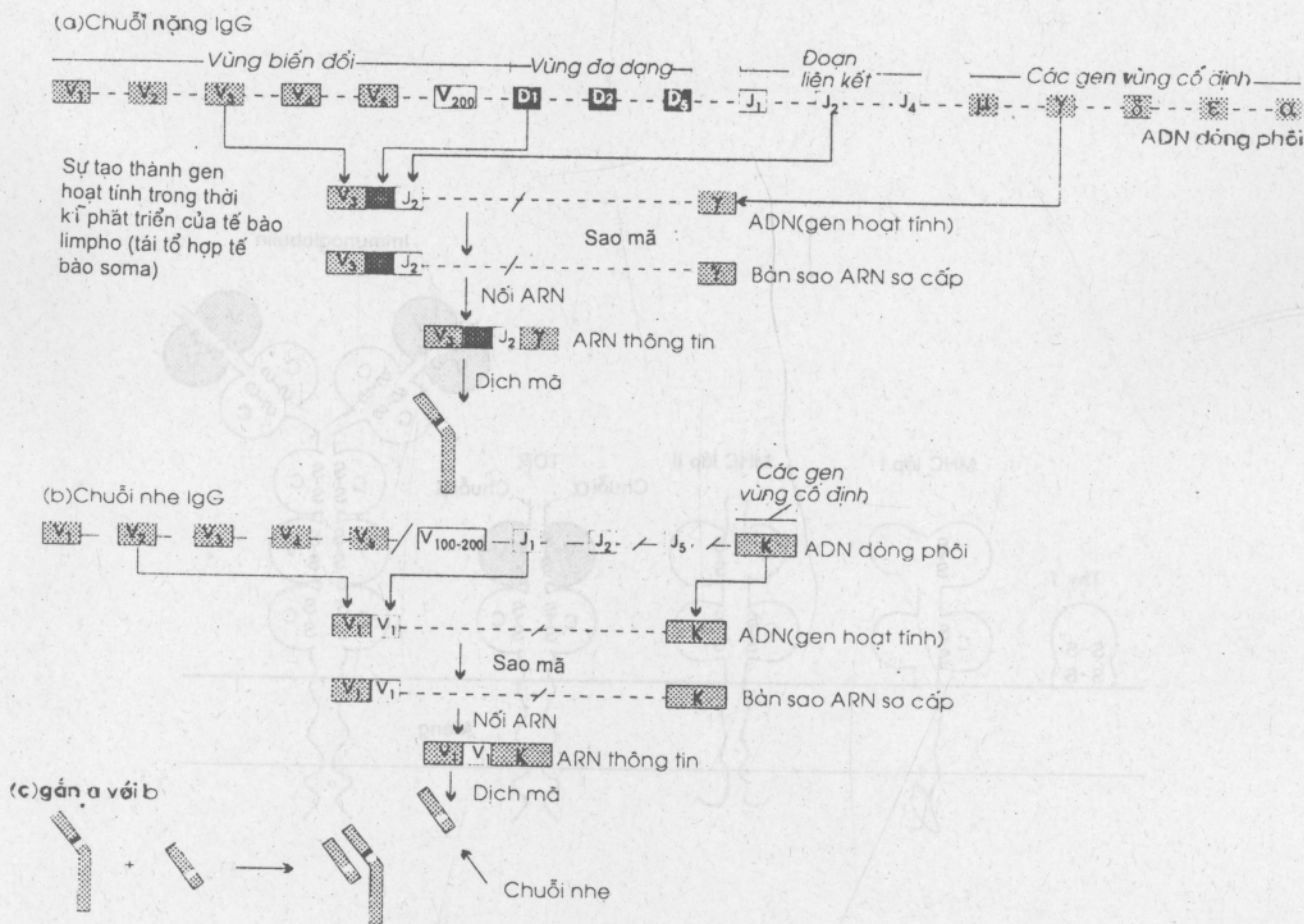
Đáp ứng nguyên phát được đặc trưng bởi pha lag dài và chậm hình thành kháng thể, ngược lại ở đáp ứng thứ phát thời gian pha lag ngắn, sự tạo kháng thể nhanh

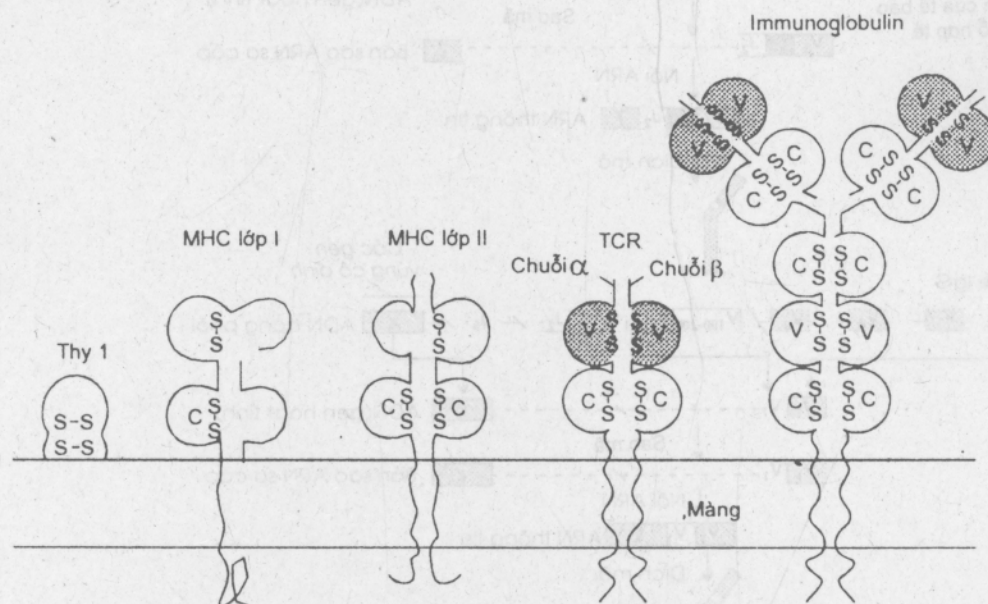


Mối tương tác giữa tế bào TB và sự tạo thành kháng thể. Tế bào B hoạt động như một APC, tập trung kháng nguyên gắn vào thụ thể là kháng thể đặc hiệu. Sau khi được chế biến, kháng nguyên được trình diện tế bào T_H nhờ gắn với MHC lớp II. Về phần mình, tế bào T_H phát tín hiệu cho chính tế bào B tăng sinh để tạo tế bào plasma và tế bào B nhớ

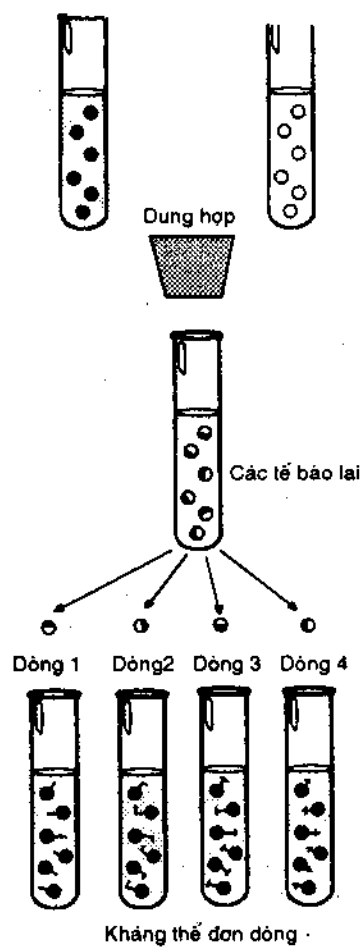


Cấu tạo chi tiết vùng biến đổi của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ. Đây là một nửa phân tử I_g . CH và CL là vùng cố định của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ

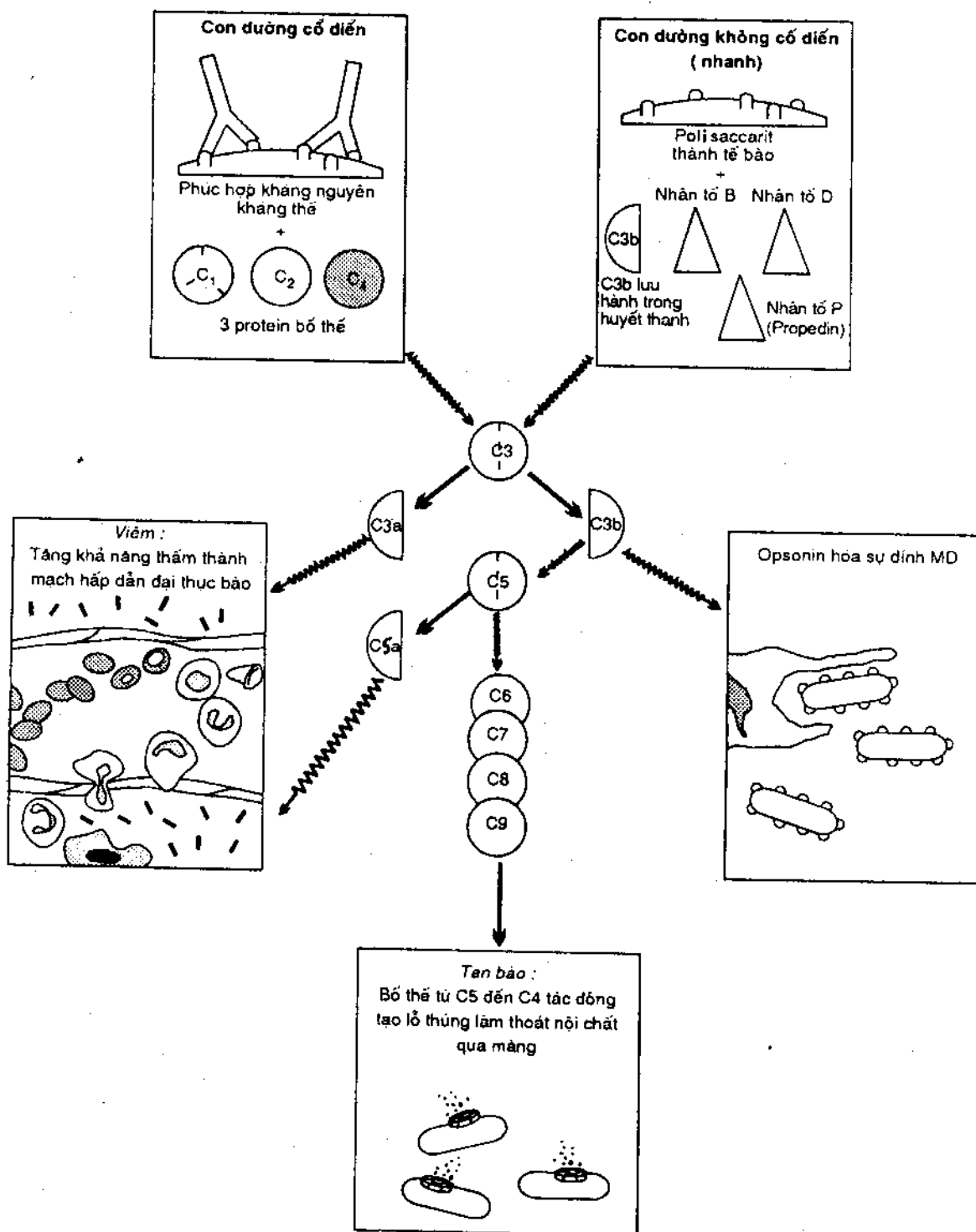




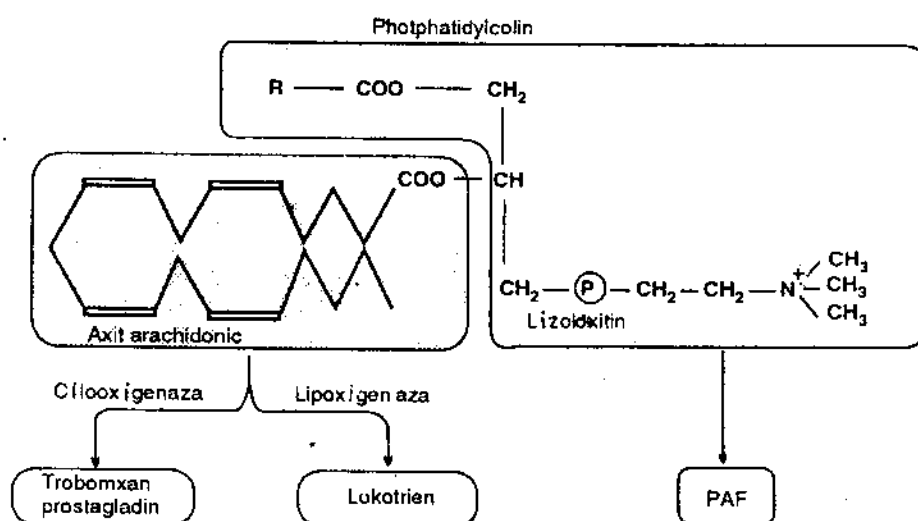
So sánh cấu trúc một số phân tử của hệ thống MD. Vùng có trật tự axit amin đồng nhất hoặc gần như đồng nhất thể hiện mối quan hệ tiến hóa. c - vùng cố định, v - vùng biến đổi



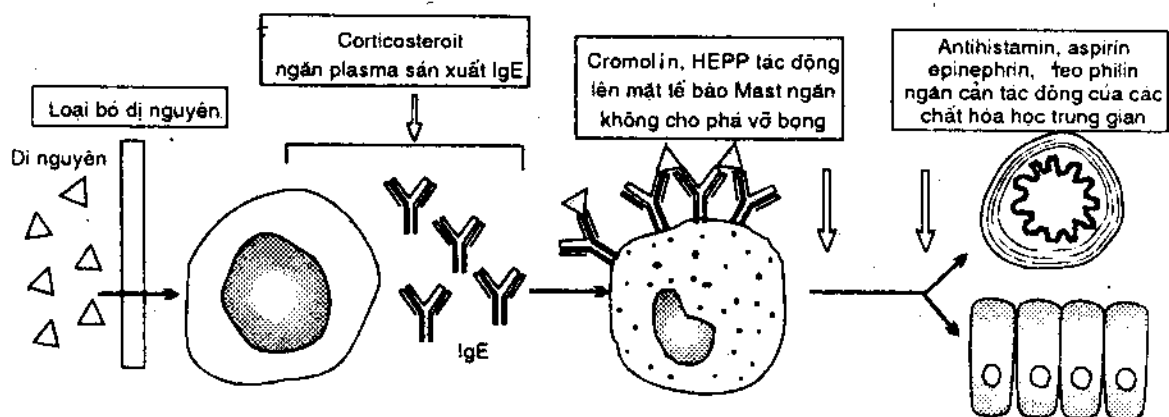
Mô hình sản xuất kháng thể đơn dòng. Lai tế bào B có các gen mã hóa IgG đặc hiệu với tế bào u tủy mieloma để tạo tế bào lai. Các dòng tế bào lai sẽ nhanh chóng sản ra các kháng thể tinh khiết



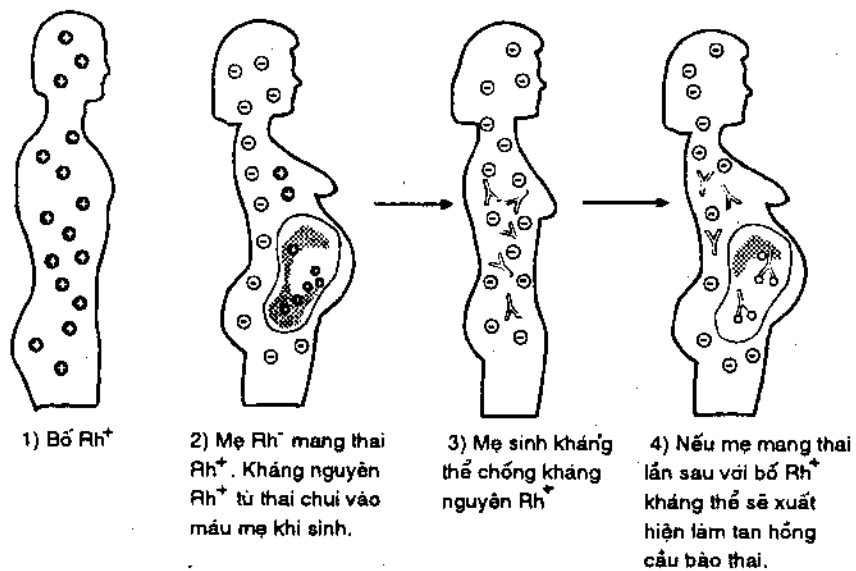
Hoạt hóa bổ thể theo 2 con đường : Cổ điển và nhánh. Bổ thể C₃ được phân thành C_{3a} và C_{3b}. Các mảnh này tham gia vào 3 loại phản ứng : Viêm, tan bào và opsonin hóa



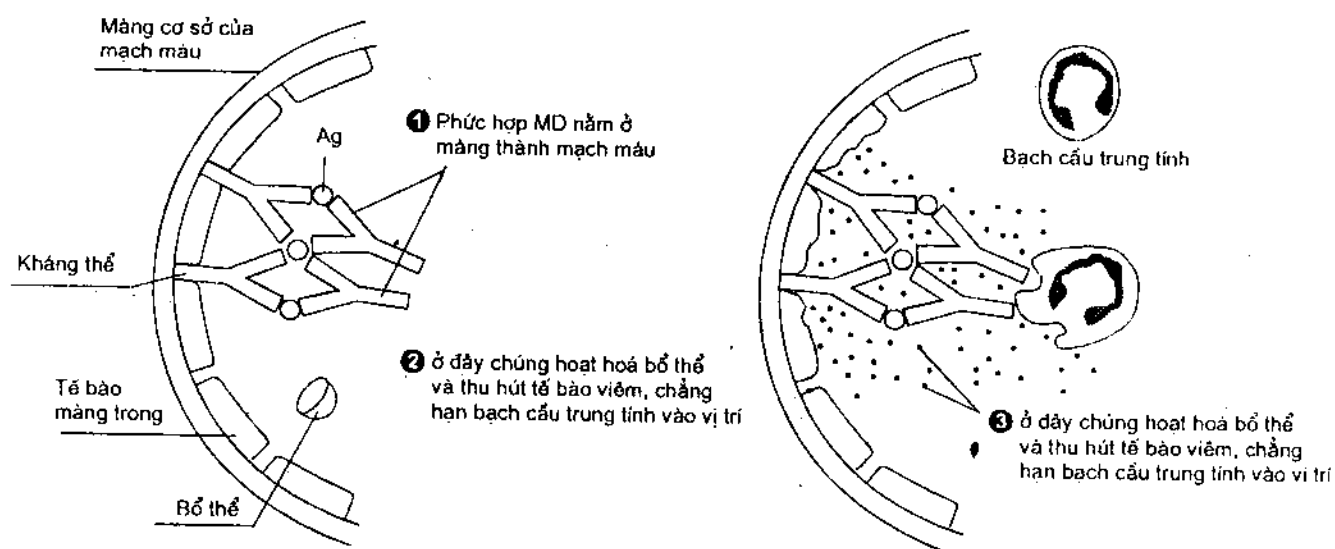
Sự tạo thành Prostagladin và lokotrien từ axit arachidonic



Phương pháp truyền thống ngăn ngừa tác động của dị nguyên

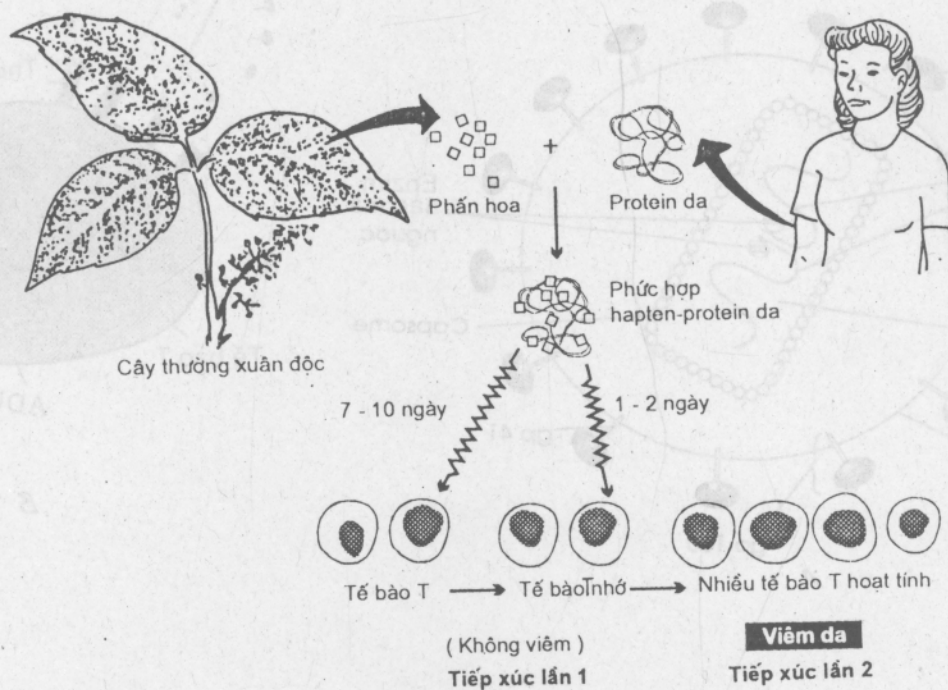


Bệnh tan máu ở trẻ sơ sinh

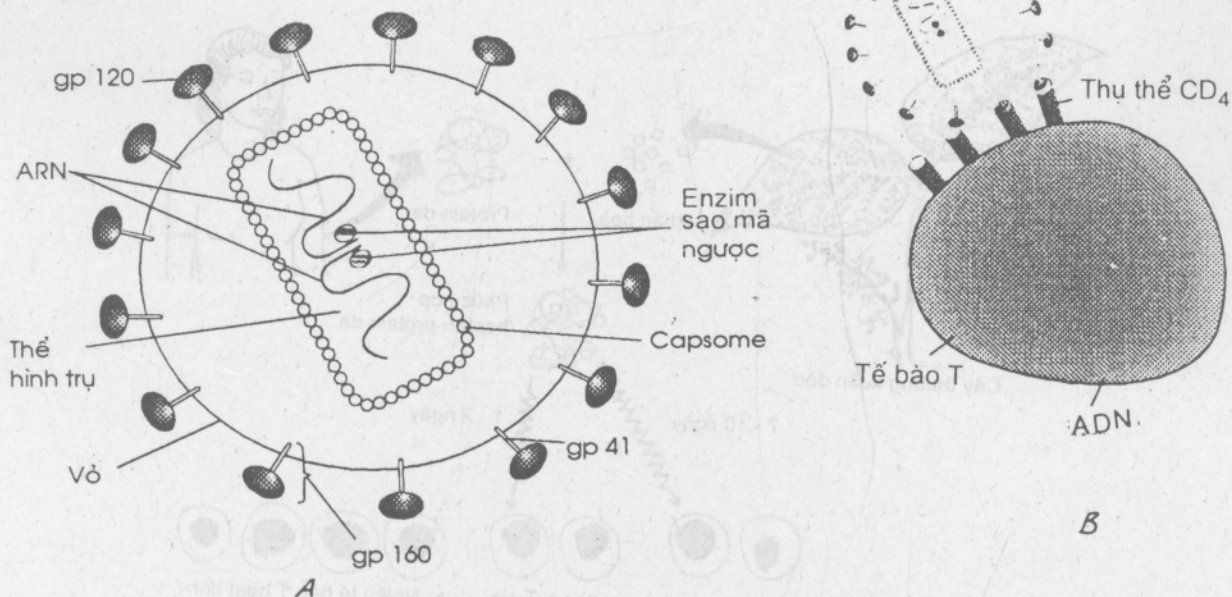


Quá mẫn trung gian - phức hợp MD (tip III)

- 1 - Phức hợp MD nằm ở màng thành mạch máu
- 2 - Ở đây chúng hoạt hóa bổ thể và thu hút tế bào viêm, chẳng hạn bạch cầu trung tính vào vị trí
- 3 - Khi phản ứng với phức hợp MD, bạch cầu trung tính tiết enzym phá hủy tế bào mô

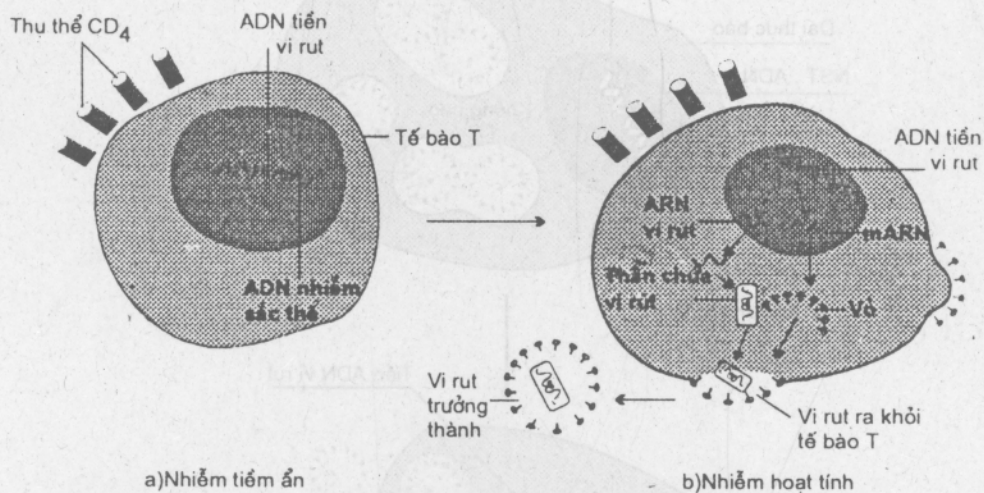


Viêm da dị ứng : Phần hoa là hapten, khi kết hợp với protein của da sẽ trở thành kháng nguyên thực thụ gây đáp ứng MD. Lần tiếp xúc đầu chưa gây viêm, lần sau gây viêm

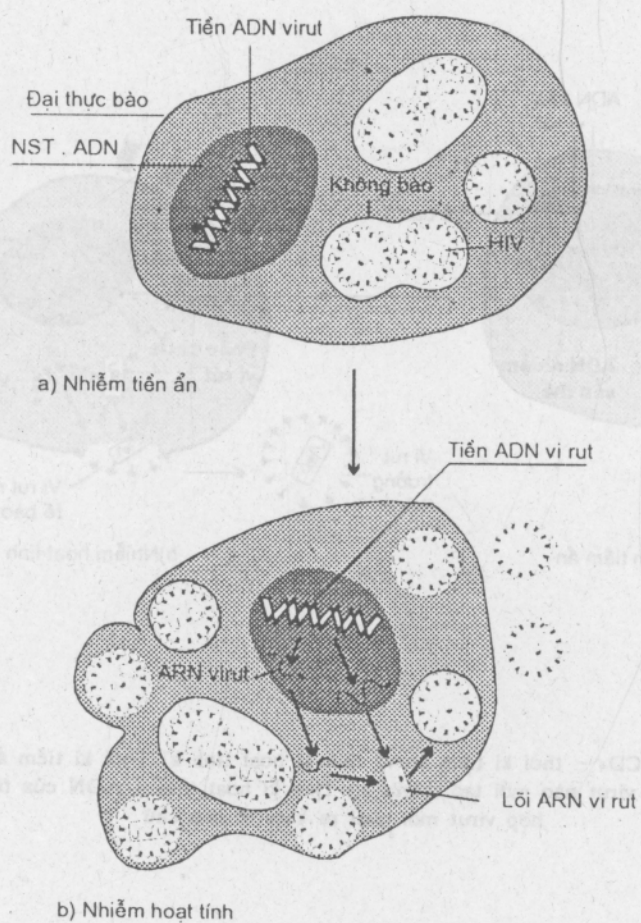


HIV và khả năng nhiễm

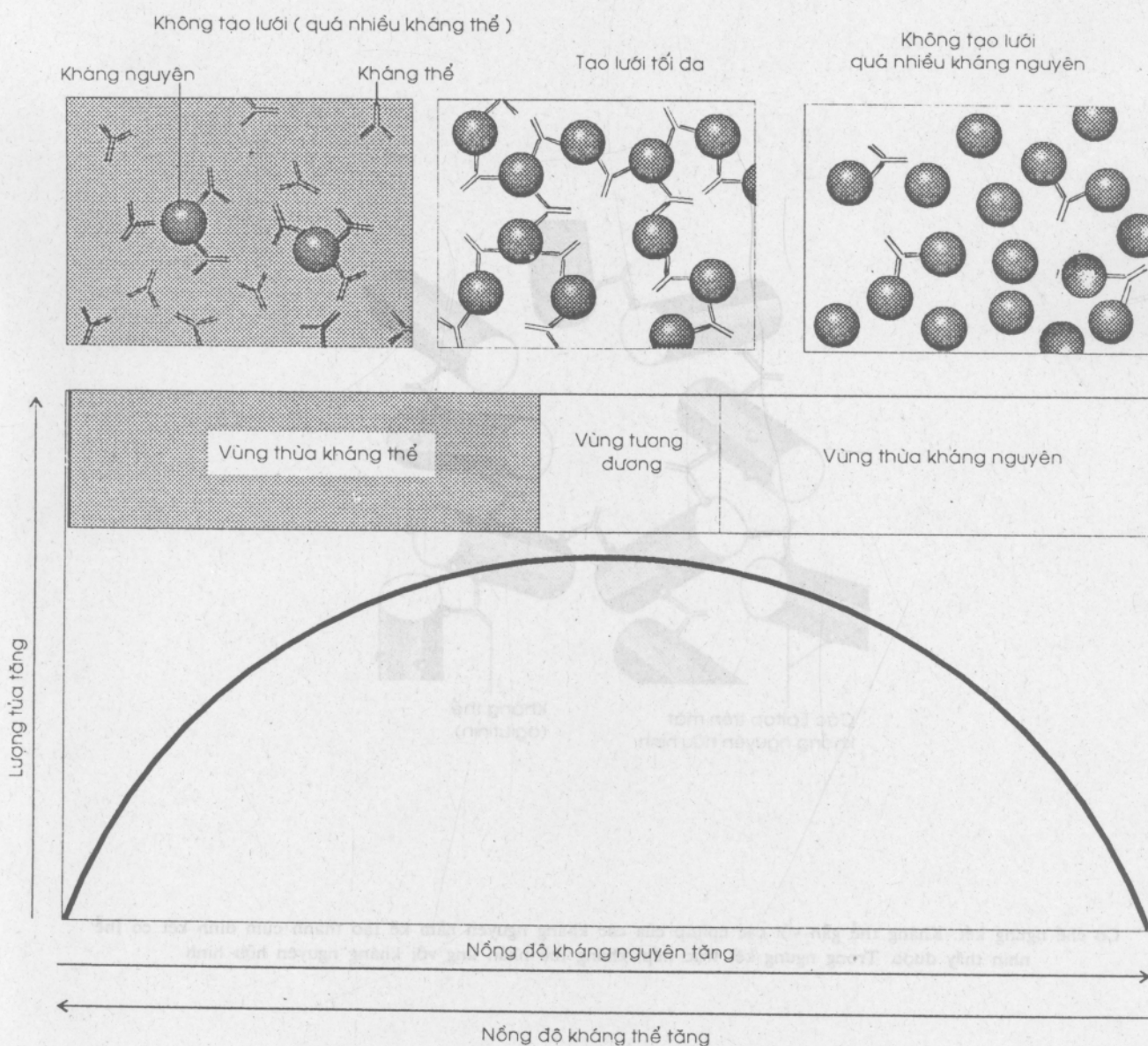
A - Cấu trúc HIV ; B - Tế bào TCD₄ với thụ thể bề mặt



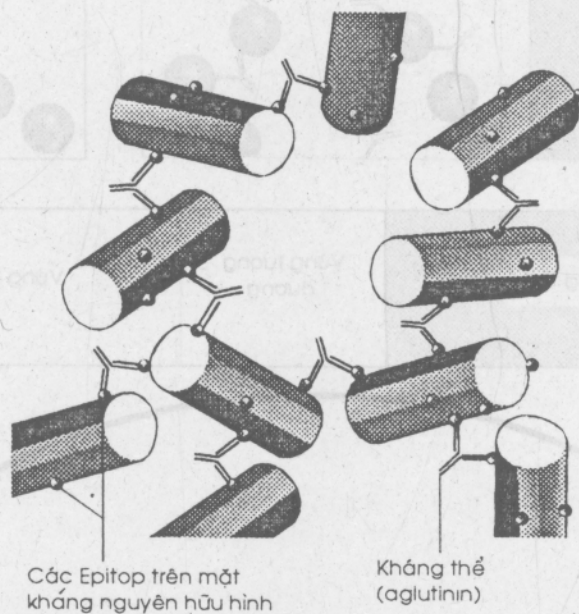
Nhiễm HIV vào tế bào TCD₄ - thời kì tiềm ẩn và thời kì hoạt tính a) Thời kì tiềm ẩn không có gen virus nào được sao và không có virus nào mới tạo thành. b) Thời kì hoạt tính - ADN của tiền virus kiểm tra tổng hợp virus mới chui ra khỏi tế bào chủ



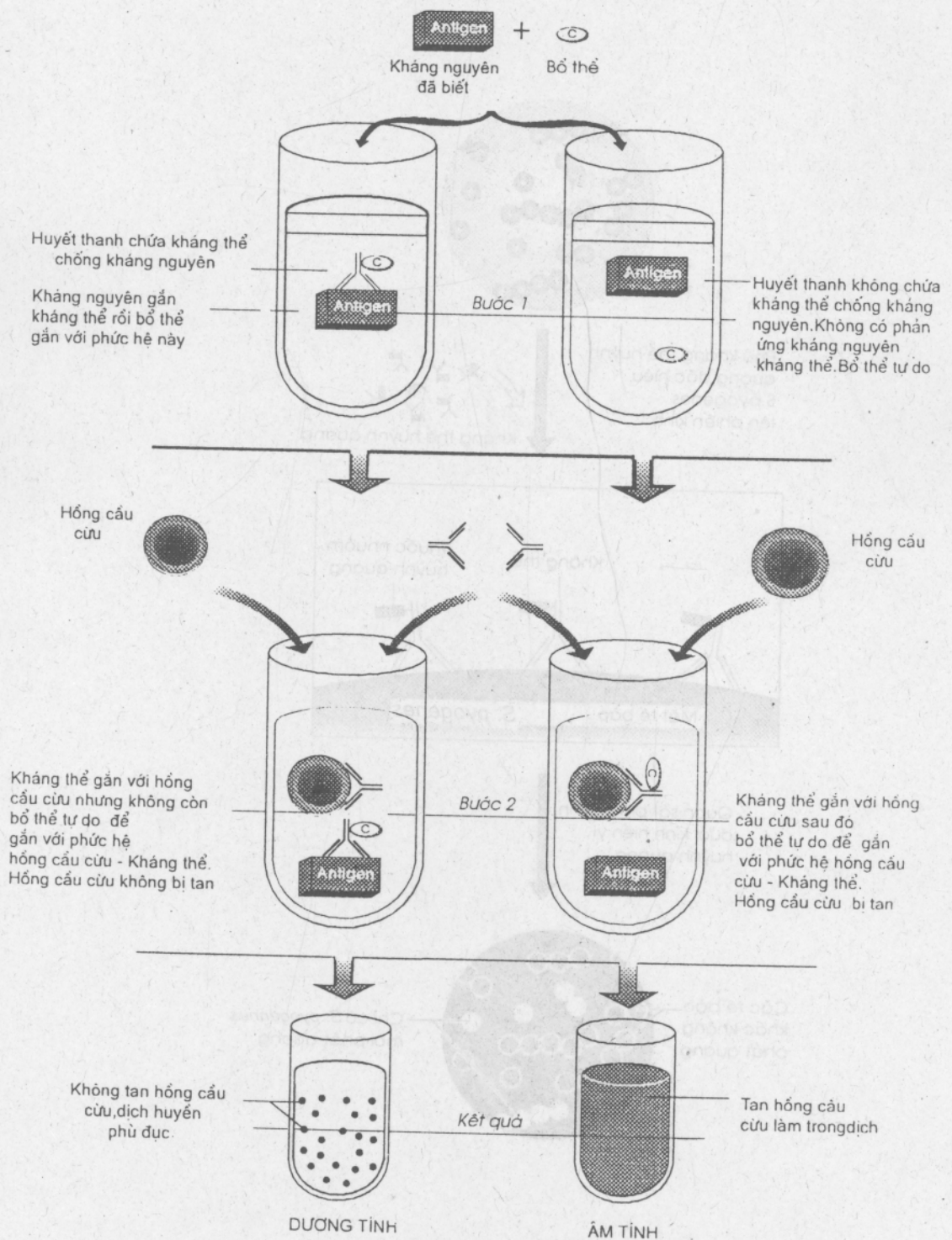
Nhiễm HIV tiềm ẩn và hoạt tính trong đại thực bào : a) Trong nhiễm tiềm ẩn, virus mới tạo thành nằm trong không bào. Nếu đại thực bào hoạt hóa, các virus sẽ thoát ra ngoài. b) Trong nhiễm hoạt tính, các virus mới tạo thành thoát ra ngoài nhưng một số vẫn nằm trong không bào



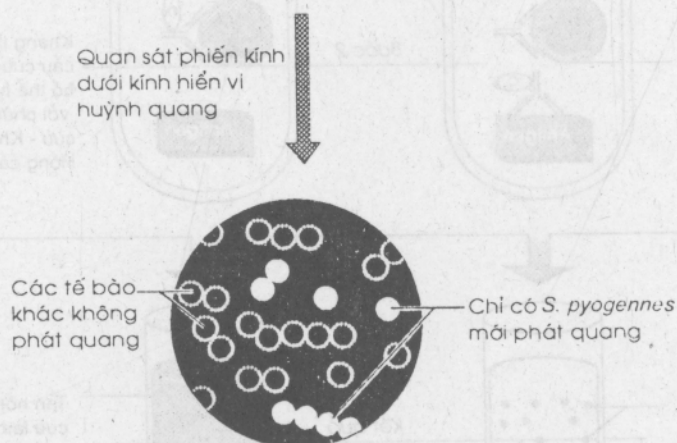
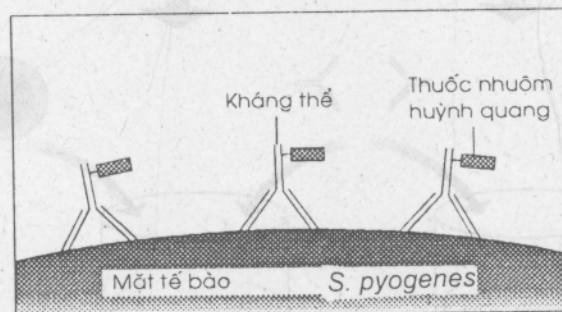
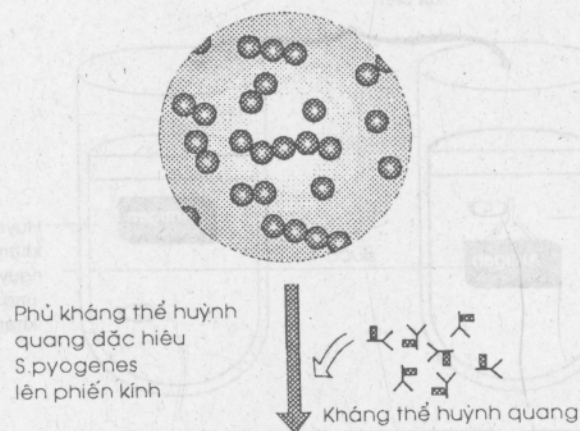
Đồ thị biểu hiện mức kết tủa phụ thuộc vào tỉ lệ kháng thể, kháng nguyên. Khi tỉ lệ tương đương sẽ tạo mạng lưới tối nhất. Nếu thừa kháng thể, epitop kháng nguyên bão hòa nhưng không liên kết chéo được với nhau thông qua gắn với vị trí kết hợp kháng nguyên. Nếu thừa kháng nguyên, vị trí kết hợp kháng thể bão hòa, nhưng cũng không liên kết được với nhau thông qua epitop



Cơ chế ngưng kết. Kháng thể gắn với các epitop của các kháng nguyên nằm kế tạo thành cụm dính kết có thể nhìn thấy được. Trong ngưng kết trực tiếp, kháng thể phản ứng với kháng nguyên hữu hình



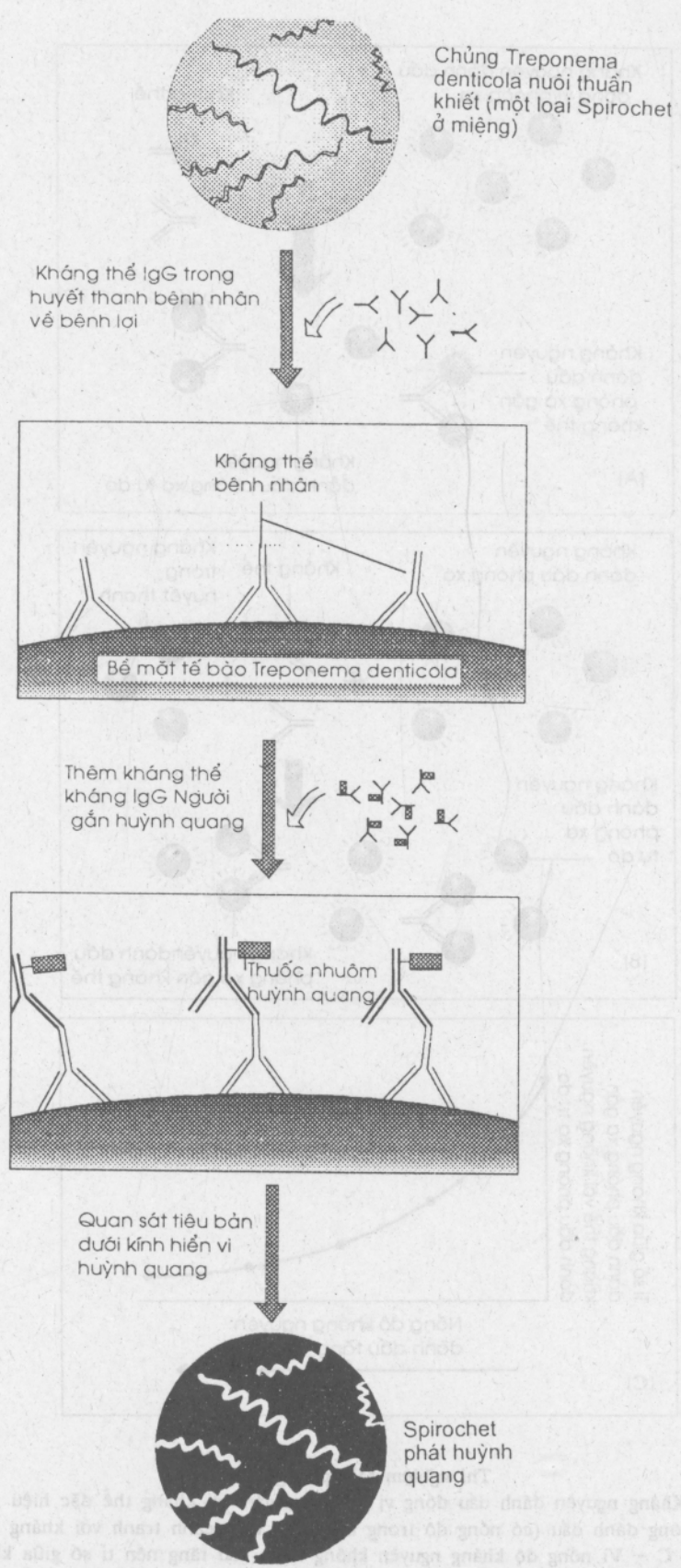
Nguyên lí của phản ứng kết hợp bó thể. Nếu bó thể đã gắn vào phức hệ kháng nguyên, kháng thể (bước 1) thì không còn ở dạng tự do để làm tan hồng cầu cừu (bước 2).



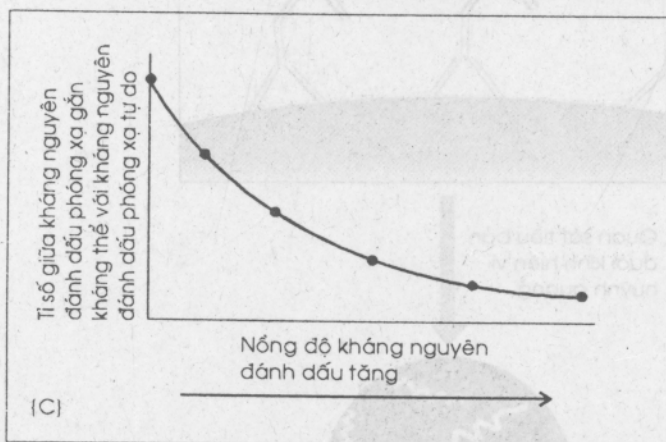
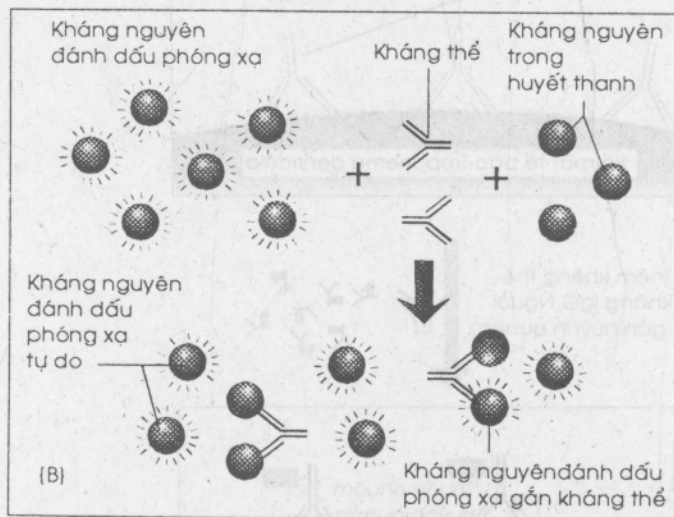
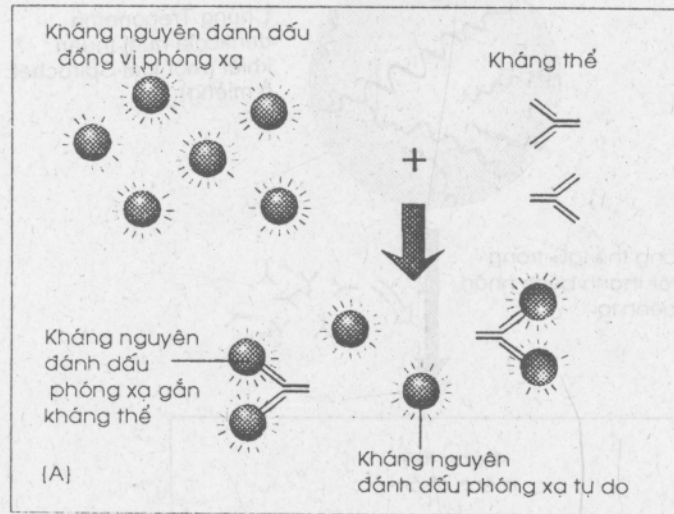
Kĩ thuật kháng thể huỳnh quang

A - Phương pháp trực tiếp - thường dùng để xác định vi sinh vật gây bệnh trong bệnh phẩm, ví dụ *Streptococcus pyogenes* trong họng bệnh nhân

B41/B
N.8.8



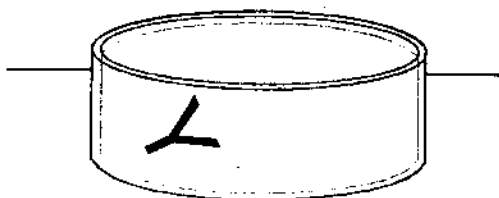
B - Phương pháp gián tiếp - thường dùng xác định kháng thể trong thể dịch bệnh nhân. Ví dụ xác định IgG kháng spirochet có trong huyết thanh hoặc nước bọt bệnh nhân viêm lợi. Phương pháp gián tiếp nhạy hơn vì 2 hoặc nhiều kháng thể đánh dấu (ở đây chỉ vẽ một) có thể gắn vào kháng thể đặc hiệu kháng nguyên



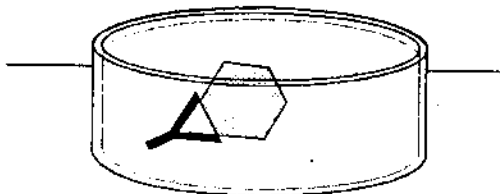
Thí nghiệm MD phóng xạ.

- A - Kháng nguyên đánh dấu đồng vị phóng xạ gắn với kháng thể đặc hiệu ;
 B - Kháng nguyên không đánh dấu (có nồng độ trong mẫu thay đổi) cạnh tranh với kháng nguyên đánh dấu để gắn với kháng thể ; C - Vì nồng độ kháng nguyên không đánh dấu tăng nên tỉ số giữa kháng nguyên đánh dấu gắn kháng thể trên kháng nguyên đánh dấu không gắn kháng thể giảm. Điều này biểu hiện trên đồ thị

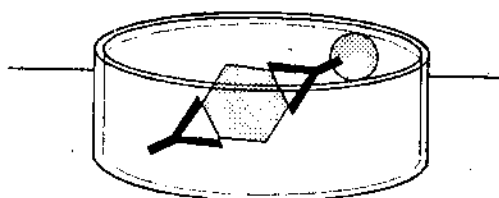
Cho kháng thể(antitoxin)gắn vào thành giếng



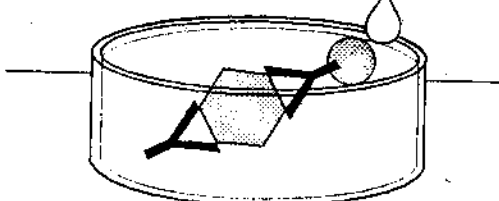
Rửa,thêm kháng nguyên(toxin)tạo phức hệ kháng thể - kháng nguyên



Rửa,thêm cộng hợp kháng thể gắn enzym



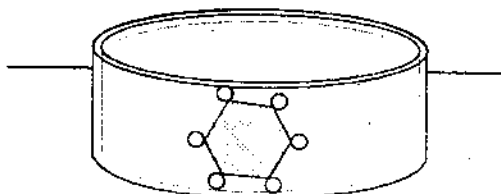
Rửa,thêm cơ chất



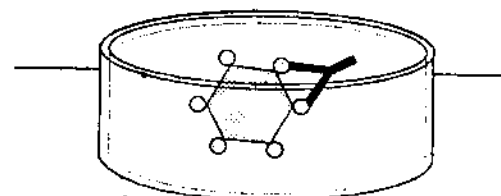
Enzim thủy phân cơ chất tạo màu

A

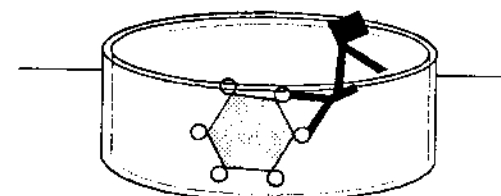
Cho kháng nguyên glycoprotein HIV bám vào thành giếng



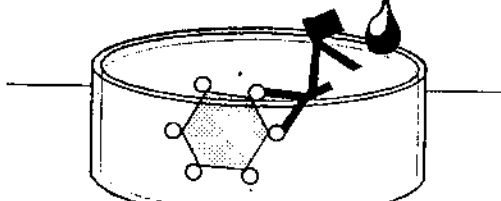
Rửa,thêm kháng huyết thanh kháng HIV tạo phức hệ kháng nguyên -kháng thể



Rửa,thêm cộng hợp kháng thể gắn enzym tạo "bánh mì kẹp sandwich"



Rửa,thêm cơ chất cho enzym



Xác định cường độ màu

B

- A - Kỹ thuật ELISA "Bánh mì kẹp sandwich" dùng xác định và đo nồng độ kháng nguyên. Ví dụ xác định độc tố tụ cầu khuẩn trong thực phẩm với nồng độ rất nhỏ, đến 0,4 ng/ml dịch chiết
- B - Kỹ thuật ELISA gián tiếp dùng định tính và định lượng kháng thể. Chẳng hạn kháng thể chống HIV (sau mỗi bước đều phải rửa để loại kháng nguyên hoặc kháng thể thừa)

MỤC LỤC

Chương I

Mở đầu

1 - Đặc điểm chung của vi sinh vật	3
2 - Vị trí của vi sinh vật trong sinh giới	5
3 - Đặc điểm của sinh vật nhân nguyên thủy và sinh vật nhân thật	7
4 - Vai trò của vi sinh vật trong tự nhiên và trong nền kinh tế quốc dân	8
5 - Sơ lược lịch sử phát triển của vi sinh vật học	11

Chương II

Hình thái và cấu tạo tế bào các vi sinh vật nhân nguyên thủy (Prokaryotes)

1 - Vi khuẩn	25
2 - Xạ khuẩn	39
3 - Vi khuẩn lam	42
4 - Nhóm vi khuẩn nguyên thủy	44

Chương III

Hình thái và cấu tạo tế bào các vi sinh vật nhân thật (Eukaryotes)

1 - Đặc điểm chung của vi nấm	81
2 - Nấm men	84
3 - Nấm sợi	88

Chương IV

Virut

1 - Lịch sử phát hiện và định nghĩa virut	109
2 - Hình thái và cấu trúc của virut	111
3 - Các phương thức sinh sản ở virut	117

Chương V

Dinh dưỡng của vi sinh vật

1 - Thành phần tế bào và dinh dưỡng của vi sinh vật	141
2 - Nguồn thức ăn cacbon của vi sinh vật	148
3 - Nguồn thức ăn nitơ của vi sinh vật	150
4 - Nguồn thức ăn khoáng của vi sinh vật	155
5 - Nhu cầu về chất sinh trưởng của vi sinh vật	158
6 - Cơ chế vận chuyển các chất dinh dưỡng vào tế bào vi sinh vật	166

Chương VI

Trao đổi chất và trao đổi năng lượng ở vi sinh vật

1 - Một số khái niệm chung	175
2 - Sự oxy hóa sinh học và sinh năng lượng ở các vi sinh vật dị dưỡng	177
3 - Sự oxy hóa sinh học, sinh năng lượng và cố định CO ₂ ở các vi sinh vật tự dưỡng	198
4 - Các quá trình lên men	212
5 - Các quá trình oxy hóa không hoàn toàn	242
6 - Sự phân giải protein (quá trình thối rữa)	250

7 - Sự phân giải lipit và các axit béo	257
8 - Sự phân giải các hợp chất vòng thơm	260
9 - Sự phân giải các hợp chất 2 cacbon và 1 cacbon	265

Chương VII

Các quá trình sinh tổng hợp và cố định nitơ

1 - Các quá trình sinh tổng hợp	280
2 - Quá trình cố định nitơ	320

Chương VIII

Sinh trưởng và phát triển ở vi sinh vật

1 - Mâu lí thuyết về sinh trưởng và phát triển của vi khuẩn	355
2 - Sinh trưởng và phát triển của vi khuẩn trong điều kiện nuôi cấy tĩnh. Đường cong sinh trưởng.	360
3 - Sinh trưởng của vi khuẩn trong quá trình nuôi cấy liên tục	370
4 - Làm đồng bộ sự phân chia tế bào	374
5 - Các phương pháp xác định sinh trưởng và phát triển của vi khuẩn	376
6 - Tác dụng của các yếu tố bên ngoài lên sinh trưởng và phát triển của vi khuẩn	378

Chương IX

Di truyền học vi sinh vật

1 - Sao chép	408
2 - Phiên mã	410
3 - Dịch mã	414
4 - Đột biến và sự phát sinh đột biến	417
5 - Sửa chữa ADN	420
6 - Sự truyền tính trạng và tái tổ hợp di truyền	421
7 - Sự biến nạp	424
8 - Tải nạp	426
9 - Sự hạn chế và cải biến	430

Chương X

Miễn dịch

1 - Cơ chế bảo vệ cơ thể	451
2 - Chất sinh miễn dịch và kháng nguyên	453
3 - Các tế bào tham gia vào hệ thống miễn dịch	454
4 - Kháng thể	456
5 - Thụ thể tế bào T (TCR)	458
6 - Kháng nguyên phù hợp tổ chức	459
7 - Miễn dịch trung gian tế bào	461
8 - Thuyết chọn lọc dòng (clone) của Burnet và dung nạp miễn dịch	463
9 - Cơ chế hình thành kháng thể miễn dịch	465
10 - Di truyền và tiến hóa các phân tử IG và thụ thể tế bào T	468
11 - Kháng thể đơn dòng	470
12 - Bỏ thể	470
13 - Miễn dịch bệnh lí	472
14 - Các phản ứng huyết thanh	481

Chịu trách nhiệm xuất bản :
Chủ tịch HĐQT kiêm Tổng Giám đốc NGÔ TRẦN ÁI
Phó Tổng Giám đốc kiêm Tổng biên tập NGUYỄN QUÝ THAO

Biên tập lần đầu :
TRẦN ĐỨC CHÍNH

Biên tập tái bản :
NGUYỄN THỊ BẢO KHANH

Trình bày bìa :
ĐOÀN HỒNG

Sửa bản in :
BẢO KHANH – ANH TUẤN

Chế bản :
PHÒNG CHẾ BẢN (NHÀ XUẤT BẢN GIÁO DỤC)

VI SINH VẬT HỌC

Mã số: 7K180T7 - DAI

In 1.000 bản, khổ 19 x 27 cm, tại Công ty In - Thương mại TTXVN
70/342 Khuong Đình - Hạ Đình - Thanh Xuân - Hà Nội.

Số xuất bản: 11-2007/CXB/207-2119/GD.

In xong và nộp lưu chiểu tháng 02 năm 2007.



CÔNG TY CỔ PHẦN SÁCH ĐẠI HỌC - DẠY NGHỀ
HEVOBCO
25 HÀN THUYỀN – HÀ NỘI
Website : www.hevobco.com.vn

TÌM ĐỌC SÁCH THAM KHẢO – BỘ MÔN SINH HỌC
CỦA NHÀ XUẤT BẢN GIÁO DỤC

1. **Phân loại học Thực vật**
HOÀNG THỊ SẢN
2. **Hỏi đáp về thế giới thực vật**
NGUYỄN LÂN DŨNG
3. **Sinh lí thực vật ứng dụng**
VŨ VĂN VỤ
4. **Vi sinh vật học**
NGUYỄN LÂN DŨNG (Chủ biên)
5. **Hoá sinh học**
PHẠM THỊ TRÂN CHÂU (Chủ biên)
6. **Thực hành Phân loại thực vật**
HOÀNG THỊ SẢN (Chủ biên)
7. **Từ điển Sinh học phổ thông**
LÊ ĐÌNH LƯƠNG (Chủ biên)

Bạn đọc có thể mua tại các Công ti Sách - Thiết bị trường học ở các địa phương hoặc các Cửa hàng của Nhà xuất bản Giáo dục :

Tại Hà Nội : 25 Hàn Thuyên ; 187B Giảng Võ ; 232 Tây Sơn ; 23 Tràng Tiền ;

Tại Đà Nẵng : Số 15 Nguyễn Chí Thanh ; Số 62 Nguyễn Chí Thanh ;

Tại Thành phố Hồ Chí Minh : 104 Mai Thị Lựu, Quận 1 ; Cửa hàng 451B - 453, Hai Bà Trưng, Quận 3 ; 240 Trần Bình Trọng – Quận 5.

Tại Thành phố Cần Thơ : Số 5/5, đường 30/4 ;

Website : www.nxbgd.com.vn



Giá: 65.000 đ