

TỦ SÁCH KHUYẾN NÔNG PHỤC VỤ NGƯỜI LAO ĐỘNG

Ứng dụng công nghệ trong chăn nuôi gia súc và bảo quản sản phẩm



NHÀ XUẤT BẢN LAO ĐỘNG

TỦ SÁCH KHUYẾN NÔNG PHỤC VỤ NGƯỜI LAO ĐỘNG
CHU THỊ THƠM, PHAN THỊ LÀI, NGUYỄN VĂN TÓ
(Biên soạn)

ỨNG DỤNG CÔNG NGHỆ TRONG CHĂN NUÔI GIA SÚC VÀ BẢO QUẢN SẢN PHẨM

NHÀ XUẤT BẢN LAO ĐỘNG
HÀ NỘI - 2006

LỜI NÓI ĐẦU

Trong ngành chăn nuôi ở nước ta, nhất là chăn nuôi lợn, vấn đề thiếu đạm trong thức ăn đã trở thành một vấn đề cần phải quan tâm.

Những loại thức ăn nhiều đạm (như khô dầu lạc, xác mắm, thức ăn hạt bộ đậu) giá thành cao, cho nên tìm ra những loại thức ăn rẻ tiền cung cấp được nhiều đạm đảm bảo nhu cầu dinh dưỡng cho gia súc là rất cần thiết.

Hiện tượng thiếu dinh dưỡng do khẩu phần thiếu đạm gây ảnh hưởng lớn đến sinh trưởng phát dục bình thường của gia súc, làm cho gia súc non kém phát triển, còi cọc, tỷ lệ nuôi sống đạt thấp; còn gia súc trưởng thành thì sức khoẻ kém, sức sản xuất giảm sút.

Vì vậy, một trong những phương hướng có nhiều triển vọng để giải quyết những vấn đề trên là dùng vi sinh vật để cải thiện phẩm chất thức ăn, cung cấp thêm protein, axit amin, vitamin, enzym và các chất dinh dưỡng khác, góp phần bổ sung khẩu phần hàng ngày vốn rất thiếu các chất dinh dưỡng này.

Những năm qua ngành chăn nuôi đã ứng dụng chế biến một số thức ăn theo phương pháp vi sinh vật tổng hợp có giá trị dinh dưỡng cao, giá thành hạ. Vi sinh vật

là loại sinh vật đơn giản nhất có khả năng phát triển rất nhanh (phân bào hoặc sinh bào tử). Điều này cho thấy ứng dụng công nghệ vi sinh vào chăn nuôi gia súc là hướng phát triển đúng.

Cuốn "Ứng dụng công nghệ trong chăn nuôi gia súc và bảo quản sản phẩm" trình bày sự phát triển của các hệ vi sinh vật, các kiến thức về dinh dưỡng vật nuôi, cách chế biến thức ăn để giúp cho người chăn nuôi thu được năng suất cao.

CÁC TÁC GIẢ

PHẦN I

VI SINH VẬT TRONG CHĂN NUÔI

I. VI SINH VẬT TRONG THỰC VẬT VÀ CHẾ BIẾN THỨC ĂN GIA SÚC

1. Vi sinh vật trong thức ăn xanh

Bộ rễ của cây sở dĩ chứa nhiều vi sinh vật là vì ở đó có nhiều điều kiện thuận lợi để vi sinh vật phát triển (các chất cặn bã của rễ khi thối đi thì làm thức ăn cho các vi khuẩn hoại sinh của đất, đồng thời có nhiều hợp chất hữu cơ do rễ bài tiết ra có tác dụng dinh dưỡng đối với các loại vi khuẩn).

Ở trong bộ rễ gồm có các loại vi khuẩn như: vi khuẩn không sinh nha bào (chiếm hơn 99% số lượng vi khuẩn) như *Pseudomonas herbicola*, *Pseudomonas fluorescens*, gây quá trình thối rữa, vi khuẩn làm lên men lactic, vi khuẩn có nha bào (số lượng vi khuẩn này ít, chúng chỉ bắt đầu sinh sản mạnh khi bộ rễ thối) có nhiều loại nấm thuộc giống *Penicillium* *Trichoderma*, *Fusarium* và cả một số vi khuẩn gây bệnh cho cây. Đa số những vi sinh vật này thường sống cộng sinh, tạo điều kiện cho cây sinh trưởng phát triển tốt. Trong số vi sinh vật cộng sinh này, cần kể thêm vi khuẩn nốt sần của bộ đậu. (*Bacterium radicum*) có thể tạo ra trong

bộ rễ những nốt sần và biến đạm nitơ của khí quyển thành những hợp chất để nuôi cây; một số nấm (Mycoriza) có thể tạo ra trong rễ một loại rễ nấm có tác dụng cải thiện sự dinh dưỡng khoáng của cây và cung cấp thêm cho cây nhiều nhân tố sinh trưởng khác; vi khuẩn của bộ rễ ăn những tàn tích của cây bị mục nát và những chất do rễ tiết ra; một số vi khuẩn và nấm sống ở rễ theo sự phát triển của cây dần dần chuyển lên phần trên mặt đất. Nguồn thức ăn cung cấp cho các loại vi khuẩn và nấm này là những chất do cây tiết ra trên bề mặt biểu bì.

Còn ở ngoài vỏ cây, có khả năng tồn tại một nhóm vi khuẩn đặc biệt gọi là vi khuẩn biểu sinh thực vật như loại trực khuẩn không nha bào *Pseudomonas herbicola*, *Pseudomonas fluorescens*..., nhóm *Caliaerogenes*, vi khuẩn lactic, nấm mốc và men (số lượng ít). Ngoài ra còn có một số vi khuẩn có bào tử và nấm mốc nằm trên bề mặt của cây, ở biểu bì, từ không khí vào cây.

- Trong 1g chất xanh của cây có thể có từ 10 đến 100 triệu vi sinh vật biểu sinh. Số lượng vi sinh vật này thay đổi tùy theo đặc tính về loài của cây, giai đoạn phát triển của cây và thời tiết (thời tiết ẩm ướt thì hệ vi sinh vật biểu sinh tăng lên rất nhanh). Sau đây là tỷ lệ các loại vi sinh vật này tính theo phần trăm:

Pseudomonas herbicola 30-60%,

Pseudomonas fluorescens dưới 40%,

Nhóm Coli-aerogenes dưới 2%,

Vi khuẩn lactic - dưới 5% (có khi cao hơn, đến 10%),

Vi khuẩn có nha bào dưới 2%.

Hệ vi sinh vật biểu sinh nói chung không gây tác hại cho cây vì chúng không ăn sâu vào trong mô của cây, ngược lại các biểu mô của cây có khả năng chống lại những tác hại của vi khuẩn. Thông thường chỉ khi nào cây và các mô cây bị phá hoại thì hệ vi sinh vật mới gây tác hại, lúc đó các chất dinh dưỡng nằm trong cây trở thành chất nuôi vi khuẩn và làm cho giá trị dinh dưỡng của thực vật bị giảm đi. Do đó, nếu muốn bảo quản thức ăn thực vật được nguyên chất thì phải tìm cách kiểm chế vi khuẩn phát triển bằng các phương pháp sấy khô hoặc ủ chua.

2. Vi sinh vật trong thức ăn sấy khô, cỏ khô

Sấy khô là một phương pháp cổ điển, đến nay vẫn được dùng để bảo quản chất xanh, cỏ và các thức ăn khác (hạt, củ...). Khi sấy khô, các quá trình vi sinh vật trong thức ăn sẽ bị đình trệ vì nước tự do đã được tách khỏi thức ăn (cỏ tươi chứa 70-80% nước, cỏ khô chỉ còn có 12-16% nước).

Khi sấy khô phải khống chế được tác dụng lên men sinh mốc thì mới giữ được cỏ khô tốt.

Ở những nơi khí hậu tương đối khô, ánh nắng đầy đủ, chỉ cần phơi cỏ ra ánh nắng vài ngày là được. Nhưng phương pháp này khó thực hiện ở những vùng mưa nhiều, nắng ít. Ở những vùng này có thể lợi dụng sự lên men mà

làm cỏ khô đi. Nếu chất đông loại cỏ nhiều nước lại mấy ngày thì có hiện tượng nhiệt độ tăng rõ ràng và rất nhanh; nếu ép đông cỏ xuống càng chặt thì nhiệt độ càng cao, nhưng nói chung không nên vượt quá 71°C . Cũng có trường hợp đặc biệt, nhiệt độ lên rất cao có thể làm cháy cỏ, thậm chí gây hoả tai (nhất là khi cỏ chứa nhiều nước). Nhưng hiện tượng này ít xảy ra. Hiện tượng tự thiêu đốt của cỏ khô chủ yếu là do vi sinh vật gây ra đồng thời còn do sự hô hấp của tế bào thực vật.

Trong thực tế người ta thường đem cỏ xanh đánh thành đồng cao, nén chặt lại rồi cho đậy bên trên lại bằng lá hoặc chiếu... để tránh mưa ngấm vào, nhiệt độ có thể tăng lên đến 71°C nhưng không đến nỗi gây hiện tượng tự thiêu. Phương pháp này không sợ nước mưa ngấm xuống, thích hợp cho những vùng mưa nhiều.

Sự lên men ở đồng cỏ làm biến đổi chất của cỏ xanh, làm cho cỏ xanh biến thành cục rắn, khô, màu nâu nhạt hoặc thẫm. Nếu nhiệt độ quá cao thì thành màu đen, đồng cỏ bốc lên mùi thơm bánh mì nướng, đồng cỏ có thể chứa đến 7% axit lactic và đến 2% axit axetic. Những axit này đều là sản phẩm của đường lên men vì thế mà lượng đường trong đồng cỏ giảm đi rất nhiều, các chất chứa nitrogen cũng mất đi nhiều (có thể đến 14% tổng số lượng đạm) đó là khuyết điểm lớn của phương pháp này. Còn với phương pháp sấy khô thì thường bị mất hơn 10% các chất hữu cơ, trong đó có protit và đường bình thường cần cho sự hô hấp và phân giải của vi sinh vật.

Có thể dùng phương pháp cải tiến sau đây: chất cỏ xanh thành một đồng cao rồi lấy chân nện chặt lại không cho không khí vào: nhiệt độ sẽ tăng lên rất nhanh, khi lên đến 70°C (vào quãng 48-60 giờ sau) thì dỡ đồng cỏ ra, tải thành lớp mỏng để nhiệt độ sẵn có trong đồng cỏ làm cỏ khô đi nhanh chóng, cuối cùng chỉ cần đảo cỏ lên mấy lượt là có thể tích trữ lại được.

Cỏ khô phơi nắng chưa kỹ mà đã đánh đồng thì có thể xảy ra hiện tượng tự toả nhiệt, làm mất nhiều thành phần dinh dưỡng, thậm chí có khi phát sinh trường hợp tự thiêu đốt.

3. Vi sinh vật trong thức ăn ủ tươi, ủ xanh

Ủ tươi thức ăn là một phương pháp sinh vật học đặc biệt có tác dụng bảo quản thức ăn xanh, làm cho thực vật giữ được độ ẩm trong trạng thái ẩm. Ủ tươi thức ăn có một ý nghĩa kinh tế rất lớn, nhờ nó người ta có thể thu hoạch cây ngô, cỏ, các loại rau xanh vào bất cứ thời tiết nào, tránh được thiệt hại vì phải thu hoạch vào mùa mưa. Ngoài ra, thức ăn còn giữ được chất dinh dưỡng nhiều hơn là phơi cỏ khô, vì ủ tươi không làm mất lá và hoa, những phần có nhiều chất dinh dưỡng nhất (tính theo lượng tinh bột, giá trị dinh dưỡng của thức ăn phơi khô bị giảm đi 50%, còn thức ăn ủ tươi không bị giảm quá 5-10%).

Ủ tươi còn cho phép sử dụng được các phụ phế phẩm nông nghiệp, thức ăn thiên nhiên rẻ tiền như thân lá khoai tây, củ cải, bắp cải, su hào. Nhờ có ủ tươi mà nhiều loại phế phẩm và các loại cỏ xanh có giá trị dinh

dưỡng thấp được biến đổi thành những loại thức ăn có phẩm chất dinh dưỡng tốt hơn.

Gia súc thích ăn thức ăn ủ tươi hơn cỏ khô; cho súc vật ăn thức ăn ủ xanh lượng sữa sẽ tăng hơn, giá thành đơn vị các chất dinh dưỡng của thức ăn ủ tươi cũng thấp hơn; ngoài ra ủ chua còn tạo khả năng giữ thức ăn được lâu.

4. Ủ tươi thức ăn cho gia súc

a) Phương pháp

Nén thực vật tươi vào hố đất hay tháp cao tạo thành một loại sản phẩm lên men thực vật sẽ chịu tác dụng lên men lactic của vi khuẩn lactic, lượng axit lactic sản sinh ra càng nhiều càng hạn chế sự hoạt động của vi khuẩn gây thối nhờ đó mà bảo đảm cho thức ăn ủ xanh có thể cất giữ được lâu.

Ủ tươi có 2 cách:

*** Ủ lạnh:**

Nén thực vật thật chặt, nhiệt độ bên trong là 25-30°C thì được. Trước đó, rửa sạch đất cát, bỏ lá thối, cắt thành từng đoạn nhỏ trải đều trong hố có dung tích lớn, nén chặt không để kẽ hở, lớp trên phủ kín để ngăn tác dụng của không khí. Ép hết không khí ở bên trong đi để bảo đảm cho thức ăn ủ xanh lên men tốt. Ủ theo phương pháp này thức ăn có nhiều axit, vì thế nên có thể gọi là ủ chua.

Trong phương pháp ủ lạnh, quá trình ngấu của thức ăn có thể chia làm ba thời kỳ:

+ Thời kỳ chuẩn bị lên men

Vì thực vật bị chết sau khi cắt nên có nhiều loại vi sinh vật khác nhau phát triển, tự nuôi sống bằng những hợp chất hữu cơ hòa tan từ tế bào cây, phần lớn là chất đường hòa tan, trước tiên là do lên men dị dạng (*Bacterium coli*, *Bact lactisaerogenas*), và đồng dạng (*Streptococcus lactis*, *Lactobacterium acidophilum*) của vi khuẩn lactic. Những vi sinh vật này gồm có *Bacterium coli aerogenas*, men rượu, vi khuẩn gây thối, nhưng chỉ trong vòng 2 ngày là chúng đã bị axit lactic ức chế (nếu là thức ăn ủ xanh tốt).

+ Thời kỳ thức ăn ngấu

Vi khuẩn lactic phát triển mạnh, chiếm ưu thế và tích lũy nhiều axit lactic, tác động vào nhiều loại đường chứa trong thức ăn.

Phần lớn các vi khuẩn thối không có nha bào trong giai đoạn này sẽ bị chết. Còn vi khuẩn có nha bào thì chuyển qua giai đoạn nha bào (do các tế bào thực vật và tác dụng của vi khuẩn hiếu khí làm tiêu hao hoặc tận dụng dần dần hết không khí chứa trong các kẽ hở ở thức ăn, sản sinh ra nhiều nhiệt năng hơn, khiến cho nhiệt độ tăng lên mạnh).

Các dạng vi khuẩn lactic cũng thay đổi tuần tự, lúc đầu là loại cầu khuẩn (*Streptococcus lactis acidii*), sau đó là loại trực khuẩn (*Bacterium lactis acidii*, *Streptobacterium plantarum*, *Lactobacterium plantarum*) phát triển.

+ Thời kỳ hoàn thành ủ tươi

Lúc này thức ăn đã được ủ chín dừ. Axit lactic sản sinh ra, đạt tới đỉnh cao nhất và do không bị bay hơi nên nó dễ được tích tụ lại. Nếu lượng axit lactic đạt tới 1,5%-2%, độ pH 1,2 thì có thể đủ để làm ngừng sự hoạt động của các loại vi sinh vật có hại. Làm như vậy có thể giữ được thức ăn ủ xanh lâu không thối (có những trường hợp đặc biệt có thể giữ thức ăn được 7 năm mà không biến đổi gì). Ở thời kỳ gần hoàn thành trực khuẩn *Bacterium lactis acidii* chiếm ưu thế và thay thế cho trực khuẩn *Streptococcus lactis* vì trực khuẩn *Streptococcus lactis* có sức đề kháng yếu đối với nồng độ axit lactic cao. Vi khuẩn gây thối chỉ phát dục được trong môi trường pH không hạ thấp đến 5,0. Còn các loại vi khuẩn lactic (*Streptococcus lactis*, *Bacterium lactis acidii*, *Lactobacterium plantarum*, *Streptobacterium plantarum*) là những vi khuẩn lên men axit lactic chủ yếu trong ủ xanh thì có thể phát dục được trong môi trường pH=3, đến pH=1,5 (khi ủ xanh lạnh thì chủ yếu là 2 loại: *Bacterium lactis acidii*, *Streptobacterium plantarum*; khi ủ xanh nóng thì chủ yếu là *Streptococcus* ưa nhiệt *Lactobacillus thermophilus* hoạt động). Do sự diễn biến quá trình ủ tươi và sự phát triển của vi sinh vật mà thức ăn ủ tươi tốt hay không tốt. Nếu thức ăn không được nén chặt thì các loại vi sinh vật sẽ phát triển trong một thời gian dài hơn, chất đường bị tiêu hao nhiều hơn do các quá trình oxi hóa, hạn chế sự phát triển và

hoạt động của vi khuẩn lactic và làm cho mức tích lũy axit lactic bị giảm sút.

Nếu thức ăn có nhiều đất bản thì các loại vi khuẩn lên men axit béo phát triển, vượt hẳn loại vi khuẩn lactic, nhất là trong trường hợp thức ăn kém độ chua, axit béo sẽ tích lũy lại nhiều làm cho thức ăn có vị đắng.

Nếu thức ăn nén dỏ, không khí lọt vào thì nấm mốc dễ phát triển, làm cho axit lactic oxi hóa thành axit cacbonic làm giảm độ chua của thức ăn, tạo điều kiện cho vi khuẩn gây thối dễ phát triển.

Trong quá trình ủ chua, vi khuẩn phát triển mạnh làm cho thành phần hóa học của thức ăn thay đổi, thành phần đường giảm sút biến thành axit, độ axit trong thức ăn ủ tươi tăng lên nhanh (đến ngày thứ 3 pH có thể hạ xuống 4,4 và độ axit tăng đến 3,5% trọng lượng chất khô của thức ăn ủ tươi); khi đã ủ chín, độ axit có thể tăng lên đến 8,4%. Độ axit tăng nhanh có tác dụng hạn chế các vi khuẩn gây thối ngay trong những ngày đầu và làm cho quá trình ủ tươi được tốt.

Ngoài glucit ra, các chất có nitrogen cũng bị biến đổi nhiều. Vi sinh vật và men của thức ăn xanh tác động đến protein làm cho protein bị thủy phân thành pepton, axit amin và một ít amoniac.

Trong ủ lạnh trọng lượng chất khô mất 10%, còn trong ủ nóng mất 30%.

Để kích thích sự phát triển của vi khuẩn lactic, nên

giữ nhiệt độ ở 20-30°C (trong ủ lạnh), nén chặt thức ăn ủ tươi (để có ít oxy).

Cách tiến hành ủ tốt là cho thêm vào thức ăn tươi vi khuẩn lactic giống hoạt chất hóa học, vì nếu thức ăn không có nhiều vi khuẩn lactic thì khi cho thêm vi khuẩn vào sẽ rút ngắn được thời gian sản ra axit, hạn chế nhanh sự phát triển của những loại khuẩn có hại. Tốt nhất là dùng *Thermobacterrium cereale*, *Lactobacterium planterum* cấy trong môi trường có 20% khoai tây nấu chín hay canh lá củ cải đường để ủ ấm 1-2 ngày. Mỗi tấn thức ăn ủ xanh phải cho thêm vào 7-10 lít canh trùng. Có thể cho thêm các loại men rượu như *Bacterium debriieki*, *Bacl cucumeris fermentalium*, *Bacl pentoacelicum*, mỗi tấn 10 kilô men rượu cho thức ăn thêm phong phú.

Ngoài ra, nên cho thêm muối vào (độ 0,1-0,5% trọng lượng thức ăn ủ tươi) để làm cho nước trong tế bào thực vật thoát ra tạo điều kiện cho vi sinh vật phát triển và làm tăng khẩu vị thức ăn. Cũng có thể dùng axit clohidric và axit lactic để bổ sung thêm (0,1-0,2% axit clohidric để hạ độ pH đến 4,2).

* Ủ nóng

Chất thực vật thành từng lớp (1-1,5 cm), không nén chặt, 1-2 ngày sẽ có một lượng không khí lớn lọt vào trong thức ăn, từ đó các loại men và vi sinh vật hiếu khí tác động đến thức ăn làm cho nhiệt độ tăng lên rất nhanh, có thể đến 45-50°C. Trên mặt lớp thực vật bốc nhiệt rắc một lớp thứ hai có độ dày bằng lớp thứ nhất,

trọng lượng của lớp mới này sẽ ép chặt lớp ở dưới, tổng hết không khí ở dưới ra, làm ngừng sự hoạt động của các loại vi sinh vật hiếu khí. Phương pháp này gọi là ủ nóng vì nhiệt độ sản sinh ra cao hơn so với phương pháp ủ lạnh. Nhưng nhiệt độ không nên để vượt quá 50°C vì quá mức này, sẽ giết chết các dạng hảo nhiệt của vi khuẩn lactic như *Lactobacillus delbriicki*. Mặt khác, sự đốt nóng các chất trong thực vật còn làm mất đi một phần chất dinh dưỡng trong thức ăn, do đó ủ nóng không phải là một phương pháp hoàn hảo để bảo quản thức ăn gia súc. Tuy nhiên cách ủ nóng tỏ ra có lợi khi dùng ủ chua thân cây và một số thức ăn giá trị kém, vì khi bị đun nóng lên những loại thức ăn này trở nên dễ ăn. Ngoài 2 phương pháp trên còn có một số phương pháp bảo quản thức ăn ở trạng thái ẩm trên cơ sở dùng một số axit và hợp chất của axit để ủ chua.

Thu hoạch thức ăn xanh. Nên thu hoạch thực vật vào lúc chất khô chiếm vào khoảng 30%, lúc này cây chưa kết hạt. Về sau chất khô tăng lên chủ yếu là ở trong hạt.

Khi chất khô của thực vật vượt quá 30% thì khó ủ xanh vì thân lá già cứng khó cắt nát, khó san bằng nén chặt, kẽ hở chứa nhiều không khí, vi khuẩn sinh sôi nảy nở sẽ phân giải sản phẩm, làm tổn thất thức ăn. Mặt khác, khi chất khô ở dưới 30% thì thành phần dinh dưỡng của thức ăn ủ xanh sẽ mất đi nhiều.

Nếu cây thức ăn thu hoạch tương đối muộn, chất khô chiếm trên 35% thì nên cho thêm một ít nước để ủ cho

chặt thêm, đồng thời tổng hết không khí ra hạn chế được sự sinh sản của vi khuẩn.

b) Quá trình lên men

Trong quá trình ủ tươi, sự tích tụ axit do quá trình hoạt động của những vi khuẩn tạo axit, làm lên men các chất chứa đường trong thực vật và biến những chất này thành axit.

Vi khuẩn lactic đóng vai trò chủ yếu trong quá trình ủ tươi thức ăn, nhờ nó mà sản sinh ra axit lactic và một phần axit axetic; những axit này làm cho thức ăn có mùi vị thơm ngon nên con vật thích ăn.

Có hai loại vi khuẩn lên men lactic là loại lên men lactic điển hình (men đồng dạng) và loại lên men không điển hình (men dị dạng).

+ Loại vi khuẩn lên men lactic điển hình

Gồm có: *Streptococcus lactis*, *Str. thermophilus*, *Streptobacterium plantarum*, *Lactobacterium bulgaricum*, *Lactob. acidophilum*, *Bact. cucumeris fermentali*.

+ *Streptococcus* là một vi khuẩn không nha bào, trong canh trùng non có dạng liên cầu khuẩn, nó làm cho sữa trở nên chua tự nhiên, nhiệt độ sinh trưởng thích hợp 30-35°C; nó làm lên men dễ dàng glucô, galacto, mantô tạo nên axit lactic, làm sữa ngưng kết sau 10-12 giờ đến 24 giờ.

+ *Lactobacterium* gồm những trực khuẩn tương đối lớn phát triển mạnh ở 40°C trên thạch đĩa có nhũ

thanh, làm ngưng kết lacto, không làm ngưng kết manto. *Lactobacterium acidophilum* có thể sống trong ruột được nên thường được dùng để ức chế vi khuẩn sinh hơi trong ruột. *Thermobacterrium cereale* thường dùng để sản xuất axit lactic.

Những loại vi khuẩn trên làm lên men đường và chỉ tạo nên axit lactic, vì thế chúng được gọi là loại vi khuẩn lên men đồng dạng. Đến nay chúng vẫn được dùng rộng rãi để làm sữa chua, sữa chua kefia, để chế axit lactic, để ủ chua cỏ, và thức ăn xanh cho gia súc.

+ *Loại vi khuẩn lên men lactic không điển hình*

Gồm có: *Bacterium coli*, *Bact. lactis aerogenes*, *Lactobacterium pentoacelicum*, *Betacoccus arabinossaceus*, *Betabasterium breve*. Đó là những vi khuẩn nhỏ có nhiều hình thái, khi làm lên men đường thì tạo ra axit lactic và nhiều sản phẩm khác cho nên nó gọi là lên men dị dạng, tương đối yếm khí (yếm khí phát triển trên môi trường có glucit, háo khí phát triển nhờ có các hợp chất hữu cơ khác).

Nếu trong thức ăn ủ chua, ôxy lọt vào thì vi khuẩn thối dễ phát triển, còn nếu môi trường yếm khí thì vi khuẩn lactic dễ phát triển. Trong trường hợp thứ hai này, vào 2-3 ngày đầu, vi khuẩn lactic đã phát triển mạnh, axit lactic và axit axetic được tích lũy do đó mà thức ăn trở nên chua dần rồi đạt đến độ pH nhất định và các loài vi khuẩn ngừng phát triển. Trong thức ăn ủ tươi tốt, lượng axit tích lũy có thể đạt đến 6-8% trọng lượng chất khô của thức ăn hoặc 1,5-2% trọng lượng

thức ăn ươn. Khối lượng này gồm chủ yếu là axit lactic, nhưng cũng có khi là axit axetic do sự lên men lactic không điển hình.

Ủ tươi muốn tiến hành tốt, trước hết là nhờ ở sự phát triển tốt của vi khuẩn lactic. Nếu loại vi khuẩn này phát triển kém thì lượng axit lactic tích lũy không đủ mức; vi khuẩn thối sẽ phân giải protit, làm cho thức ăn có mùi vị khắm, không dùng được. Nếu đường hòa tan thiếu mà tinh bột nhiều thì không những vi khuẩn thối mà cả vi khuẩn butyric cũng phát triển. Trong trường hợp này thức ăn có mùi vị đắng, gia súc không ăn được. Vì vi khuẩn lactic hình thành là do đường monoxacarit và disacarit, nên sự tích lũy axit lactic trước tiên phụ thuộc vào lượng đường trong cây cỏ. Đối với thức ăn ủ xanh ta phải phân tích trữ lượng đường thực tế gọi là *lượng đường tối thiểu*, có khả năng tạo nên lượng axit lactic cần thiết để cho độ pH của cây cỏ ủ tươi hạ đến mức 4-4,5. Ngô là cây dùng ủ chua tốt nhất vì lượng đường tối thiểu là 3,4-5,4% chất khô, và trữ lượng đường thực tế là 12,0-13,8% chất khô (ngô chứa nhiều đường thực tế hơn lượng đường tối thiểu).

Để cải thiện thức ăn nghèo glucit, người ta thường trộn vào thức ăn đó một lượng đường. Ngược lại có một số loại thức ăn lại quá giàu glucit nên khi đem ủ gây ra hiện tượng quá chua, gia súc vật không thích ăn lắm. Để tránh hiện tượng thức ăn ủ quá chua người ta thường trộn thêm vào loại thức ăn giàu glucit này một loại thức ăn nghèo hydrat cacbon. Thức ăn tươi nói chung có thể

chia thành 3 nhóm: nhóm ủ tươi tốt, nhóm ủ tươi khó và nhóm không ủ tươi được (căn cứ vào lượng đường nhiều hơn so với lượng đường dự trữ tối thiểu, hoặc bằng hay ít hơn lượng đường tối thiểu).

Do đó một sự sơ xuất dù là nhỏ thôi trong kỹ thuật ủ tươi cũng làm cho lượng đường bị tổn thất đi và thức ăn bị hỏng.

Ngoài axit lactic ra, trong thức ăn ủ tươi còn sản sinh nhiều loại axit hữu cơ khác như axit axetic và một ít axit butiric. Axit axetic căn bản là do các loại vi khuẩn lactic sinh ra, thuộc loại cầu khuẩn β (*Betacoccus*) và trực khuẩn β (*Betabacterium*), trực khuẩn ruột già *Escherichia coli* và vi khuẩn axetic trên một mức độ nhỏ. Trong thức ăn ủ tươi phẩm chất tốt, hàm lượng axit axetic có thể đạt tới 40-60% toàn bộ hàm lượng axit hữu cơ.

Nếu lượng axit butiric do vi khuẩn yếm khí, vi khuẩn butiric do vi khuẩn gây thối sản sinh ra trong thức ăn mà vượt quá 0,2% thì có thể làm cho thức ăn bị hỏng. Vi khuẩn butiric theo đất vào thức ăn ủ xanh, vì nó hình thành nha bào nên có tính chất kháng nhiệt; nó rất nhạy cảm đối với độ axit của môi trường, có thể phát triển trong phạm vi pH từ 4,7 đến 8,5, nhưng không thể lên men được ở độ pH 4,0-4,2. Vi khuẩn lên men butiric (thường gặp trong đất, phân, nước bẩn, pho mát...) gồm có *Clostridium butyricum*, *Cl. pasteurianum*, *Cl. felrineum*, *Cl. butylicum*... là những trực khuẩn di động, có lông, hình thành nha bào yếm khí bắt buộc, gram

dương, pH thích hợp 6-7, có thể lợi dụng các hợp chất có đậm ở trạng thái khác nhau, tác động vào các loại đường hoặc axit lactic làm hình thành axit butiric.

Axit butiric thường gây ra mùi thối đặc biệt, gia súc không thích ăn.

Sở dĩ axit butyric có thể sinh ra trong thức ăn ủ xanh thường là do cây cỏ quá non, nước quá nhiều, tạo điều kiện không có ôxy, cỏ non chứa nhiều chất đậm, các loại đường thì có ít, khiến cho *Bacterium lactis* không sinh sản được, lợi cho sự phát triển của vi khuẩn butiric. Vì thế trong khi ủ phải điều chỉnh sao cho pH ở mức 4,0-4,2 khiến vi khuẩn butyric không sinh sản được.

Trong quá trình ủ xanh phần lớn tinh bột sẽ bị các loại vi khuẩn phân giải (như vi khuẩn butiric, vi khuẩn lactic) tạo thành axit, còn xenlulo thì chưa biến hóa.

5. Sử dụng thức ăn vi sinh vật trong chăn nuôi

a) Hoạt động của vi khuẩn

Theo kết quả nghiên cứu, cứ 20-30 phút, vi khuẩn sinh sản (phân bào) một lần; rong đơn bào (tảo) sinh sản mỗi lần thành 4 đến 8 tế bào con, mỗi ngày đêm có thể sinh sản mấy chục lần; men rượu mỗi giờ phân bào một lần. Vi sinh vật còn có khả năng tổng hợp cao: tổng hợp các chất đơn giản trong môi trường thành chất hữu cơ phức tạp. Men rượu có thể tổng hợp 80% đạm vô cơ trong môi trường nuôi cấy thành protit trong một thời gian ngắn. Mỗi mét vuông rong tiểu cầu mỗi ngày tổng hợp được 10g protit, tính ra mỗi hécta mỗi năm thu

hoạch được 30 tấn protit, tức là nhiều gấp trăm lần so với số lượng protit chứa trong cây lương thực trồng trên một diện tích tương đương.

Vi sinh vật chứa trong tế bào nhiều protit và lipit (khoảng 50% protit, 10% lipit); ngoài ra, nhiều loại vi sinh vật dùng để chế biến thức ăn gia súc (như men rượu, nấm mốc, rong tiểu cầu,...) còn chứa nhiều axit amin (như lyzin, valin, metionin, trip tofan,...) và nhiều vitamin (A, B1, B12, B2, B6, C, PP). Thêm vào đó vi sinh vật còn chứa trong tế bào nhiều enzym và nhiều yếu tố quan trọng chưa xác định được, trong đó một số có khả năng sản sinh ra kháng sinh tố. Ngoài ra, thức ăn vi sinh vật có thể cung cấp nhiệt năng rất lớn. Nhiệt lượng của mỗi gam bột rong tiểu cầu là 5,7 kilôcalo, trong khi ấy mỗi gam sản phẩm cây lương thực chỉ sản sinh 3 kilôcalo (lúa nếp 3,5 kilôcalo, khoai lang 1,2 kilôcalo).

Về mặt ứng dụng trong nông nghiệp, thức ăn vi sinh vật có ý nghĩa kinh tế lớn, vì nó có tác dụng nâng cao rất nhiều chất lượng của phụ phẩm nông nghiệp (như dây lạc, dây lang, thân, lá cây bộ đậu, vỏ các loại củ, lõi ngô...).

Theo khả năng tổng hợp thì có thể dùng hai loại vi sinh vật sau đây để chế biến thức ăn cho gia súc.

* Loại vi sinh vật dị dưỡng phát triển trên môi trường có chất hữu cơ (nguồn cacbon hữu cơ) cung cấp sẵn. Những vi sinh vật này gồm có vi khuẩn, men rượu, nấm mốc có khả năng tổng hợp đường và muối chứa nitơ vô cơ thành protit và lipit.

* Loại vi sinh vật tự dưỡng phát triển không cần có sẵn nguồn cacbon hữu cơ, axit amin và các yếu tố sinh trưởng đặc biệt. Những vi sinh vật này gồm có các loại tảo, rong đơn bào, và một số vi khuẩn đặc biệt (như *Azotobacter*, vi khuẩn nitrat hóa sống trong đất) có khả năng tổng hợp những nguyên tố khoáng, muối vô cơ, CO_2 thành hợp chất hữu cơ, axit amin và ozo, dựa vào tác dụng quang hợp hoặc hóa hợp để tự sinh sống.

Tuỳ theo khả năng cung cấp các chất dinh dưỡng, người ta có thể dùng các loại vi sinh vật sau:

- *Vi sinh vật cung cấp protein và axit amin*

Hiện nay người ta đã dùng men rượu (*Saccharomices cerevisiae*), men bia, men bánh mì, một số nấm men, nấm mốc có khả năng tổng hợp protit và lipit mạnh (như *Torula utilis*, *candida utilis*...) và một số loại tảo rong (như *Chlorella*,...) để sản xuất thức ăn đậm.

Ngoài ra, một số vi khuẩn cũng được dùng đến như vi khuẩn ruột già *Escherichiae coli*, vi khuẩn cỏ khô *Bacillus subtilis*. *Aerobađer*, *Aerogenes*, *Micrococcus glutamicus*.

- *Vi sinh vật cung cấp vitamin*

Cung cấp vitamin B2 (riboflavin) có *Clostridium acetobulylicum*, nang khuẩn *Eremothecium*, *ashbyii*, *Ashbya gossypii*.

Cung cấp vitamin B12 có *Pronionibacterium frendreichii*, *Bacillus megaterium*, *Streplomyces olivaceus*. *Bacmethanicus*.

Cung cấp provitamin A (β - caroten) có *Phycomyces blakeslecanus*, *Choanephora cucurbitarum*, và các loại rong *Chorella vulgaris*, *C. pyrenoidosa*.

- Vi sinh vật sản sinh enzym gồm có: vi sinh vật cung cấp amilaza: *Aspergillus oryzae*, *A. niger*; vi sinh vật cung cấp proteinaza: *Bacillus subtilis*.

- Vi sinh vật sản sinh kháng sinh tố dùng trong chăn nuôi gồm có: *Streptomyces aureofaciens* (oreomixin), *Streptomyces rimosus* (teramixin), *Streptomyces griseus* (streptomycin), *Penicillium chrysogenum* (penicilin); ngoài ra còn dùng một số vi sinh vật khác như: *Bacillus subtilis* chủng *aterrimus*, *Streptomyces erythreus* (eritromixin), *S.hygroscopicus* (higromycin B), *S.spheroides* và *S.niveus* (novobioxin) *S.nourse* (nystatin)- *S.antibioticus* (oleandomixin), *S.ambifaciens* (spiramixin), *S.fradige* (tilozin).

b) Các loại thức ăn vi sinh vật

- Men rượu:

Men rượu chứa nhiều protit có giá trị dinh dưỡng cao, nhiều axit amin cần thiết cho sự sống, một số vitamin nhóm B (ergosteron) để biến thành vitamin D (trong 1kilôgam men rượu có từ 1.000-5.000 đơn vị vitamin D₂) và một số nguyên tố khác (như canxi, photpho, kali).

Người ta đã dùng men rượu và những nguyên tố vi lượng (như đồng, coban...) để làm tăng sinh trưởng của lợn; mỗi tấn thức ăn được bổ sung 40g men rượu, 10g

sunfat đồng, 10g clorua coban, 2g IK, hòa với nước muối trước khi trộn với thức ăn. Nguyên tố vi lượng bổ sung vào men rượu có tác dụng giúp cho sự tổng hợp các loại men trong cơ thể gia súc tiến hành thuận lợi. Trong bánh men rượu có nhiều loài vi sinh vật như nấm men (*Saccharomyces cerersiae*, *Saccharomyces pastorianus*), nấm mốc (*Amylomyces rouxii*, *A.rouxianus*, *Mucor rouxii*) và vi khuẩn (*Sareina ventriculi*, v.v...) làm lên men glucit (mônô và dixacarit) tạo thành rượu và khí cacbonic. Trong những năm gần đây việc dùng bánh men rượu để chế biến thức ăn cho gia súc đã được ứng dụng rộng rãi từ 1964 đến nay ở nhiều địa phương và cơ sở chăn nuôi (Cao Bằng), Gia Lâm, Đông Anh (Hà Nội), Yên Mỹ, Văn Giang (Hải Hưng), Kim Anh (Vĩnh Phú), Thuận Thành (Hà Bắc), Đô Lương (Nghệ Tĩnh).

Men rượu (men thuốc bắc) ủ vào thức ăn như cám gạo theo tỷ lệ 4% so với thức ăn tinh có tác dụng làm biến đổi thành phần hóa học của thức ăn theo chiều hướng tốt, kích thích khẩu vị làm cho gia súc ăn hết khẩu phần và nâng cao hàm lượng các chất dinh dưỡng. Số lượng tế bào nấm men tăng dần, cao nhất sau khi ủ 24 giờ. Từ 18 đến 24 giờ, lượng tế bào tăng tương đối nhanh (12 triệu đến 860 triệu/g thức ăn), từ 36 đến 48 giờ có chiều hướng giảm dần (818 triệu đến 814 triệu/g thức ăn). Các dạng đạm chuyển hóa rõ rệt (đạm phức tạp thành đạm đơn giản, đạm thực vật thành đạm protein của nấm men, đạm vô cơ thành đạm hữu cơ). Lượng đạm tổng số hầu như không biến đổi. Từ 0 giờ

đến 48 giờ, mức 20mg xê dịch không đáng kể (thấp nhất là 20,03mg, cao nhất là 20,72mg/1g vật chất khô). Từ 0 đến 18 giờ, đạm protein lúc đầu giảm, trái lại đạm phi protein tăng. Từ 24 đến 48 giờ, có sự thay đổi ngược lại. Hàm lượng rượu không nhiều (từ 16,3 đến 20,4 mg/1g vật chất khô) và tăng dần theo chiều hướng tăng dần của tế bào nấm men, rượu gây mùi vị thơm ngon.

Thực tế cho thấy:

- Lợn (từ 60 đến 120 ngày tuổi) ăn men rượu sẽ sinh trưởng tốt, dịch ở dạ dày tiết ra nhiều hơn so với lợn không ăn men.

Lượng axit chung (gồm HCL và axit lactic) trong dịch vị dạ dày ở con lợn ăn men rượu cao hơn con lợn không ăn men.

Hoạt lực men pepxin của dạ dày ở con lợn ăn men rượu cao hơn lợn không ăn men, ảnh hưởng tốt đến sự tiêu hóa thức ăn.

Tỷ lệ tiêu hóa của thức ăn ủ men rượu có chiều hướng cao hơn thức ăn không có men rượu, nhất là đối với protit và glucit trong thức ăn, do hoạt lực của men pepxin được tăng cường, ảnh hưởng tốt đến sự phân giải protit và hấp thụ thức ăn. Riêng tỷ lệ tiêu hóa chất mỡ và xơ thì chênh lệch không đáng kể.

- Lợn từ 60 đến 180 ngày tuổi được ăn bằng thức ăn ủ men rượu tăng trọng nhiều hơn lợn không ăn men rượu (trên 20%), lông mượt, da mịn và có màu phớt hồng; thịt chắc. Số lượng hồng cầu, bạch cầu, huyết sắc

tổ giữa hai lô chênh lệch khá rõ rệt. Thức ăn tiêu tốn để tăng 1 kg thịt hơi ở lô ăn men rượu ít hơn lô không ăn men rượu; mức độ cảm nhiễm giun sán ở lô có ăn men rượu ít hơn hẳn lô không ăn men.

- Đối với gà con, nghé, dê con, men rượu bổ sung vào khẩu phần ăn hàng ngày cũng làm tăng trọng hơn hẳn những con vật không được ăn men rượu.

Bánh men rượu thuốc bắc ở các địa phương miền Bắc được chế từ môi trường hỗn hợp rất phức tạp gồm có bột gạo và nhiều vị thuốc bắc (từ 3 đến 23 vị). Trong đó có rất nhiều các chủng nấm men, nấm mốc và các vi sinh vật khác. Để đáp ứng yêu cầu sản xuất ở các địa phương cần đơn giản hóa môi trường nhân giống men rượu (để có thể sản xuất men rượu, với quy mô lớn) có thể rút bớt một số vị thuốc bắc chỉ lấy một số vị và lấy một vị (1 phần) làm đơn vị tính theo từng công thức mà không ảnh hưởng đến chất lượng của men rượu. Ví dụ:

- Công thức men rượu 6 vị thuốc bắc:

Sa nhân:	1 phần
Thảo quả:	2 phần
Quế thân:	2,5 phần
Thăng ma:	1,5 phần
Đại bôi:	3 phần
Xương truật:	2 phần

- Công thức men rượu 4 vị thuốc bắc:

Sa nhân:	3,8 phần
Thảo quả:	4 phần

Quế thân: 4,5 phần

Thăng ma: 4 phần

Hoặc:

Thiên niên kiện: 0,7 phần

Thảo quả: 1,5 phần

Quế thân: 1 phần

Thăng ma: 1 phần

- Công thức men rượu 3 vị thuốc bắc:

Thảo quả: 3 phần

Quế thân: 4 phần

Thăng ma: 3 phần

Hoặc:

Thiên niên kiện: 0,5 phần

Quế thân: 1 phần

Thăng ma: 1 phần

Ngoài ra, ở những nơi thuốc bắc khan hiếm có thể thay thế thuốc bắc bằng một số cây lá địa phương. Ví dụ: - ở miền núi, đồng bào dân tộc đã dùng các lá rừng sau đây làm men rượu:

Nét ty ma: 1 nắm

Nét ty po: 1 nắm

Phật sữa: 1 nắm

Pắc giút: 1 nắm

Màm mò: 1 nắm

Phật phừ: 1 nắm

Nhã ngãi: 1 nắm

Phung sản:	1 nắm
Bột gạo:	2 kg
Riềng tươi:	0,1 kg

- Ở nơi khác người dân có thể sản xuất bánh men rượu bằng lá vả thiếu, lá nhãn, bồ kết, lá dẻ.

Để sản xuất men rượu với quy mô lớn hơn, phải có một môi trường nuôi cấy và nhân giống đơn giản hơn với những nguyên vật liệu dễ kiếm, bằng cách phân lập và giám định các chủng nấm men trong bánh men rượu lấy từ các địa phương và chọn những chủng có hoạt tính tốt, phát triển nhanh, có giá trị dinh dưỡng cao toàn diện, có khả năng đồng hóa mạnh các chất đường bột và khoáng (N và P vô cơ).

Một số nấm men có hoạt lực cao là: chủng TX 256, QT 256 và V.G.L.024.

+ Chủng TX 256 phát triển những khuẩn lạc tròn, đường kính 1-2m/m màu trắng đục, màu sữa đặc, mặt lồi lên, nhẵn, ướt, rìa gọn, có mùi rượu thơm, tế bào hình trứng trên 6 micron, sinh chồi, gram dương.

+ Chủng QT 256 có khuẩn lạc tròn, đường kính 3m/m, hình thái tương tự khuẩn lạc TX 256, mùi rượu, hơi chua, tế bào hình trứng trên 6m/m, sinh chồi, gram dương.

+ Chủng V.G.L.024 có khuẩn lạc tròn, đường kính 3-5m/m, màu trắng trong hoặc trắng đục, ruột rỗng, giữa có núm vú, chung quanh có sọc khía làm cho mép khuẩn lạc có hình răng cưa và bề mặt khuẩn lạc gọn, tế

bào hình trứng trên 4 micron, sinh sản theo lối khuẩn ty giả, bắt màu không đều, gram dương.

Cả 3 chủng này đều phát triển dễ dàng trên môi trường cám hấp và nếu kết hợp nuôi cấy cả 3 chủng trên một môi trường thức ăn gia súc (cám hấp) thì chúng sẽ phát triển mạnh hơn là khi nuôi cấy từng chủng một, và lượng tế bào sẽ tăng gấp 10 lần so với bánh men thuốc bắc. Sau khi ủ được 24 giờ, số lượng tế bào đạt tới 1.340 triệu và sau khi nuôi cấy từ 3-5 ngày (trong môi trường cám hấp ở nhiệt độ thích hợp 30-32°C) số lượng tế bào tăng gấp 200 lần so với số lượng cấy ban đầu.

Kết quả:

- + Lượng đạm protein có xu hướng giảm dần.
- + Lượng đạm amin có xu hướng tăng dần.
- + Lượng tế bào tăng cao nhất sau 24 giờ, sau đó giảm dần.
- + Axit sau khi ủ 24 giờ mới hình thành.
- + Nhiệt độ tăng lên khoảng 34-35°C, rồi giảm xuống 33-34°C và duy trì ở mức này.

Hoặc một số chủng nấm men khác như:

+ Chủng TH 27 thuộc giống *Trichosporon* có khả năng phát triển nhanh trên môi trường tinh bột, đồng thời cũng phát triển trên môi trường đường, không có khả năng lên men rượu mạnh.

+ Chủng TH 265 thuộc giống *Saccharomyces* có khả năng phát triển rất nhanh (không kém *Torula*) trên môi

trường tinh bột, môi trường đường và có khả năng lên men rượu khá mạnh tạo mùi vị thơm mát của rượu nếp.

Trên môi trường cám sau 48 giờ số lượng tế bào của mỗi chủng đạt hàng chục triệu tế bào trong 1ml, nếu cấy chung 2 chủng thì tổng số tế bào trong đơn vị thể tích vượt quá số lượng tế bào so với cấy riêng lẻ từng giống cộng lại, mà lại tận dụng được những đặc tính tốt của 2 chủng. Đặc biệt khi nhân 2 chủng TH 27 và TH 265 trên môi trường cám, nếu có bổ sung thêm một lượng sunfat đạm và supe lân thì tốc độ phát triển càng mạnh và không cần nấu chín thức ăn khi ủ men.

- Men bia

Men bia, *Saccharomyces cerevisiac*, là một loại vi sinh vật có khả năng tổng hợp protit, vitamin và kích thích tố, lại có khả năng sinh trưởng nhanh, nuôi cấy dễ dàng nên nó đã được dùng làm thức ăn cho gia súc rất tốt. Thành phần hóa học của men bia gồm có:

Nước: 68,0-75,0%

Protit thô: 13,0-14,0%

Glicozen: 6,0-8,0%

Mỡ thô: 0,9-2,0%

Khoáng: 1,77-2,5%

Men bia còn chứa một số vitamin với hàm lượng sau:

Vitamin B1: 1,7 mg trong một lít

Vitamin B2: 1,0 mg trong một lít

Vitamin B6: 3,7-8 mg trong một lít

Vitamin PP: 10-60 mg trong một lít

Có thể chế men bia bằng bột khoai lang, cám, nước vo gạo đặc và một số chất khoáng dưới thể canh trùng dịch thể hoặc đông bánh và cấy men vào các loại thức ăn gia súc (như bột ngô, lõi ngô, khoai lang củ, khoai nước...).

- *Nấm men Torula utilis*

Loại nấm men thuộc lớp nang khuẩn Ascomyces giống như men bia, nhưng khác họ có chứa trong tế bào nhiều protit và vitamin, nên trong những năm gần đây đã được dùng để chế biến thức ăn cho gia súc. *Torula utilis* phát triển tốt trong các môi trường có đường làm nguồn cacbon trong dung dịch các loại đường. Men này sinh sản rất nhanh, nên chỉ cần một thời gian ngắn là có thể tích lũy một lượng protit rất lớn.

Người ta đã dùng các loại phế phẩm trong công nghiệp chế tạo đường (như bã mía, rỉ đường...), các chất bột, các loại củ có bột và các sản phẩm phụ công nghiệp có nhiều sợi xơ (như rơm rạ, bã giấy...) để làm nguyên liệu đường hóa nhằm cung cấp chất đường nuôi *Torula utilis*. Để thủy phân chất xơ (xenlulo), người ta dùng cao áp và axit sunfuric biến chất xơ thành đường cấp năm (pento), cấp sáu (hexo) rồi đem lọc và trung hòa, để dùng nuôi cấy *Torula utilis*. Môi trường nuôi cấy gồm dung dịch đường thủy phân sunfat đậm và supe lân. Khi nuôi cấy nếu giữ nhiệt độ 28-30°C, cung cấp đủ ôxy, khuấy trộn đều thì chỉ trong vòng 10-24 giờ quá trình lên men sẽ hoàn thành, hình thành một chất lên men đặc như keo (1ml men có 1 tỷ vi sinh vật).

Trong thực tiễn sản xuất có thể dùng các loại phế phẩm (như bã mía), hoặc thân cây ngô, bí ngô, bột khoai, dong riềng... để đường hóa làm nguyên liệu cấy *Toula utilis* trong chum, vại. Sau khi cấy độ 10 giờ có thể cho gia súc ăn trực tiếp hoặc đem cấy vào thức ăn cho lợn đã nấu chín (cám, bột ngô, khoai lang) rồi ủ cho lên men ở nhiệt độ 26 đến 28°C trong khoảng 4-5 ngày trước khi cho ăn.

- Vi khuẩn cố định đạm Azotobacter

Vi khuẩn cố định đạm đã được dùng trong chăn nuôi vì có chứa nhiều protit, axit amin và vitamin. Tế bào vi khuẩn cố định đạm *Azotobacter* có chứa tới 17 dạng axit amin khác nhau. Những axit amin này là đơn vị cấu thành abumin của cơ thể. *Azotobacter* tập trung đạm không khí và biến đạm đó thành protit. *Azotobacter* thường chứa vitamin nhóm B như B12. Vitamin B12 có tác dụng kích thích chức năng tạo máu của cơ thể, đặc biệt là tăng số lượng hồng huyết cầu và hàm lượng huyết sắc tố trong máu, mặt khác còn có tác dụng phòng và chống bệnh thiếu máu của gia súc. Vitamin nhóm B (B2, B6, B12) có vai trò quan trọng trong trao đổi anbumin và nâng cao tổng hợp abumin, ảnh hưởng tới trao đổi hydrat cacbon, xúc tiến quá trình sinh trưởng của gia súc non.

Vi khuẩn cố định đạm đã được ứng dụng để nuôi lợn con còn đang bú và sau cai sữa, lợn vỗ béo, gà đẻ trứng và gà con bằng cách cho thêm vào khẩu phần thức ăn chế phẩm cố định đạm *Azotobacter* (đối với lợn: từ 10-

15ml một đàn lợn 1 ngày, 500ml một lợn trong một tháng; đối với gà: cho 2-2,5ml mỗi gà, mỗi ngày trong một tháng liền). Kết quả cho biết lợn được ăn vi khuẩn cố định đạm đã tăng trọng vượt đối chứng 0,9-2,3kg trong một tháng (tăng trọng 12%), giảm mức chi phí thức ăn cho một đơn vị tăng trọng là 14,3%, hạ giá thành thức ăn được 11%, lợn ăn ngon miệng, tỷ lệ cảm nhiễm bệnh ký sinh trùng và bệnh truyền nhiễm giảm đi nhiều. Còn gà mái thì đẻ tăng 3 trứng trong một tháng, gà con sức sinh trưởng tăng, tỷ lệ chết giảm đi nhiều. Người ta đã dùng 3 loại *Azotobacter* phân lập từ đất, có khả năng cố định đạm cao là: *Azotobacter chroococcum*, *A. agile* và *A. vinelandii*, và một giống *Azotobacter* phân lập từ ruột lợn là *Azotobacter suis* để chế *Azotobacterin*. Ngoài ra *Azotobacterin* cấy vào thức ăn cho lợn để nâng cao hàm lượng chất đạm thô; nếu để 4 ngày thì hàm lượng protein thô tăng đến 6%, 5 ngày thì tăng 17,7%. Người ta còn chế hỗn hợp vi khuẩn cố định đạm với các loại men (như *Torula utilis*), đem nuôi cấy trong môi trường có cám ở nhiệt độ 30-37°C trong 5 ngày, rồi cho thêm cám, đóng thành viên men, làm khô ở nhiệt độ 30-37°C. Men này có thể cùng sinh sống một cách thuận lợi với vi khuẩn cố định đạm; đến ngày thứ 5 sau khi lên men, thức ăn có mùi thơm, nếu chua quá thì có thể cho thêm ít cám hoặc khô dầu vào rồi đem nuôi lợn con mới cai sữa bằng cách trộn vào thức ăn (mỗi ngày lợn có thể tăng trọng được từ 100 đến 200g).

- *Bacillus subtilis*

Trực khuẩn cở khô (subtilin) là một loại vi sinh vật chứa nhiều đạm, vitamin và chất kháng sinh, có thể kiểm chế được nhiều loại vi khuẩn như vi khuẩn đường ruột E.coli, tụ cầu khuẩn, vi khuẩn uốn ván, bạch hầu, lao,... và một số virus như virus cúm...

Ngoài ra nó còn chứa một số enzym như enzym chất đạm, chất mỡ, chất bột, chất xơ.

Khi sử dụng bacillus subtilis người ta cấy canh trùng hoặc bánh khô vào cám nấu chín (1 bánh khô bóp nhỏ trộn với 10kg cám), một ngày khuấy trộn 2 lần trong 4-5 ngày, sau cùng đem trộn với rau cho lợn ăn. Cho lợn 2-4 tháng tuổi và lợn còi cọc ăn, kết quả cho thấy lợn sinh trưởng tốt, da lông mượt, không bị ỉa chảy, tăng trọng nhanh.

- Các loại rong *Chlorella*, rong tiểu cầu

Hiện nay một số nước trên thế giới đang nghiên cứu sản xuất các loại rong đơn bào hạ đẳng có khả năng tổng hợp nhiều chất hữu cơ (4/5 chất hữu cơ hình thành hàng năm trên quả đất là do rong tổng hợp nên), mỗi mét vuông rong tiểu cầu mỗi ngày có thể tổng hợp được 10g protit. Mỗi hecta ao hồ có thể thu hoạch được 75.000kg rong hàng năm, trong đó có 30.000-37.500kg protit, 7.500-15.000kg lipid, v.v...

Trong những năm gần đây rong tiểu cầu đã được dùng làm thức ăn cho gia súc và gia cầm.

Rong tiểu cầu chứa nhiều protit, lipid, axit amin (nhiều nhất là lizin) và vitamin (như vitamin A, B1, B2,

B6, C, PP) trong đó nhiều nhất là vitamin A và vitamin C. Ngoài ra còn chứa một số nguyên tố vi lượng và chất kháng sinh (clorenlin) có tác dụng kiềm chế vi khuẩn đường ruột.

- *Vi khuẩn lactic, Axidofilin*

Canh trùng vi khuẩn lactic gọi là axidofilin có ảnh hưởng tốt đến sự phát triển của gia súc non, có thể dùng để nuôi lợn con, vì axidofilin chứa nhiều đạm, đường mỡ, vitamin và muối khoáng. Ngoài ra axidofilin còn có tác dụng sát trùng đối với một số vi khuẩn đường ruột như E.coli, trực khuẩn phó thương hàn, các loại vi khuẩn làm thối (tạo nên các chất độc có hại cho cơ thể gia súc). Tác dụng sát trùng này là do sự có mặt của axit lactic và những chất có tác dụng kháng sinh chứa lợn con ỉa cứt trắng.

ABK chế từ máu gia súc (trâu, bò, lợn khoẻ ở lò sát sinh) được đánh bằng đũa có pha thêm 2 phần nước đã đun sôi để nguội, đun nóng khuấy đều để nguội, lọc qua vải gạc, rồi đem hấp 120°C (1 atmotfe) trong 30 phút. Sau đó còn pha thêm vào đây phần nước lọc và một phần sữa đã gạn hết mỡ (không có sữa thì thay thế bằng 3% lacto và 0,5% NaCl), đun sôi 30 phút, đóng chai rồi hấp 120°C trong vòng 30 phút (pH - 7,2). Cấy giống vi khuẩn *Lactobacterium axidophilum* vào, để ủ ấm 37°C trong 36 giờ.

Để phòng bệnh lợn con ỉa cứt trắng mỗi ngày có thể cho lợn con 2-15 ngày tuổi uống 15-20ml, 15-30 ngày tuổi: 25-30ml, trên 30 ngày tuổi: 30-40ml; cho lợn mẹ

70-100ml, bê nghé 200-300ml (mỗi ngày 2-3 lần trong 3 ngày liền). Nếu là điều trị thì cần tăng liều lên gấp rưỡi.

6. Sử dụng vi sinh vật làm chất kháng sinh cho gia súc

Chất kháng sinh đã được dùng rộng rãi trong ngành thú y để phòng và chữa bệnh cho gia súc, nhất là đối với những bệnh nhiễm trùng. Ngoài tác dụng phòng chữa bệnh nó còn có khả năng kích thích sự sinh trưởng của động vật, xúc tiến mạnh sự chuyển hóa vật chất, nâng cao hiệu suất lợi dụng thức ăn của gia súc, giảm bớt bệnh tật, nâng cao tỷ lệ nuôi sống (đối với súc vật nhỏ), nâng cao chất lượng thịt, nâng cao tỷ lệ sinh sản và đề phòng bệnh truyền nhiễm cho gia súc (với liều lượng 10-50 lần ít hơn liều chữa bệnh). Đối với gia súc non và gia cầm, kháng sinh tố có thể nâng cao làm tăng trọng từ 20-90%, đối với súc vật lớn hiệu lực có ít hơn.

Trong ngành chăn nuôi hiện nay, người ta dùng phổ biến là oreomycin và teramycin. Thực tế, vì kháng sinh đắt tiền nên người ta có xu hướng dùng loại kháng sinh thô, lấy từ môi trường nuôi cấy chưa tinh chế, để cho gia súc ăn chữa bệnh lợn con ỉa cứt trắng, đậu gà và bước đầu ứng dụng cho gà lợn ăn.

Kháng sinh tố thô là một loại xạ khuẩn màu vàng, có sợi nấm nhỏ và bào tử, phát triển theo 3 giai đoạn là giai đoạn cấy bào tử, giai đoạn nhân giống và giai đoạn sản xuất. Để phổ biến người ta đã dùng nhiều nguyên liệu trong nước (như tấm gạo, ngô, khoai tây, khoai sọ, ...) trong cả 3 giai đoạn chế biến để thay thế

nguyên liệu nước ngoài mà vẫn đạt kết quả tốt. Khi cho gia súc ăn cần trộn vào thức ăn, đối với lợn cứ mỗi tấn thức ăn trộn vào 1-10 oreomixin hoặc teramixin nguyên chất, bê mỗi tấn thức ăn trộn vào 34-40g, gia cầm mỗi tấn thức ăn trộn vào 1-10g. Nếu dùng kháng sinh tổ thô thì phải căn cứ vào tỷ lệ trên mà tính ra. Sau đây là liều lượng (trộn vào thức ăn cho ăn trong 10 ngày).

Gà từ 11 ngày đến 20 ngày tuổi: 0,2mg

Gà từ 21 ngày đến 30 ngày: 0,1-0,3mg

Lợn từ 10-25kg cho: 15-30mg

Lợn 50-100kg cho: 60mg

Kết quả cho biết, nhờ có kháng sinh tổ mức tăng trọng của lợn đạt 35%, của bê là 30% và của gia cầm là 10-16%.

7. Sử dụng vi sinh vật tạo thêm vitamin cho gia súc, gia cầm

Vai trò của vitamin trong sự sinh trưởng và phát dục của cơ thể gia súc rất quan trọng. Trong thực tiễn sản xuất, người ta đã dùng vi sinh vật để vitamin hóa thức ăn cho gia súc, đồng thời còn chú ý bổ sung thêm cả vitamin B12, B2 và vitamin D.

- *Vitamin B12* (Xianocobalamin). Vitamin này được coi là "thuốc bổ máu". Hiện nay nhiều nước trên thế giới đã sản xuất vitamin B12 bằng những loài vi khuẩn sau đây: *Propionibacterium freudreichii*, *Propionibacterium shermanii*, *Bacillus megatherium*, *Bac methanicus*.

Ngoài ra, người ta còn làm lên men bã rượu bằng

những vi khuẩn tổng hợp vitamin B12 (ví dụ: *Bacterium acidipropionici*) để thu vitamin B12. Trong thực tiễn sản xuất người ta thường dùng hạt ngũ cốc (hạt ngô) để chế môi trường nuôi cấy *Bacterium acidipropionici*.

Chế phẩm vi sinh vật cố định đạm azotobacterin cũng là một nguồn cung cấp vitamin B12 quan trọng cần được chú ý trong chăn nuôi.

- Vitamin B2

Vitamin B2, thường được dùng trong các trại nuôi gia cầm nhằm nâng cao số lượng trứng đẻ và trứng nở.

Người ta chế vitamin B2 dựa trên tác dụng lên men của vi khuẩn *Clostridium acetobutylicum* (trong điều kiện yếm khí), nấm Ascomycete: *Eremothecium ashbyii* và *Ashbya gossypii* (trong điều kiện hiếu khí) và *Aspergillus flavus*.

- **Vitamin D.** Nấm men là một trong những nguồn giàu ergosterin (tiền vitamin D3) được tạo ra trong các điều kiện hiếu khí. Canh trùng men càng già thì số lượng ergosterin càng cao, có thể đến 5-6% trọng lượng khô của chất men. Ngoài ra người ta đã chiếu tia tử ngoại vào men để làm tăng hàm lượng vitamin D nuôi gia súc và gia cầm.

II- VI SINH VẬT Ở ĐƯỜNG TIÊU HÓA CỦA ĐỘNG VẬT VÀ VIỆC PHÒNG BỆNH

1. Vi sinh vật ở đường tiêu hóa

a) Miệng

Ở niêm mạc miệng, trong nước bọt có cầu khuẩn, một

số vi cầu khuẩn, trực khuẩn gram dương, trực khuẩn gram âm, xoắn khuẩn *Leptospira*, xạ khuẩn *Actinomyces*, vi khuẩn loại PPLO, nấm men *Candida albicans*. Nước bọt, niêm mạc bài tiết ra chất sát trùng có tác dụng diệt một số vi khuẩn.

b) Ruột, dạ dày .

Vi sinh vật có trong dạ dày tương đối ít, do tác dụng diệt khuẩn của dịch chua của dạ dày. Trong dạ dày có trực khuẩn có nha bào và trực khuẩn kháng axit *Sarcina venticuli* (động vật ăn cỏ), bào tử của nấm mốc (chứa trong cỏ và không khí ở chuồng gia súc), các bào tử này vào theo đường tiêu hóa và sinh sản trong dạ dày.

Hệ vi sinh vật của dạ cỏ của động vật nhai lại phong phú hơn, gồm có vi khuẩn làm thối, trực khuẩn yếm khí tùy tiện có nha bào. Số lượng vi khuẩn có thể lên tới hàng trăm triệu trong 1g chất chứa trong dạ cỏ.

Trong dạ dày ngựa có *Sarcina*, *Streptococcus*, *Bacillus subtilis*, *Bacterium megatherium* (trực khuẩn khoai tây), *Aerobacter aerogenes*, xạ khuẩn, những vi khuẩn này có sức đề kháng tương đối cao.

Ngoài ra, trong dạ dày còn có vi khuẩn làm lên men (*Oidium lactic*, *Torula sp.*, *Saccharomyces minor*), trực khuẩn lactic (*Lactobacillus beljerineke*, *Bacterium lactis acidii*...).

Mặc dù dịch dạ dày có tính chất sát trùng, nhưng tính chất này cũng bị hạn chế do một số nhân tố. Ví dụ:

trực khuẩn ty thư (*Streptococcus equi*) và độc tố bệnh thiếu máu truyền nhiễm khi vào dạ dày có thể gây bệnh, nhưng trực khuẩn lao, cầu khuẩn, trực khuẩn có nha bào (*Bacillus anthracis*) khi vào dạ dày sẽ bị dịch toan của dạ dày tiêu diệt. Còn các trực khuẩn ở ruột và dạ dày (trực khuẩn phổ thương hàn) có thể qua dạ dày mà không bị tiêu diệt. Những vi khuẩn nằm bên trong một khối thức ăn có thể thoát khỏi tác dụng diệt khuẩn của dịch dạ dày.

Ruột non chiếm 2/3 đến 2/5 chiều dài của toàn bộ ruột, nhưng số lượng vi khuẩn lại có rất ít, nhất là ở tá tràng. Điều này có nhiều nguyên nhân: Khi dịch dạ dày vào ruột non vẫn còn có tác dụng sát khuẩn, ngoài ra dịch do niêm mạc ruột non bài tiết ra cũng có tác dụng sát khuẩn. Thêm đó mật và dịch tụy tạng bài tiết qua tá tràng cũng có tác dụng sát khuẩn.

Ruột non chứa một số ít vi khuẩn có trong dạ dày. Trong ruột non chủ yếu có: *E.Coli*, cầu khuẩn, trực khuẩn yếm khí có nha bào, trực khuẩn yếm khí có nha bào, *Aerobacter acrogenes*. Ở gia súc non có thêm *Streptococcus lactis*, trực khuẩn lactic, *Lactobacterium bulgaricum*. Từ hồi tràng, số lượng vi khuẩn bắt đầu tăng lên.

Số lượng vi khuẩn trong ruột già tăng lên nhiều. Hệ vi sinh vật chủ yếu gồm trực khuẩn ruột già *E.Coli*, cầu khuẩn ruột *enterococcus*, trực khuẩn có nha bào. Ở gia súc trưởng thành *E.Coli* chiếm 75% trở lên.

Trong phần ruột già của động vật, cùng với hệ vi sinh vật hoại sinh, còn thấy các loại vi khuẩn gây bệnh nhưng bệnh chưa thể hiện bằng triệu chứng lâm sàng như: vi khuẩn phó thương hàn, Brucella, uốn ván..., những vi khuẩn này theo phân ra ngoài và là yếu tố làm lây lan bệnh.

Hằng ngày một số loại vi khuẩn đã theo thức ăn vào ruột, sống và sinh sôi nảy nở ở đây, có thể bị biến đổi ít nhiều, nhưng căn bản vẫn sống cho đến khi con vật chết.

Thành phần, số lượng và chất lượng của hệ vi sinh vật của đường ruột và dạ dày phụ thuộc vào tuổi, loài, cách nuôi dưỡng, những điều kiện vật lý hóa học của môi trường đường ruột, dạ dày.

Khi động vật sơ sinh được nuôi bằng sữa thì ở trong ruột có nhiều vi khuẩn lactic. Lúc con vật chuyển sang ăn thức ăn thô thì thành phần vi sinh vật cũng thay đổi tùy loại thức ăn, nếu thức ăn chứa nhiều glucit thì số lượng vi khuẩn tạo axit trong ruột phát triển nhiều.

Vi sinh vật theo thức ăn vào ruột sẽ chịu một sự biến đổi, phần lớn các loại vi khuẩn chết đi, một phần thích nghi với điều kiện mới và sinh sản. Có thể chia hệ vi sinh vật đường ruột ra làm hai loại: loại "vi sinh vật tùy tiện" thay đổi tùy theo điều kiện thức ăn, và loại "vi sinh vật bắt buộc", loại này thích nghi được ngay với môi trường đường ruột, dạ dày và trở thành loại định cư vĩnh viễn. Hệ vi sinh vật bắt buộc gồm có: Streptococcus lactic, Lactobacterium acidophilum, trực khuẩn lactic,

E. Coli (trực khuẩn ruột già), trực khuẩn đường ruột. Ngoài ra trong ống tiêu hóa của loài nhai lại còn gặp trực trùng hiếu khí và yếm khí gây thối; trực khuẩn lên men tinh bột, chất pectin, phân giải đại mô bào: trực khuẩn xenlulo; trực khuẩn yếm khí có nha bào, cầu khuẩn, xạ khuẩn, vi khuẩn ưa nhiệt; bào tử nấm mốc và nấm men.

Trong đường ruột và dạ dày thường xảy ra nhiều quá trình vi sinh vật học phức tạp liên quan đến sự phân giải các chất dinh dưỡng.

Các chất cacbon của thức ăn dưới sự tác động của vi khuẩn lactic sẽ bị phân giải với sự tạo thành axit lactic, axit axetic, axit propionic (và một số axit khác), cồn và khí (CO_2 , NH_4 và hydro).

Đại mô bào, xenlulo chịu sự tác động của vi khuẩn xenlulo yếm khí (*Bacterium cellulosac dissolvens*) có tác dụng lên men phân giải đại mô bào (75% mô đa bào của thức ăn được Bact, cellulosa phân giải trong dạ cỏ của động vật ăn cỏ. Trong dạ cỏ sự phân giải này được tiến hành là nhờ tác động của men xenluloza làm cho xenlulo thủy phân thành gluco dễ tiêu hóa đối với động vật. Vi khuẩn xenlulo cũng theo thức ăn vào dạ dày trước, sinh sản ở đó và tham gia vào sự lên men của mô đa bào của thức ăn.

Sự hoạt động của vi khuẩn xenlulo bị yếu dần khi thức ăn chuyển sang ruột non, tá tràng và phần đầu ruột già. Trong ruột cùng, hồi tràng, trực tràng, hoạt tính của vi khuẩn xenlulo yếm khí được phục hồi. Chất

tinh bột được phân giải là do các vi khuẩn bài tiết ra amilaza và do các men chứa trong thức ăn thực vật.

Chất protit được phân giải trong ruột một phần là do trực khuẩn làm thối bài tiết ra men dung giải ptotit (protidaza).

2. Vai trò của vi sinh vật trong việc phòng bệnh

a) Tổng hợp protit

Trong ruột các vi khuẩn phân giải các chất hữu cơ và sử dụng một phần để tổng hợp protit cần thiết cho cấu tạo cơ thể của chúng.

Rất nhiều loài vi khuẩn đường ruột có khả năng đồng hóa amoniac và các axit amin. Khi vi khuẩn chết đi thì protit của bản thân chúng được cơ thể gia súc hấp thụ rất tốt.

b) Tạo vitamin

Một số vi khuẩn đường ruột có khả năng tạo vitamin nhóm B (như *Bacillus subtilis*, *Bac. vulgatus*, *Bacterium coli*). Vì vậy khi thức ăn bị mất vitamin B, nhưng động vật nhai lại vẫn khoẻ mạnh, không thấy xuất hiện triệu chứng thiếu vitamin B. Vi khuẩn còn tổng hợp được nhiều vitamin B₁₂ và axit folic trong dạ cỏ loài nhai lại và ruột già của động vật nói chung. Vitamin B₁₂ tạo ra trong ruột già chỉ được sử dụng ở mức rất ít hoặc hoàn toàn không sử dụng. Chỉ có động vật nhai lại mới hấp thụ được vitamin B₁₂ từ dạ cỏ và ruột non.

Các loại vitamin được tổng hợp sẽ vào các môi trường chung quanh hoặc được giữ lại trong cơ thể vi khuẩn.

Ngoài ra, vi khuẩn còn tổng hợp được vitamin PP.

c) Tạo sức đề kháng

Vi khuẩn lactic có sức đề kháng cao, chống được kiềm, fenola, indola..., thường thấy trong ruột của động vật non đang bú sữa mẹ.

Vi khuẩn lactic còn có khả năng kiềm chế sự phát triển của trực khuẩn đường ruột (*E. coli*, phó thương hàn, vi khuẩn gây thối) nhờ sự tạo thành axit lactic.

Vi khuẩn *Lactobacterium acidophilum* sống dễ dàng trong môi trường đơn giản (pH từ 3,5 đến 8), cho nên nó có khả năng sống dễ dàng trong ruột, tạo ra axit lactic và một số sản phẩm có tính chất kháng sinh và vitamin nhóm B.

PHẦN II

VI SINH VẬT TRONG CÁC SẢN PHẨM CHĂN NUÔI

I- VI SINH VẬT TRONG SỮA VÀ PHƯƠNG PHÁP BẢO QUẢN

1. Các loại vi sinh vật trong sữa

Trong sữa luôn luôn có một số cầu khuẩn phát triển. Trong lúc vắt sữa và chế biến sữa nhiều loại vi khuẩn ở đất, phân, không khí và lông có thể theo nhiều đường và từ nhiều nguồn gốc khác nhau đi vào trong sữa. Trong số vi khuẩn ấy thì một số có ích, một số không quan trọng, một số có ảnh hưởng không tốt đến sữa và một số rất có hại. Người ta chia ra làm 3 loại chính: loại vi khuẩn thường thấy ở sữa (hệ vi sinh vật bình thường), loại vi khuẩn không bình thường và loại vi khuẩn gây bệnh.

1.1. Hệ vi sinh vật bình thường

Vi khuẩn bình thường của sữa gồm mấy chục loại, chúng thường thấy ở sữa và tồn tại một cách phổ biến ở chuồng bò (các phương pháp sát khuẩn thông thường khó tiêu diệt chúng).

Hệ vi sinh vật bình thường của sữa gồm có các loại: vi khuẩn lactic, vi khuẩn butiric, vi khuẩn propionic, vi khuẩn gây thối, nhóm trực khuẩn coli aerogenes...

* *Vi khuẩn lactic*

Loại vi khuẩn lactic điển hình làm lên men đường sữa tạo ra axit lactic và một số sản phẩm phụ khác là axit axetic, axit formic, axit succininic, không tạo ra hoặc tạo ít khí. Loại vi khuẩn lactic chia làm 2 nhóm chính là nhóm liên cầu khuẩn và nhóm trực khuẩn.

a) *Nhóm liên cầu khuẩn lactic*

- *Streptococcus lactic* sinh trưởng tốt trong nước thịt pepton làm lên men lacto, gluco, galacto, manto, dextrin. Nó giữ vai trò quan trọng trong việc làm chua sữa (độ chua đạt tới 120° Tecne).

- *Strept cremoris* làm cho sữa có độ chua thấp hơn (110°-115°T), do đó sản phẩm sữa có vị ngon hơn.

- *Strept citrovorus*, *Strept paracitrovorus*, *Strept thermophilus* phát triển ở nhiệt độ cao, mọc ở nhiệt độ tối thích hợp là 45°C, chúng làm cho sữa đông sau 12-14 giờ, và làm cho sữa chua dễ ăn.

- *Strept liquifaciens* hoặc *Mammococcus* làm sữa đông nhanh và sau đó chất đậm thuỷ phân mạnh nên sữa có vị đắng. Loại vi khuẩn này phát triển tốt ở nhiệt độ 40°C, làm cho sữa chua tới 115°T và làm cho phomat có vị đắng.

b) *Nhóm trực khuẩn lactic* gồm có ba loại là loại ưa nhiệt, loại cầu trực khuẩn và loại beta.

- *Loại trực khuẩn lactic ưa nhiệt* phát triển tốt ở nhiệt độ 40-45°, nó làm đông sữa sau 12 giờ và độ chua đạt 300-400°T (tạo ra 3,5% axit lactic). Loại vi khuẩn này gồm có:

+ *Bacterium bulgaricum* (hay *thermobacterium*), vi khuẩn này do Metschnikoff phân lập từ sữa chua đặc Bungari, nó làm lên men sữa chua đặc.

+ *Bacterium acidophilum* (hay *Lactobacterium acidophilum*). Đây là loại vi khuẩn ở đường ruột của động vật, nhất là động vật ăn cỏ. Nó sinh trưởng, thích nghi ở 37°C, làm lên men lacto, manto, sacaro trong ruột. Lacto, acidophilum có thể dùng để chữa các bệnh đường ruột.

+ *Bacterium casei* (hay *Thermobacterium helveticum*). Vi khuẩn này phát triển tốt ở 40°C làm chín phomat.

- Loại cầu trực khuẩn *Streptobacterium* gồm có *Streptobacterium mesophilum* phát triển ở nhiệt độ thích hợp là 30°. Nó làm sữa đông sau 3-5 ngày, độ chua của sữa đạt tới 200-250°T, nó làm chín phomat Hà Lan và lên men Kefia.

- Loại *Beta bacterium* tạo ra một độ chua yếu không đủ để làm sữa đông, nhưng làm cho sữa có mùi thơm.

* Nhóm trực khuẩn *Coli - aerogenes*

Đây là nhóm trực khuẩn đường ruột thường xâm nhập vào sữa do phân tươi, phân chuồng, nên chúng làm cho sữa có mùi phân chuồng khó ngửi. Nhóm này khác nhóm vi khuẩn lactic ở chỗ nó làm đông sữa chậm, qua 3-4 ngày, hoặc hoàn toàn không làm đông sữa, chúng tạo ra axit butiric, axetic, propionic, khí hydro, axit cacbonic với số lượng lớn, và cồn etilic với số lượng ít.

Nhóm này gồm có *Bacterium coli* và *Bact latis aerogenes*.

a. *Vi khuẩn butiric* gồm có *Clostr. butyricum*, *Cl. butylicum* và *Cl. nastearianum*. Vi khuẩn butiric thường xâm nhập vào sữa thức ăn, phân, rơm rạ độn chuồng..., và khi vắt sữa không đúng vệ sinh. Vi khuẩn butiric tạo ra nha bào có sức đề kháng cao với nhiệt độ cao.

Khi lên men đường sữa vi khuẩn butiric tạo ra axit bay hơi, axit này làm cho sản phẩm sữa có mùi khó ngửi (mùi mỡ ôi), ngoài ra nó còn tạo ra axit formic, axetic, propionic, cacbonic và khí hydro.

Vi khuẩn butiric phát triển ở nhiệt độ tối thích hợp là 30-35°.

b. *Vi khuẩn propionic*

Đây là một loại trực khuẩn không hình thành bào tử, phát triển tốt trong môi trường yếm khí, ở nhiệt độ tối thích hợp là 30-35°. Đại biểu điển hình là *Bacterium acidii propionici* có hình trực khuẩn hoặc cầu khuẩn. Nó phát triển chậm trong sữa, làm sữa đông trong 7-10 ngày, với độ chua là 160-170°T. Nó tạo ra axit propionic, axetic, một lượng axit formic, butiric, valerianic và khí cacbonic. Nó tham gia vào quá trình chín của một số phomat và làm cho phomat có mùi thơm đặc biệt.

c. *Vi khuẩn gây thối*

Loại vi khuẩn gây thối không lên men đường sữa, gồm có: vi khuẩn hiếu khí, yếm khí. Chúng có khả năng

bài tiết ra men dung giải chất đậm, làm phân giải protit trong sữa. Sự pepton hóa chất đậm đi đôi với việc tạo thành pepton làm cho sữa có vị đắng. Nhiều loại vi khuẩn gây thối bài tiết ra men lipaza phân giải mỡ.

Vi khuẩn gây thối chỉ phát triển ở nhiệt độ 25-35° hay thấp hơn, tạo ra amoniac làm cho sữa có phản ứng kiềm. Vi khuẩn gây thối rất nhạy cảm đối với axit nên bị axit lactic kiềm chế.

*** Nấm mốc và nấm men**

a. Nấm mốc

Trong lớp *Siphomycetes* (nấm có khuẩn ti thể không có vách ngăn cách) người ta thường gặp trong sữa hay sản phẩm sữa các giống *Mucor* và *Rhizopus*. Đặc biệt *Mucor mucedo* và *Rhizopus nigricans* thường làm hỏng phomat loại mềm.

Trong lớp *Ascomycetes* (nấm có khuẩn ti thể có vách ngăn cách, có nang chứa nang bào tử) thường gặp trong sữa các giống *Aspergillus* (như *Aspergillus glaucus*) và nhất là *Penicillium* (như *Penicillium glaucum* có bào tử màu lục, *Penicillium album* có bào tử trắng biến thành xanh khi chín muồi, *Penicillium candidum* có bào tử trắng). Những bào tử này thường sắp xếp thành chuỗi.

Trong lớp nấm không hoàn toàn, có khuẩn ti thể có vách ngăn cách, hình thành bào tử bên ngoài, người ta thường gặp các giống *Geotrichum* (trước kia gọi là *Oidium* hoặc *Oospora*), *Monilia* và *Cladosporium*.

Nấm mốc thường mọc tốt trong môi trường axit nên

chúng không phát triển trong sữa tươi, trái lại chúng phát triển mạnh ở những sản phẩm sữa chua (như nấm mốc *Oidium lactic*). Một số nấm mốc tạo ra trên bề mặt của phomat với những biểu hiện là những vết có màu khác nhau.

Các loài nấm mốc nói trên rất hiếu khí và phát triển trên bề mặt môi trường. Chúng tác động đến môi trường axit và đặc biệt là đến sữa bị axit lactic hóa. Trong trường hợp này, chúng kiềm hóa môi trường và thiêu đốt axit lactic.

Phần lớn nấm mốc bài tiết lipaza rất mạnh có tác dụng thủy hóa chất béo, và proteaza làm thoái hóa chất đạm.

b. Nấm men

Nấm men là một loại vi sinh vật đơn bào, hình cầu, trái xoan, có kích thước từ 1-5 μ đến 2-9 μ . Phần lớn nấm men có khả năng biến đường thành rượu cồn và sinh sản bằng chồi. Đó là loại nấm không có khuẩn tì thể.

1.2. Hệ vi sinh vật không bình thường của sữa

Hệ vi sinh vật này ít thấy hơn hệ vi sinh vật trên, chúng thường nhiễm vào sữa do vệ sinh kém. Cho nên nếu ta giữ vệ sinh tốt thì có thể tránh được nhiễm khuẩn cho sữa, hoặc ta có thể tiêu diệt được những loại vi khuẩn này nếu tìm ra được nguồn nhiễm bẩn và biết xử lý kịp thời. Những loại vi khuẩn này thường làm hỏng sữa, làm cho sữa kém phẩm chất hoặc bị nhiễm vi khuẩn gây bệnh.

* Vi khuẩn làm xấu sữa

Một số vi khuẩn làm cho sữa mất mùi vị bình thường. Vi khuẩn làm cho sữa đắng gồm có: trực khuẩn có bào tử cầu khuẩn ở vú (làm cho sữa xấu từ lúc mới vắt) *Micrococcus casei*. Các loại vi khuẩn gây thối (có bào tử không bị diệt bằng phương pháp Paster) cũng làm hỏng sữa. Vị đắng của sữa có thể xuất hiện sau khi được bảo quản ở nhiệt độ thấp. Nếu sữa có mùi ôi thối là do vi khuẩn lưu huỳnh (*Bact. fluorescens*) đã tiết ra men lipaza làm phân giải mỡ tạo ra các loại axit butyric, anđehit của rượu và các chất làm cho sữa có mùi ôi. Nếu sữa lên men là do vi khuẩn đường ruột và các loại men trong sữa tươi, hoặc do men butyric trong sữa đã hấp sát khuẩn theo phương pháp Paster.

Nếu sữa dễ kéo sợi là do độ chua tăng lên hoặc là do các vi khuẩn *Streptococcus lactis*, *Bacterium lactis viscosum* sản xuất ra hợp chất glucoprotein (là mucin) làm cho sữa thành lầy nhầy. Sữa có màu sắc khi bị nhiễm vi khuẩn sinh sắc tố: sữa có màu đỏ do *Chromobacterium prodigiosum*, màu xanh do sự phát triển của *Pseudomonas pyocyanea*, *Bact. cyanogenes*, *Bact. synchytrium* màu vàng do *Bact. synchytrium*. Đó là những loài vi khuẩn hiếu khí làm cho sữa nhuộm màu trên bề mặt, màu sắc lan rộng ra trên bề mặt, rồi phát triển vào bên sâu. Hiện tượng sữa nhuộm màu thường xuất hiện trong kinh doanh bảo quản sữa lâu.

Sữa có mùi xà phòng, có tính chất kiềm là do *Bacillus saponacei* xâm nhập vào sữa từ rơm, cỏ (sữa

này không đông, ở dưới đáy bình sữa có một lớp chất lắng cặn nhầy niêm dịch). Có nhiều loài vi khuẩn phát triển mạnh làm thay đổi thành phần hoá học của sữa, làm giảm lượng đường sữa lacto, và tăng chất muối, làm cho sữa đắng và mặn.

Sự bài tiết không bình thường của sữa có thể do vú bị viêm bởi các loại vi sinh vật khác nhau. Ví dụ: *Streptococcus mostitides* làm cho sữa bài tiết kém đi, trở nên mặn và đắng, lượng NaCl và KCl tăng, còn lượng lacto giảm xuống, trong sữa xuất hiện sợi chỉ, sợi lông lầy nhầy, sau đó sữa có mùi vị khó chịu. Vi khuẩn gây viêm vú thường vào cơ thể gia súc theo đường tiêu hoá, cũng có thể vào vú do tay, máy vắt sữa, bắn dính đất, chất độn chuồng, rác, hoặc một số vi khuẩn đường ruột (như *Micrococcus*) có sẵn trên da vú.

** Vi khuẩn gây bệnh và những bệnh lây lan do sữa*

Sữa bị nhiễm khuẩn là nguyên nhân làm lây lan một số bệnh truyền nhiễm. Vi khuẩn gây bệnh xâm nhập vào sữa từ người ốm hoặc vật mang vi khuẩn (do ruồi nhặng) hay từ ngoại cảnh qua các giai đoạn; vắt, chuyên chở và chế biến sữa.

Có thể chia làm 2 nhóm bệnh do sữa truyền đi là: nhóm bệnh ở động vật truyền qua sữa và nhóm bệnh ở người truyền qua sữa.

2. Vi sinh vật trong sản phẩm sữa

Để bảo quản sữa được lâu kết hợp với chế biến người ta thường sản xuất ra các loại sản phẩm như sữa chua, bơ, phomat bằng cách ứng dụng sự lên men lactic.

2.1. Sữa chua

Sản phẩm sữa chua thường chia làm 2 loại chính là: sữa lên men lactic (sữa chua đặc axidofilin) và sữa lên men hỗn hợp lactic và men rượu (sữa Ya-ua, sữa Kefia, sữa ngựa chua có rượu và sữa Kumi). Những chế phẩm sữa này được tạo ra từ các quá trình lên men lactic (do vi khuẩn lactic làm sản sinh ra axit lactic) từ đường sữa lacto có tác dụng kiểm chế sự phát triển của vi khuẩn thối, do đó chế phẩm sữa có thể giữ được lâu.

Các sản phẩm sữa chua không những có giá trị dinh dưỡng cao mà còn có tác dụng chữa bệnh, cơ thể dễ hấp thụ (một số nhà khoa học cho rằng sự có mặt của axit lactic trong ruột làm tăng sự tiêu hóa photpho và canxi của cơ thể). Trong sữa chua có trực khuẩn ưa axit và các men sữa có khả năng bài tiết chất kháng sinh, kiểm chế sự phát triển của *Staphylococcus* và còn tiêu diệt được loại vi khuẩn này. Do đó sữa có hoạt tính kháng sinh cao để chế các sản phẩm sữa chua nhằm chữa bệnh.

* *Sữa chua đặc axidofilin*

Axidofilin được chế biến từ sữa bò tươi đã khử mỡ và khử khuẩn theo phương pháp Paxto ở nhiệt độ 85-90°C, bảo quản làm nguội ở nhiệt độ 38-42°C dưới tác dụng của vi khuẩn lactic *Lactobacterium (bulgaricum)* *Lactobacterium acidophilum*, *Streptococcus lactic*: sự lên men lactic được tiến hành ở nhiệt độ 34-40°C trong 4-6 giờ. Sau đó sữa chua được bảo quản trong thời gian là 98 giờ. Axidofilin không những có tác dụng chữa và

phòng bệnh đối với súc vật non, nhất là đối với các bệnh đường ruột, mà còn có tác dụng kích thích sinh trưởng ở gia súc non: bê, nghé, lợn con, gà vịt con, v.v...

* *Sữa Ya-ua*

Sản phẩm sữa chua này được chế từ sữa bò, dê cừu hoặc trâu, được làm lên men bằng các vi khuẩn *Streptococcus thermophilus* và *Lactobacillus bulgaricus*. Các loại men chua này được chế bằng cách cấy các vi khuẩn nói trên vào sữa tươi rồi để nuôi ở nhiệt độ 100 đến 115°F (37,8°C đến 46,1°C) cho đến khi vi khuẩn phát triển mạnh sinh nhiều axit và mùi vị.

Để sản xuất sữa Ya-ua người ta cấy vào sữa đã thanh khuẩn 1% men chua và để nuôi ở nhiệt độ 98,6 đến 100°F (37° đến 37,18°C) trong 10 đến 12 giờ. Sau đó thành phẩm sữa Ya-ua được đóng chai và giữ ở nhiệt độ 50°F (10°C) đến khi dùng.

* *Sữa Kefia*

Sữa Kefia có thể sản xuất từ sữa bò, dê và cừu. Men chua là hạt Kefia chế từ các vi khuẩn lactic (*Streptococcus lactic* và *Lactobacillus bulgaricus*) và nấm men lên men lacto. Sữa dùng để sản xuất sữa Kefia được thanh khuẩn ở nhiệt độ +90°C trong 15 phút và hạ nhiệt ở nhiệt độ +20°C về mùa hè và +25°C về mùa đông. Người ta cho vào sữa đã được xử lý từ 5 đến 8% men chua, hạt Kefia chứa streptococcus lactic, một số nấm men và vi khuẩn lên men khác. Thời gian làm chua vào khoảng 10 đến 20 giờ. Để làm chín sữa chua, người ta giữ nó ở nhiệt độ +8° đến +10°C. Axit lactic

được hình thành với tỷ lệ 0,5 đến 1,0%, đồng thời với khí cacbonic và rượu (tỷ lệ 0,3 đến 1,0%) sau 3 đến 5 ngày.

2.2. Bơ

Bơ là một sản phẩm chứa nhiều mỡ của sữa được chế từ kem sữa. Sau đây là thành phần trung bình của một kilôgam bơ:

Chất mỡ: 820 đến 845g.

Chất khô không chứa mỡ (cazein, lacto, muối khoáng) 5 đến 20g.

Nước: 150 đến 160g.

*** Cách chế biến bơ**

Có nhiều loại bơ như bơ chua, bơ ngọt, bơ nấu chảy, bơ mặn và không mặn.

Trong công nghiệp người ta thường chế biến bơ theo các giai đoạn sau đây: chuẩn bị sữa và váng sữa, tách váng sữa và đo độ béo của váng sữa, thanh khuẩn theo phương pháp Paxto, làm chín bằng lý học và đánh kem, rửa hạt bơ, chế biến cho muối và đóng gói.

Để có váng sữa người ta phải phân ly sữa bằng cách đun sữa trong thùng bằng nước nóng hoặc trong máy thanh khuẩn kiểu Paxto (đến nhiệt độ khoảng 35°-40°C). Khi thùng của máy phân ly quay và tốc độ ly tâm tăng lên thì phần nhẹ của sữa (như váng sữa) hướng vào trung tâm thùng, còn phần sữa không có chất béo thì tách ra phía thành. Váng sữa chứa lượng chất béo khác nhau, loại để sản xuất bơ chứa khoảng 24 đến

45%, còn loại dùng cho nhu cầu trực tiếp chứa 10, 20 và 30%. Sau khi phân ly và lấy váng sữa đưa đi làm lạnh để sản xuất bơ. Váng sữa chia làm hai loại là loại I có độ axit từ 13 đến 16°T và loại II có độ axit từ 16 đến 20°T, những váng sữa không thuộc loại I và II sẽ không đủ tiêu chuẩn để sản xuất bơ. Sau khi có váng sữa, người ta phải thanh khuẩn váng sữa để tiêu diệt vi sinh vật và làm mất hoạt tính của các loại men. Nếu chế biến bơ ngọt thì khử khuẩn ở nhiệt độ 85° đến 90°C. Sau khi thanh khuẩn, váng sữa được làm lạnh nhanh và làm chín theo cách lý học ở 0,5° đến 2,5°C trong 1-1,5 giờ (nếu ở 2,5° đến 4°C thì thời gian là dưới 3 giờ). Quá trình làm chín lý học này được tiến hành trong thùng làm chín váng sữa có cánh khuấy, trong đó có nước hay nước muối được làm lạnh. Để làm chín váng sữa người ta cho tác động với một loại men chua đặc biệt trong một thời gian ngắn hoặc dài tùy theo phương pháp. Nếu là phương pháp làm chua lâu thì người ta cho vào váng sữa từ 5 đến 10% men chua và giữ ở nhiệt độ 10°C đến 12°C trong 12 đến 16 giờ. Sau khi cho men chua vào, độ axit của váng sữa cần phải ở trong giới hạn từ 25° đến 30°T. Sau đó người ta đánh kem ở nhiệt độ 8°C đến 10°C về mùa xuân - hè và nhiệt độ 11°C đến 14°C về mùa thu-đông. Đánh bơ trong 35-45 phút, kết thúc đánh bơ khi những hạt bơ có kích thước khoảng 3m/m. Đánh bơ xong thì lấy ra rửa nước sạch vài lần, nước có nhiệt độ thấp hơn nhiệt độ hạt bơ từ 2° đến 4°C.

Tiếp theo là giai đoạn chế biến bơ nhằm làm cho bơ

có một khối đồng nhất, chứa một lượng nước xác định. Người ta cho bơ chảy qua các trục nghiền trong thùng làm bơ. Bơ còn được cho thêm muối để tăng vị, tăng tính bền vững và dễ bảo quản. Hàm lượng muối không quá 1% về mùa đông và không quá 1,5% về mùa hạ.

Cuối cùng bơ được đóng gói và bảo quản ở nhiệt độ không quá 6°C và ở độ ẩm tương đối của không khí dưới 80%, trong thời gian không quá 5 ngày ở kho bảo quản.

Để chế biến bơ nấu chảy người ta phải đun nóng gián tiếp váng sữa bằng nồi hơi nước ở nhiệt độ 75°C. Cho vào nồi hơi khoảng 10-25% nước; cho thêm vào bơ nấu chảy 3-5% muối rồi khuấy thật kỹ. Sau khi bơ lắng, rót bơ vào thùng rồi làm lạnh ở nhiệt độ 10°C đến 14°C. Bơ nấu chảy chứa 98% chất béo và dưới 1% độ ẩm.

** Các dạng hư hỏng của bơ*

Những dạng hư hỏng về khuẩn vị và mùi vị. Sự hư hỏng của bơ gây ra do một số vi sinh vật (bơ ôi, mùi vị axit, mùi vị phomat, mùi vị mốc...) hoặc do nguồn gốc hóa học (mùi kim khí, mùi mỡ bò, mùi cá, mùi đường cháy...).

- *Bơ ôi* là dạng phế phẩm phổ biến nhất, gây ra do sự thủy hóa chất mỡ, giải phóng ra một số axit hay hơi có mùi cay (như axit butiric, caproic, v.v....

Nếu bơ bị ôi do chất xeton thì những axit được giải phóng sẽ bị oxy hóa thành metila xeton bay hơi có mùi rất khó chịu. Có nhiều nhân tố làm cho bơ bị ôi. Trong một số trường hợp, đó là do lipaza của vú, trong những

trường hợp khác thường hay xảy ra là do vi khuẩn sản xuất lipaza. Orla - Jensen có nêu vai trò của những vi khuẩn làm dung giải casein hình thành amoniac và có thể kết hợp với axit béo để sản sinh những chất có mùi hôi thối khó ngửi. Những vi sinh vật làm cho bơ ôi gồm chủ yếu là nấm mốc (*Geolrichum*, *Cladosporium*, *Penicillium*) và vi khuẩn (vi khuẩn huỳnh quang, vi cầu khuẩn, v.v...), ít khi do nấm men.

- Bơ có mùi vị axit là do sự phát triển quá độ của những men axit hoá trong kem và do rửa bơ không kĩ.

- Bơ có mùi phomat là do sự hoai hoá của casein trong kem hoặc bơ bởi những vi khuẩn dung giải protein.

- Bơ có mùi nấm men là do sự phát triển của nấm men, của lacto trong kem hoặc bơ làm xuất hiện sự lên men rượu. Những loại nấm men này phát triển nhiều về mùa hè trong kem axit.

- Bơ có mùi mốc là do sự phát triển của nấm mốc trong bơ tích trữ trong kho, những loại nấm mốc này tác động dung giải casein và mỡ rất cao.

- Bơ có mùi mỡ bò là do sự oxi hoá chất mỡ làm hình thành peroxit trong bơ tích trữ trong kho.

- Bơ có mùi cá, là do sự oxi hoá của những axit không bão hoà của lexitin và glixerit. Sự paxto hoá kem ở nhiệt độ cao hơn 90°C có thể làm hình thành những chất kháng oxy hoá ngăn trở sự hư hỏng này.

- Bơ có mùi đường cháy, mùi khét là do sự paxto hoá

làm không kỹ, do xử lý kem quá axit. Cazein kết tủa cũng như lacto bước đầu bị đốt (than hoá) cũng làm xuất hiện mùi khó ngửi.

** Các phương pháp bảo quản bơ*

Để tránh cho bơ hư hỏng ta phải ngăn trở sự phát triển trong bơ một hệ vi sinh vật khác hệ vi khuẩn lactic. Muốn như thế phải hấp kem theo kiểu Paxto và tránh nhiễm khuẩn khi chế biến thành bơ. Cần chế biến bơ một cách vô khuẩn, sát khuẩn kỹ dụng cụ, làm việc trong bầu không khí không nhiễm bẩn, dùng men thuần khiết, nước tinh khiết để rửa bơ, bao gói vô khuẩn... Để tránh bơ bị hư hỏng do nguyên nhân hoá học nên dùng thiết bị bằng thép không han gỉ, và kiểm tra thường xuyên sự tinh khiết của nước rửa về mặt hoá học.

Muối bơ bằng clorua natri là phương pháp bảo quản cũ nhất (muối là chất sát khuẩn duy nhất được pháp lý cho phép trên thế giới). Khi tỷ lệ muối không quá 5%, người ta gọi bơ rửa - muối. Khi tỷ lệ muối ở giữa 5 và 10% thì gọi là bơ mặn.

Trong thực tế có thể bảo quản bơ tốt với 2-3% muối mà không làm thay đổi mùi vị.

Có thể muối bơ bằng cách trộn bơ với muối tinh khiết và mịn. Nhưng phương pháp bảo quản bơ chắc chắn nhất là bằng kho lạnh. Ở nhiệt độ giữa -10°C và -15°C , bơ có thể bảo quản hoàn toàn tốt trong nhiều tháng. Bơ không nên tích trữ vào cùng với kho chứa thịt, cá và phomát, bơ đem ướp lạnh vào kho phải được bao gói cẩn thận, tốt nhất là dùng thùng bọc giấy nhôm.

** Kiểm tra phẩm chất của bơ*

Trong phòng thí nghiệm người ta thường kiểm tra bơ về các mặt sau đây:

- + Đo độ ẩm (tối đa 16%).
- + Tìm chất khô không phải bơ (tối đa 2%).
- + Kiểm tra không có chất sát khuẩn cho thêm.
- + Kiểm tra sự vô hoạt của photphataza kiểm.
- + Chuẩn độ vi khuẩn coli (tối đa 25 trong một gam).

2.3. Kem lạnh

Có nhiều loại kem lạnh như: kem sữa, kem bơ, kem hoa quả v.v... được sản xuất với nguyên liệu là sữa, bơ, sữa hộp, trứng, đường, chất thơm, v.v...

Tùy theo công thức của từng loại kem lạnh mà người ta chuẩn bị hỗn hợp kem, sau đó đem thanh khuẩn ở nhiệt độ 68°C - 70°C trong 30 phút lọc và đông hóa ở nhiệt độ 70°C ở áp suất 100-150 atmotfe. Cuối cùng làm lạnh hỗn hợp ở nhiệt độ 2°C - 4°C và làm chín trong 4-6 giờ rồi giữ trong tủ lạnh. Sau khi kem đông đặc thì đóng gói lại để bảo quản ở nhiệt độ -18°C hoặc thấp hơn.

2.4. Phomat

*** Cách chế biến phomat**

Phomat được cấu tạo chủ yếu do chất casein của sữa.

Phomat được chế biến từ sữa được làm chua dựa trên một loạt quá trình vi sinh vật học. Trong đó quan trọng nhất là sự lên men lactic và propionic. Trước tiên người ta làm đông sữa tươi hoặc sữa đã được khử khuẩn theo phương pháp Paxto bằng men dạ dày (prezua) rồi cho

tác động với vi khuẩn lactic. Axit lactic được tích lũy sẽ tăng cường tác dụng của men dạ dày và làm hình thành nhiều cục sữa. Những men dạ dày tác động vào protit của sữa là men casein và paracazein làm hình thành pepton, axit amin. Paracazein khó hòa tan trong sữa, tạo ra cục sữa gồm có axit amin, tiroxin, triptofan, đạm amin và một số lượng photpho không đáng kể. Trong công nghiệp để sản xuất phomát người ta phải làm đông đặc sữa bằng men làm đông tụ hay men pepxin. Ngoài ra có thể sản xuất phomát bằng cách làm lên men axit lactic, rồi chế biến sữa cục và làm chín. Phương pháp thứ nhất dùng để chế phomát đông đặc, phương pháp thứ hai dùng để chế phomát chua, loại thứ nhất phổ biến hơn.

Quá trình sản xuất phomát công nghiệp gồm các giai đoạn sau đây: thu nhận và chuẩn bị sữa, làm đông đặc sữa, tách cặn sữa (làm đông cục đặc biệt), đổ khuôn và ép cục sữa (muối và làm chín phomát).

Sữa dùng cho việc sản xuất phomát có độ axit không được quá 19°T và sau khi đã thanh khuẩn có độ axit khoảng 20°T , nếu có độ axit dưới 16°T hay trên 20°T thì không thích hợp. Sau khi thu nhận sữa, người ta phải xác định độ béo, rồi tiến hành thanh khuẩn nhanh ở nhiệt độ $72^{\circ}\text{--}75^{\circ}\text{C}$. Làm đông đặc sữa bằng men làm đông đặc hay men pepxin. Người ta thường dùng men pepxin có độ hoạt động theo tỷ lệ 1 : 100.000 (làm sữa đông đặc ở nhiệt độ 35°C trong 40 phút). Sữa sẽ đông đặc ở nhiệt độ $28^{\circ}\text{--}36^{\circ}\text{C}$ và khi nó đông cục thì cặn sữa

được tạo thành. Độ béo của sữa càng cao thì việc tách cặn sữa càng khó. Khi hàm lượng muối canxi thiếu thì sẽ tạo thành sữa cục nhão. Vì thế để sản xuất sữa cục tiêu chuẩn, người ta cho thêm vào sữa dung dịch canxi clorua 40%. Nếu đem đun nóng sữa cục thì sẽ làm co rút thể tích và rút ngắn được sự tách sữa trong.

Sau khi sữa cục hình thành, người ta dùng dao cắt nó theo hai hướng thẳng góc với nhau, rồi đảo phomat; đun nóng lần thứ hai ở nhiệt độ 38°C - 56°C để tách chất béo của hạt bơ; khuấy cho phomat có độ khô và độ đàn hồi nhất định.

Để cho hạt phomat dính lại thành khối người ta thường ép phomat; cho phomat dẻo vào thùng, hạt phomat sẽ lắng xuống đáy, dùng gỗ ép bốn phía rồi ép bên trên với một trọng lượng là 1kg cho 1kg phomat trong 10-20 phút. Ép xong cắt thành miếng bằng nhau rồi đổ vào khuôn, cuối cùng ép những hạt phomat đã thành khuôn cho dính lại với nhau.

Để làm tăng vị và thúc đẩy quá trình chín của phomat, người ta muối phomat trong dung dịch muối ăn đã lọc sạch từ 6 đến 10 ngày trong điều kiện nhiệt độ không quá 10°C - 11°C và độ ẩm tương đối của không khí là 93-95%, nước muối có nhiệt độ từ 8°C đến 10°C . Muối xong người ta đem sấy khô trong 5 đến 6 ngày, cuối cùng chuyển vào hầm làm chín. Quá trình chín của phomat là một quá trình lên men. Để thúc đẩy quá trình này, có thể cho thêm vào phomat một lượng men chua.

Hầm lên men có nhiệt độ 18°C - 22°C , độ ẩm 80-90%.

Sự lên men lactic sẽ tiếp tục nếu còn chứa đường lacto (khi ép huyết thanh sữa thường mang theo hầu hết đường lacto nên trong thời gian ủ chín hầu như không còn hoặc còn ít sự lên men lactic). Đầu tiên *Streptococcus lactis* lên men lacto cho đến khi hết đường thì nó chết dần và được thay bằng trực khuẩn lactic. Pepton được tích lũy là do sự phân giải protit, sau đó trực khuẩn lactic cũng chết dần. Lúc này trong phomát, loại vi khuẩn propionic bắt đầu hoạt động mạnh làm lên men muối lactat thành axit propionic, axit axetic và CO_2 . Cả 2 loại axit này đều làm cho phomát có vị chua và mùi hăng đặc biệt. CO_2 làm phomát có khe hồng, tạo ra túi hơi, gọi là mắt phomát.

Sự lên men propionic trong phomát sẽ kết thúc sau 2 tháng hoặc 2 tháng rưỡi. Trong thời gian ủ chín casein tiếp tục được phân giải chậm dưới tác dụng của men dạ dày, men pepxin làm đông sữa và vi khuẩn lactic. Khi phomát đã chín thì khoảng 2/3 casein được phân giải thành pepton, axit amin và một ít amoniac.

** Sự hư hỏng của phomát*

- Phomát bị trướng

Do tác dụng của vi khuẩn nhóm coli- aerogenes và vi khuẩn butiric, phomát thường bị hỏng trong giai đoạn ủ chín, trong bể muối, trong khi nén, (phomát mềm đi, trướng lên, nếu dùng loại có mùi axit butiric). Để ngăn ngừa phomát bị trướng, nên dùng loại sữa không có trực trùng ruột loại coli aerogenes và trực trùng butiric, sữa đã khử khuẩn theo phương pháp Paxto.

- *Phomat có vị đắng*

Do sự có mặt của cầu khuẩn ở vú (Mammococcus).

- *Phomat có nấm ở vỏ*

Ở vỏ có nấm hình thành vết đậu, tạo ra những lỗ hổng.

- *Phomat chứa vi khuẩn bệnh truyền nhiễm*

Do dùng sữa chứa vi khuẩn bệnh truyền nhiễm để chế phomat (như streptococcus mastitidis sống trong phomat được 1 tháng, 1 khuẩn lao sống được 4 tháng, Richettsia sống được 1 tháng rưỡi đến 3 tháng).

2.5. Sữa đặc và sữa bột

** Sữa đặc có đường*

Sữa cô đặc là sữa hay váng sữa đã khử khuẩn (ở 87°C) được cô đặc với đường. Sữa dùng để cô đặc có độ axit không cao quá 20°T. Trong công nghiệp người ta thường cô đặc sữa trong thiết bị chân không ở nhiệt độ 52°-59°C và ở áp lực chân không 620-600mm thủy ngân để sữa bốc hơi cho đến khi hàm lượng chất khô trong sữa đặc ở 20°C là 74,3-74,5%. Sau đó, người ta làm lạnh sữa đặc, rồi đóng hộp kín.

Sữa đặc chứa 44,6% đường, 8,8% chất béo, 20,7% chất khô không béo và 25,9% nước.

Ở miền Bắc nước ta sữa đặc có đường đã được sản xuất ở một số nông trường nuôi bò sữa như nông trường Ba Vì, Mộc Châu.

** Sữa bột*

Sữa bột hoặc sữa khô là sữa hay váng sữa được sấy khô không có đường hoặc có đường bằng phương pháp

công nghiệp (sấy, phun chân không sau khi sữa đã được cô đặc đến một mức độ quy định ở nhiệt độ $70^{\circ}\text{--}75^{\circ}\text{C}$). Sữa bột sản xuất ra được làm nguội trong máy lạnh ở $26^{\circ}\text{--}28^{\circ}\text{C}$ và đóng hộp.

Sữa bột chứa 25% chất béo, 4 đến 7% nước.

3. Bảo quản sữa

Để bảo quản tốt sữa từ lúc vắt ra đến khi tiêu thụ, trong quá trình chuyên chở sữa từ nơi vắt đến nơi bán, chế biến hoặc thu mua, cần phải bảo đảm sữa ở nhiệt độ từ 4° đến 10°C (nhiệt độ tủ lạnh). Sữa tươi dùng ăn hoặc chế biến đều cần được sát trùng để ngăn chặn sự phát triển của các loại vi sinh vật làm hỏng sữa.

Ban đầu (sau 3 giờ) vi khuẩn gây thối rửa chiếm tỷ lệ cao nhất (86,2%), tỷ lệ đó hạ thấp dần, sau 36 giờ chỉ chiếm 1,8%. Lượng vi khuẩn lactic trái lại lúc bắt đầu chiếm tỷ lệ thấp nhất (6,2%) đến giờ thứ 36 tăng lên đến 90,2%, với sự phát triển của vi khuẩn lactic, sau đó một lượng lớn axit lactic đã hình thành, có tác dụng kiềm chế các loại vi khuẩn khác và khi nồng độ axit của sữa đạt tới 1,2% thì vi khuẩn lactic cũng bị ức chế. Ở nồng độ axit 1,2% sữa có thể giữ được lâu, nhưng nếu không được bảo quản cẩn thận thì nấm mốc sẽ phát triển nhiều, tạo điều kiện cho vi khuẩn gây thối hoạt động. Nếu sữa vắt trong điều kiện thiếu vệ sinh thì trong 1ml sữa có thể có hàng chục vạn tế bào vi sinh vật. Nếu sữa vắt xong được giữ ở nhiệt độ 0°C thì sau 1-2 ngày lượng vi sinh vật không những không tăng mà còn giảm đi rất nhiều nhờ tác dụng của những chất diệt

khuẩn có sẵn trong sữa tươi. Nếu sữa được giữ ở 30°C thì sau 24 giờ lượng vi sinh vật có thể tăng tới 400 lần.

Có nhiều phương pháp bảo quản sữa, nhưng nói chung có thể chia làm 3 loại: phương pháp vật lý, phương pháp hóa học, phương pháp sinh vật học.

** Phương pháp vật lý*

- Tác dụng của nhiệt độ

Trong thực tế người ta có thể làm ngừng sự phát triển của vi khuẩn bằng cách làm lạnh hoặc đun nóng. Nhưng hơi lạnh dù có thấp mấy đi nữa cũng không diệt được vi sinh vật. Còn tác dụng của sức nóng thì thay đổi theo điều kiện nuôi cấy vi sinh vật. Ví dụ: ở môi trường khô, nhiệt độ tiêu diệt vi sinh vật phải cao hơn ở môi trường ẩm ướt, phải đun nóng tới một nhiệt độ cao hơn nếu độ pH của môi trường là trung tính (so với lúc đun diệt khuẩn ở môi trường axit).

Vi khuẩn sẽ bị tiêu diệt nhanh chóng nếu đun ở nhiệt độ cao hơn nhiệt độ tối đa mà nó có thể chịu đựng được.

- Tác động của sự sấy khô

Sự ẩm ướt là một yếu tố thuận lợi cho sự phát triển của vi sinh vật, ngược lại sự sấy khô làm cho mọi hoạt động sống của vi sinh vật bị đình trệ cho đến khi chấm dứt hoàn toàn. Như vậy kết hợp với sự làm lạnh, sự sấy khô cho phép bảo quản thức ăn lâu dài.

- Tác động của quang tuyến và siêu âm

Tia tử ngoại cũng như siêu âm có tác dụng diệt

khuẩn. Siêu âm ở tần số cao có tác động chậm và không hoàn toàn, tia tử ngoại trái lại tác động có hiệu quả hơn và nhanh hơn, nhất là khi nó được kết hợp với quang tuyến nóng hồng ngoại (nhưng sữa mất vị thơm ngon, các loại vitamin A và C cũng bị phá hủy).

** Phương pháp hóa học*

Một số chất khi cho vào môi trường có tác dụng ức chế sự phát triển của vi sinh vật hoặc tiêu diệt chúng, nhưng có những chất chỉ có tác dụng ấy khi ở liều cao (như đường, muối, cồn, một số axit,...).

Ngoài ra, có những chất có thể tác động mạnh ngay cả ở liều thấp (như peroxit hidro (H_2O_2), axit boric, focmon, axit salixilic, axit fluohidric, v.v...).

Người ta còn có thể gộp vào phương pháp hóa học những phương pháp dùng oxy hơi để tác động kiềm chế sự phát triển của vi khuẩn yếm khí. Trên thực tế phương pháp hóa học duy nhất được áp dụng trong công nghiệp là phương pháp bảo quản sữa bằng oxy hơi.

** Phương pháp sinh vật học*

Phương pháp làm phát triển trong sản phẩm cần bảo quản một số vi sinh vật nhằm ngăn chặn sự tác động của một số vi sinh vật khác có khả năng phá huỷ những thành phần cấu tạo của sản phẩm. Ví dụ: người ta thường dùng sự lên men lactic để ngăn trở sự phát triển của những vi khuẩn dung giải protein. Phương pháp sinh học thường được áp dụng trong việc chế biến sữa là phương pháp làm sữa lên men, làm sữa chua (như Ya-ua).

*

* *

Trong tất cả các phương pháp bảo quản sữa nói trên, các phương pháp vật lý thường được dùng nhiều nhất, còn các phương pháp sinh vật học thì ít khi được dùng vì nó có thể làm thay đổi mùi vị của sữa. Những phương pháp vật lý thường được áp dụng:

- + Làm lạnh: sữa ướp lạnh, sữa đông lạnh.
- + Đun nóng: sữa Paster hóa, sữa hấp khử khuẩn.
- + Đun nóng và sấy khô không hoàn toàn: sữa đặc tinh khiết (đã khử khuẩn).
- + Đun nóng, sấy khô không hoàn toàn có cho thêm đường: sữa đặc có đường.
- + Đun nóng và sấy khô hoàn toàn: sữa bột.

II- VI SINH VẬT TRONG THỊT VÀ CÁCH BẢO QUẢN

1. Vi sinh vật trong thịt

Thịt trong các lớp sâu của động vật khỏe thường không chứa vi khuẩn, mà sự nhiễm khuẩn và hư hỏng của thịt chỉ bắt nguồn từ những nguyên nhân bên ngoài.

Việc sử dụng gia súc quá độ và điều kiện làm mệt mỏi gia súc (chuyển vận xa, chuồng ở chật chội, nắng gay gắt), hoặc con vật bị đói lâu ngày đều làm giảm sức đề kháng của con vật và tạo điều kiện cho vi khuẩn phát triển trong cơ thể gia súc. Thí dụ: khi con vật mệt nhọc quá độ, làm việc quá sức thì trong bắp thịt và các

cơ quan ta thấy xuất hiện trực khuẩn đường ruột. Vì thế cho nên sau mỗi đợt chuyên chở hoặc sử dụng lâu dài, cần cho con vật nghỉ vài ba ngày trước khi giết thịt.

Da súc vật luôn luôn chứa một số lượng rất lớn vi khuẩn nấm men, nấm mốc. Trên da ngựa có đến 170 loại vi khuẩn, phần nhiều là các vi khuẩn gây bệnh như: *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Tetragene*, *Sarcina*... *E. Coli*, *Bacterium pyocyaneum*, *Bacillus subtilis*.

Còn ở trong lông cũng có nhiều loại vi khuẩn khác nhau: *Sarcina*, cầu khuẩn, vi khuẩn đường ruột, vi khuẩn làm thối có nha bào và không có nha bào.

Khi ta cắt da lột da thì vi khuẩn trên da và lông sẽ xâm nhập vào bề mặt của lát cắt và xâm nhập vào thịt.

Dụng cụ để xử lý thịt, tay chân quần áo đồ dùng của công nhân mổ thịt cũng chứa nhiều vi khuẩn có thể xâm nhập vào thịt.

Nếu rửa thịt bằng nước không sạch hoặc thùng đựng thịt không rửa sạch cũng là nguyên nhân làm cho thịt bị nhiễm khuẩn (vì thế rửa sạch con vật trước khi mổ tốt hơn là rửa sau khi mổ).

Thịt sẽ bị nhiễm khuẩn nhiều nếu trong khi mổ ruột bị thủng, phân nhiễm vào thịt (1g phân chứa hàng trăm triệu vi khuẩn).

Ngoài ra, quá trình chuyên chở thịt đến nơi tiêu thụ hoặc bảo quản thịt cũng làm nhiễm khuẩn vào thịt.

Trên bề mặt của thịt, hệ vi sinh vật bao gồm các vi khuẩn và bào tử của nấm. Thành phần các loại vi sinh

vật này thay đổi tùy theo điều kiện giết thịt. Hệ vi sinh vật này gồm có Staphylococcus, Streptococcus, Diplococcus, Bacterium, Pyocyanum, vi khuẩn đường ruột, vi khuẩn gây thối rữa, Proteus vulgaris, vi khuẩn hoại sinh có bào tử, vi khuẩn đất. Ngoài ra, bề mặt của thịt có thể nhiễm vi khuẩn gây bệnh truyền nhiễm như trực khuẩn phó thương hàn, nhiệt thán.

Bề mặt của thịt, những tảng thịt luôn luôn bị nhiễm khuẩn từ ngoài vào theo những con đường như trên đã nói. Trong điều kiện bình thường vi sinh vật sẽ phát triển, sinh sôi nảy nở trên bề mặt của thịt rồi dần dần tiến sâu vào các lớp bên trong của thịt, làm hư hỏng thịt. Tốc độ lan rộng thấm sâu của vi khuẩn vào thịt phụ thuộc vào nhiệt độ, độ ẩm của thịt, loài vi khuẩn. Thí dụ: trong một miếng thịt bề mặt bị nhiễm khuẩn, nếu để ở nhiệt độ thường của phòng ở thì vi khuẩn sẽ lan sâu vào 3cm sau 24 giờ, nếu để ở nhiệt độ 37°C thì vi khuẩn thấm sâu vào toàn bộ miếng thịt.

Tuy nhiên, tốc độ thấm sâu của vi sinh vật vào thịt khá chậm (trong thịt được ướp lạnh từ 2° đến 4°, vi khuẩn thấm sâu vào thịt, được 1cm sau 30 ngày). Vì thế muốn bảo quản thịt tốt nên giữ thịt ở nhiệt độ 0°C và độ ẩm 80%, ngay sau khi giết thịt.

2. Các dạng hỏng của thịt do vi sinh vật gây ra

*** Sự thối rữa của thịt**

Quá trình thối rữa của bắp thịt được bắt đầu từ bề mặt của nó rồi dần dần lan sâu vào bên trong. Sự thối

rữa của thịt gây ra do một số vi khuẩn hiếu khí và yếm khí không có bào tử hoặc có bào tử; Các vi khuẩn hiếu khí gồm có: *Proteus vulgaris*, *Bacterium (Pseudomonas) fluorescens*, *Bacterium faecalis*, *alcaligenes*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus mesentericus*. Vi khuẩn yếm khí gồm có: *Bacillus sporogeness*, *Bacillus putrificus*, *Bacillus metrifaciens*, *Bacillus postumus*, *Bacillus per fringens*.

Thành phần hệ vi sinh vật thay đổi dần trong quá trình thối rửa. Bắt đầu có cầu khuẩn hiếu khí, rồi đến trực khuẩn. Quá trình thối rửa càng sâu thì các loại vi khuẩn yếm khí tham gia càng nhiều. Các mô thịt dần dần trở nên xám hoặc xám xanh, mềm nhũn, mất tính chất đàn hồi, trở nên vữa nát ra. Độ pH của thịt cũng thay đổi, pH từ axit yếu chuyển sang kiềm do sự hình thành NH_3 và bazơ hữu cơ. Các chất khí có mùi thối khó chịu cũng sản sinh ra protit và lipit bị phân giải. Trong quá trình phân giải protit một số chất được tạo ra (ngoài NH_3 , H) như axit cacbonic, sunfohidric, foemic, axetic, valerianic, lactic, xianic, succinic, axit amin, indon, scatone fenon và một số độc tố.

Hiện tượng thịt thối xảy ra ở nhiệt độ từ 5°C trở lên. Khi bảo quản thịt ở nhiệt độ dưới 5°C , chỉ có một số vi khuẩn ưa lạnh hoạt động thôi.

** Thịt hóa nhầy trên bề mặt*

Dạng hư hỏng này xảy ra khi bảo quản thịt lạnh ở độ ẩm trên 90% (gây ra do loại trực khuẩn chịu lạnh hiếu khí không nha bào: *Pseudomonas*, *Archromo*, *bracter*)

những vi khuẩn làm nhầy thịt có thể sinh trưởng ở nhiệt độ thấp 2-10°C trong tủ lạnh. Do đó nên bảo quản thịt ở nhiệt độ 0°-2°C và ở độ ẩm của không khí 85-90%.

** Thịt lên men chua*

Thịt của gia súc chộc tiết không kỹ, còn máu sau khi giết thịt, hoặc để lâu không làm lạnh, thường lên men chua. Quá trình này gây ra do trực khuẩn yếm khí *Bacillus putrefaciens*, hoặc nấm men. Nó tạo ra nhiều axit làm cho thịt có mùi chua, mất màu đỏ, trở nên trắng xám và mềm nhũn.

** Sự hình thành màu sắc do vi khuẩn sinh sắc tố*

Trên bề mặt của thịt, vi khuẩn hiếu khí sinh sắc tố phát triển và tạo thành những vết mầu trên thịt. Các loại vi khuẩn sinh sắc tố gồm có: *Sarcina flava*, *Sarcina lutea*, tạo thành vết vàng. *Bacterium prodigiosum* tạo vết đỏ, *Bacterium syncyaneum*, *Bact pyocyaneum* tạo vết xanh. Những vết mầu tạo ra trên bề mặt có thể tẩy sạch dễ dàng.

** Thịt bị mốc*

Các loại nấm mốc phát triển trên bề mặt của thịt làm cho thịt mốc. Quá trình mốc xuất hiện trên mặt thịt bằng những vết và chấm mạng tơ, màng mầu trắng; dần dần các vết mốc lan dần ra, mầu trở nên sẫm. Các loại mốc trên thịt gồm có: họ nấm mốc *Mucoraceae*, *Mucor*, *Rhizopus* tạo vết trắng xám, *Cladosporium herburum* tạo vết đen, nấm *Penicillium* tạo vết xanh.

Nấm mốc phát triển trên mặt thịt làm cho thịt biến đổi chất lượng nhanh chóng, chuẩn bị cho vi khuẩn thối hoạt động. Để tránh hiện tượng mốc, ta cần rửa sạch thịt lúc mổ, và bảo quản trong lạnh, không tăng độ ẩm.

3. Bảo quản thịt

Bảo quản thịt nhằm mục đích giữ thịt được lâu dài bằng cách khống chế tác dụng gây hư hỏng của vi khuẩn, kiềm chế hoặc giết vi khuẩn, làm cho vi khuẩn không sinh sản và phát triển được.

Sau đây là những phương pháp bảo quản thịt thường được sử dụng.

** Bảo quản thịt bằng nhiệt độ thấp*

Phương pháp bảo quản này được dùng phổ biến hơn các phương pháp khác. Trong đó người ta thường dùng cách ướp lạnh nhiều hơn cách ướp đông.

a) Phương pháp làm lạnh, ướp lạnh (Chilling)

Nhiệt độ thấp có tác dụng kìm hãm các quá trình vi sinh vật và làm cho thịt ít bị thay đổi về phẩm chất. Dưới tác dụng của nhiệt độ thấp, một phần vi khuẩn chết dần riêng những vi khuẩn hình thành nha bào có thể sống lâu hơn. Thịt ướp lạnh được treo trên móc sắt mạ thiếc, treo cách tường ít nhất 0,3m cách ống hơi lạnh ít nhất 0,4m. Độ ẩm không khí trong kho ướp lạnh được giữ ở 81-92% để tránh thịt co lại vì khô, gây thiệt hại về trọng lượng.

Những vi sinh vật gây hư hỏng thịt ướp lạnh là những vi khuẩn ưa lạnh, chủ yếu thuộc các giống

Pseudomonas, *Achromobacter*, *Micrococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Flavobacterium* và *Proleus*. Nấm men và nấm mốc có thể sinh trưởng trong thịt ở nhiệt độ thấp.

b) *Phương pháp làm đông lạnh (ướp đông, đông giá, đóng băng, Freezing)*

Phương pháp này nhằm giữ thịt trong một thời gian dài hơn phương pháp làm lạnh. Sử dụng phương pháp này trong trường hợp vận chuyển thịt trên tàu biển đi xa hoặc cần bảo quản một lượng rất lớn thịt chưa sử dụng đến. Những khối thịt to lớn trong bao bì được làm đông lạnh nhanh và bảo quản ở nhiệt độ từ 10°F đến -20°F.

Bảo quản dài hạn thịt trong kho lạnh

Tên thực phẩm	Nhiệt độ từ °C	Bảo quản đến °C	Độ ẩm không khí (%)	Thời gian bảo quản
Làm lạnh				
- Thịt bò, lợn, cừu	+1°	- 1°	80-85	10-20 ngày
- Gà, vịt, ngan, ngỗng	+1°	0°	85	7 ngày
Ướp lạnh:				
Thịt bò	- 9°	- 18°	95-100	8-12 tháng
Thịt lợn	-9°	-18°	-	5-10 tháng
Thịt cá mảnh (1/2 con)	-12°	-18°	-	4-8 tháng
Tím, gan	-12°	-18°	-	4-6 tháng
Thịt, cá hộp	+15°	0°	70-75	9-12 tháng
Thịt hộp có rau	+10°	0°	-	9-12 tháng
Gà, vịt, ngan, ngỗng	-9°	-12°	85-90	5-8 tháng

Quá trình đông lạnh có thể tiêu diệt được một nửa số lượng vi khuẩn, số còn lại giảm chậm trong quá trình cất giữ. Sau khi làm tan giá, những vi khuẩn còn sống bắt đầu sinh sản mạnh hơn.

Ở miền Bắc nước ta, việc ướp đông thực phẩm đã được tiến hành với những sản phẩm chăn nuôi (như lợn sữa, thỏ, vịt...) và hải sản (như cá mực, tôm, cá xuất khẩu...).

Hiện nay phương pháp bảo quản thú sản bằng ướp đông thường được dùng ở các nước trên thế giới, trong mậu dịch quốc tế, vì giá trị dinh dưỡng và sử dụng của thực phẩm được xử lý bằng phương pháp này vẫn còn cao hơn so với các phương pháp bảo quản khác (như phương pháp hấp ướt cao áp dùng để thanh trùng đồ hộp). Hàng ướp đông có ưu điểm là có thể bảo quản lâu, bao bì ít tốn kém, giữ được enzym, vitamin tươi, bảo đảm phẩm chất, có thể dùng để chế biến theo khẩu vị của từng người.

Sau đây là một số phương pháp ướp đông các sản phẩm chăn nuôi:

- Vịt ướp đông

Chọn vịt khỏe, béo tốt (trên 1,5kg) đem vỗ béo trong một tuần lễ đến 15 ngày, và kiểm tra xác định không mắc bệnh truyền nhiễm (chủ yếu là bệnh Salmonellosis, dịch tả vịt, pasteurellosis). Để vịt nhịn đói trong 18 giờ, và nhịn uống nước trong 3 giờ trước khi cất tiết. Treo dốc ngược vịt đã buộc hai chân vào một cái đinh đóng ở trên, đinh dưới xuyên qua 2 lỗ mũi, rồi dùng dao

nhọn nhỏ xuyên qua mặt lưỡi, cắt tĩnh mạch cổ cho đứt, hứng máu vào máng. Để vài phút, cho vịt vào chảo nước nóng 80°C để ngấm vào lông xơ (dùng gậy khoáng) hoặc dùng máy làm lông, để vật lông lớn, lông vũ, lông đen, ở da cánh, bẹn (vạch tay).

Để vật lông tơ, lông nhỏ, nhúng nhanh vịt vào một cái chảo đựng colofan (nhựa thông) và mỡ lợn đun sôi theo tỷ lệ 10kg colofan và 3kg mỡ lợn. Sau đó, lấy vịt ra cho vào chảo nước, để khô cứng, bóc màng lông tơ ra, đem đun lại để làm tách lông tơ với màng đen colofan mỡ lợn (vớt lông tơ ra, còn màng đen thì đem dùng lại).

Nhổ lông xong, rửa sạch vịt bằng nước lã.

Dùng dao con cắt một lát nhỏ ở điều để lấy điều ra và một lát ở mông, phía hậu môn để lôi lòng và mề ra. Để gan phổi lại.

Để 2-3 giờ ở nhiệt độ $25-30^{\circ}\text{C}$ độ ẩm 80% để toan hóa cho thịt thành thực.

Dùng giấy bản bao đầu lại rồi kéo cổ gấp vào trong mình. Cắt bỏ 2 chân từ khuỷu. Cho vịt vào túi nilông buộc chặt lại, rồi cho vào một túi nilông thứ hai, hoặc đóng vào hòm gỗ.

Tiến hành ướp đông theo hai giai đoạn: - 1) giai đoạn làm lạnh, để nguội: đưa túi nilông hoặc hòm gỗ đựng vịt vào phòng lạnh 0°C , để độ 2 ngày để thân vịt có nhiệt độ 4°C ; 2) giai đoạn làm đông băng ở trong phòng lạnh -18°C hoặc -23°C : để thân vịt có nhiệt độ -6°C là được, trong thời gian 1 ngày.

Khi cần đưa vịt lên tàu, xuất khẩu thì cho vào xe lạnh dưới 0°C , xuống tàu thì để vào phòng lạnh 0°C hoặc ở độ âm từ -10°C đến -30°C .

Khi đem bán trên thị trường thì để trong tủ lạnh.

Khi sử dụng làm thức ăn thì phải giải đông bằng cách nâng nhiệt độ lên đến 0°C trong độ 3-4 giờ, rồi nâng từ 0°C đến 15°C mới đưa ra thị trường bán.

- Thỏ ướp đông

Chọn thỏ khỏe trên 3kg, không mắc bệnh, nhất là bệnh cầu ký sinh trùng (coccidiosis) chọc tiết ở cổ. Chặt bỏ đầu từ một phần ba trên của cổ. Lột da, lấy phủ tạng, kể cả gan phổi ra hết. Tập trung các phủ tạng (gan, thận, lách...) rửa nước sạch rồi cho vào một túi nilông.

Để thịt thỏ toan hóa trong khoảng 3 giờ ở nhiệt độ thường, rồi lấy vải thô thấm khô máu cho vào túi nilông, rồi đem ướp đông như trường hợp vịt ướp đông.

- Lợn sữa ướp đông

Chọn lợn con 3 tháng tuổi độ 10kg, khỏe mạnh. Dùng dao, rạch cổ phía gần đầu, đưa dao chéo xuống phía bả vai cắt tĩnh mạch cổ để chọc tiết. Hứng máu. Ngâm lợn vào nước $65-70^{\circ}\text{C}$ trong 1-2 phút rồi cạo sạch lông.

Dùng dao mổ rạch bụng và ngực lấy phủ tạng ra hết. Rửa sạch phủ tạng tim, gan, phổi, thận, lách rồi cho vào túi nilông.

Rửa sạch lợn, dùng vải thấm sạch nước và máu. Để toan hóa trong 3 giờ.

Dùng vải gạc buộc bốn chân quắp vào mình, hai chân trước kéo gập úp vào ngực, hai chân sau kéo về trước, gập vào bụng.

Cho lợn vào túi nilông, rồi đem ướp lạnh như trên, làm đông bằng để có nhiệt độ ở thân là -6°C (lâu hơn gia cầm độ 3 ngày). Lợn choai 20kg, 30kg cũng làm như lợn sữa.

Đối với lợn lớn trên 100kg thì chặt đôi theo dọc dài của con lợn để đỡ công kénh. Đặt trong túi nilông.

- Trâu bò ướp đông

Xẻ tư bằng cách chém dọc thành hai mảnh rồi cắt đôi mỗi mảnh theo đùi. Chân trước cắt bỏ từ khuỷu, người ta thường lấy bốn đùi.

- Dê, cừu ướp đông

Lột da như thỏ rồi tiến hành ướp đông như lợn choai.

** Muối thịt*

Phương pháp này ít làm mất mùi vị và phẩm chất của thịt.

Người ta dùng cách muối thịt để sản xuất: mỡ muối, xúc xích, Lạp xưởng, jambông. Muối thịt là một quá trình phức tạp làm gây ra trong thịt những thay đổi về lý, hóa hoặc men và vi khuẩn. Trong thời gian muối, từ thịt sẽ chảy ra một loại dịch có các chất đậm hòa tan và chất khoáng hòa tan trong muối.

Nước muối thấm sâu vào thịt và làm tăng áp suất thẩm thấu lên, do đó sự hoạt động của vi khuẩn bị kìm hãm lại.

Một phần vi khuẩn trong thịt bị muối giết đi, phần còn lại có thể sống được. Do lượng muối bị giảm dần đi trong quá trình muối, số lượng chất dinh dưỡng (như protit, chất khoáng) sẽ tăng dần với thời gian, đồng thời vi khuẩn lại bắt đầu sinh sản và có thể đạt tới mức hàng triệu con trong 1ml.

Nấm mốc ít cảm nhiễm đối với nồng độ muối cao, cho nên thịt ướp muối có thể bị mốc nếu không được bảo đảm sạch sẽ.

Ngoài ra một số vi khuẩn gây bệnh có thể chịu đựng được nồng độ muối cao nên sống được trong một thời gian dài: Vi khuẩn phó thương hàn có thể sống được trong nước muối 19%; vi khuẩn Brucella có thể sống 60 ngày, virus lở mồm long móng sống 45 ngày trong thịt muối.

Khi muối thịt người ta thường cho thêm nitrat natri để giữ màu cho thịt. Đường Sacaro làm cho thịt mềm, tươi và dưới tác dụng của vi khuẩn lên men nó trở thành chua nhờ đó kiềm chế sự phát triển của vi khuẩn làm thối.

**** Cách chế biến các sản phẩm thịt***

a) Chế biến lạp xường

Người ta thường dùng thịt mỡ lợn có phẩm chất tốt (nhất là thịt nạc ở mông hay vai, thịt thăn tốt nhất) đem lọc sạch bạc nhạc, và xay trong máy xay để có miếng thịt có đường kính 0,5cm. Nên lấy mỡ ở dưới da hoặc ở gáy lợn, đem thái thành hình khối vuông cạnh

0,5cm, rửa nước nóng 50°C để tránh mùi khét của mỡ ôi, rồi để khô trên rổ.

Để sản xuất 1kg Lạp Xường, người ta cho vào một cái chậu men 700g thịt nạc xay, 300g mỡ đã thái quân cờ, 10ml rượu mai quế lộ, 10ml cồn 70°, 80g đường kính, 25g muối, 20ml sáng sáu, 1,2g diêm tiêu (KNO_3 hoặc NaNO_3) hòa trong 300ml nước sạch. Quấy đều. Để 15-20 phút nhồi vào ruột khô bằng một cái phễu đặt vào 1 đầu ruột, cứ 20cm lại buộc 1 nút, cuối cùng buộc từng đôi Lạp Xường một, đem xăm chéo (góc độ 60°) với bàn xăm có kim nhỏ để nước có thể thoát ra khi sấy. Mắc lên sào đem sấy trong lò sấy trong 4 ngày, cách lò than 70cm, 90cm, 110cm và 130cm, nhiệt độ cao 70cm là 50°C.

Cần chuẩn bị ruột khô bằng cách lấy ruột non của lợn rửa sạch, bóp muối, rồi lại rửa sạch ba lần. Bóc phần tương mạc di, chỉ lấy phần niêm mạc có tính chất đàn hồi tốt. Bơm không khí vào, cho ruột lăn trên nồi nước nóng 40°C để cho nở to ra. Buộc từng đoạn lại rồi đem phơi. Cuối cùng đem sấy và cho hơi ra, gấp lại rồi đóng gói.

b) Sản xuất xúc xích, nhồi thịt và Lạp Xường trong công nghiệp.

Người ta thường dùng thịt bò, thịt bê, thịt cừu và các loại thịt khác để sản xuất xúc xích, nhồi thịt.

Trong công nghiệp người ta sản xuất xúc xích, nhồi thịt và Lạp Xường theo quá trình sau đây: chế biến nguyên liệu, ướp muối, chuẩn bị thịt băm và chế biến nhồi thịt, xúc xích. Trong giai đoạn chế biến nguyên

liệu người ta pha thịt, lấy xương, lọc gân, bạc nhạc, hạch lâm ba, lọc thịt, mỡ và mô liên kết ra khỏi xương. Cắt thịt thành từng miếng 400-500g nghiền nhỏ thịt trong máy xay.

Trong giai đoạn ướp muối và đường người ta trộn vào 100kg thịt 3kg muối, 100g diêm tiêu từ 2-3°C 100g đường, và để ướp muối trong 2-3 ngày ở nhiệt độ, để thịt có độ dính và độ đàn hồi cần thiết. Thịt được nghiền nhỏ hai lần, ướp muối trong máy nghiền, sau đó chế biến trong máy cắt để làm cho độ nhớt của thịt tăng lên và để trộn mỡ và thịt đều nhau hơn, người ta trộn thêm nước đá (10-40% lượng của thịt) để làm lạnh và làm tăng độ ẩm của thịt sau đó cho thịt băm vào máy trộn để trộn đều và để thịt có độ dính cần thiết.

Cuối cùng cho thịt băm vào máy nhồi để nhồi thịt băm vào vỏ.

Thịt băm được nhồi vào bao vỏ với độ chặt nhất định (xúc xích nấu được nhồi vào vỏ không chặt). Sau khi nén thịt băm vào bao vỏ, người ta dùng bàn xăm để xăm vỏ và làm xít thịt băm lại để tránh bong không khí. Treo lạp xưởng, xúc xích lên thành hàng.

Trong giai đoạn chế biến xúc xích, nhồi thịt, người ta làm lạnh, quay, nướng nấu, hun khói và sấy. Nhồi thịt được làm lạnh ở nhiệt độ từ 0°C đến 2°C với độ ẩm tương đối của không khí là 80-85% để làm khô bao vỏ và làm chặt thịt băm.

Xúc xích được quay và nửa hun trong lò quay ở nhiệt độ từ 60°C đến 90°C và 110°C trong một đến

một giờ rưỡi. Để làm đông tụ protit của vỏ và thanh khuẩn vỏ, cố định màu của thịt, người ta nấu xúc xích bằng hơi nước hoặc bằng nước, ở nhiệt độ 90°C lúc đầu, nhiệt độ này được giảm dần xuống 75°C, 80°C, trong 10 phút (xúc xích) đến 2 giờ (nhồi thịt to), cho đến khi nhồi thịt có nhiệt độ 68°C, 69°C. Ở nhiệt độ này vi sinh vật gây bệnh sẽ bị tiêu diệt, hoạt động của men giảm đi, protit bị đông tụ và collagen chuyển thành gluten. Sau khi nấu, xúc xích được làm nguội thật nhanh đến nhiệt độ 30°C, dưới vòi nước trong 10 đến 30 phút, rồi được giữ lạnh trong phòng lạnh 5°C trong 2 giờ.

Người ta hun khói lập xương theo 2 phương pháp hun nguội ở nhiệt độ từ 18°C đến 22°C trong 5 ngày đêm và hun nóng ở nhiệt độ từ 31°C đến 43°C trong 2 ngày đêm dùng cho lập xương có nhiều thịt lợn. Sau đó lập xương được sấy khô ở nhiệt độ 12°C và độ ẩm tương đối là 75%, trong 2 đến 5 ngày đêm đối với lập xương nửa hun và 25 đến 40 ngày đối với lập xương nguyên liệu hun.

c) Cách ướp thịt bằng muối và diêm tiêu

Người ta giữ thịt sống bằng diêm tiêu (kali nitrat salpetre) và muối rang theo tỷ lệ 3-5g diêm tiêu và 30g muối rang (muối ăn) cho 1kg. Thịt thái miếng mỏng độ một cm, rộng bằng bàn tay, dài 30-40cm. Rắc diêm tiêu và muối đã trộn đều. Bóp thật mạnh cho diêm tiêu ngấm vào thịt. Để thịt ráo hết nước mới cho vào thùng dầy kín để ở chỗ mát và thoáng. Trước khi ăn rửa sạch

diêm tiêu và muối. Ngoài cách trên người ta còn ướp thịt bằng bột hỗn hợp diêm tiêu, muối và đường theo tỷ lệ mỗi kilôgam thịt cho một thìa cà phê bột hỗn hợp trong đó có 750g diêm tiêu 200g muối rang và 50g đường tán nhỏ trộn đều. Thịt cũng thái miếng, rắc bột và bóp như trên. Muốn cho thịt khô hết nước thì ép nhẹ rồi xếp vào thùng sành hay thùng gỗ, lớp thịt trên cũng phủ kín bằng bột ướp. Thùng đậy kín để vào chỗ thoáng và mát. Khi ăn phải rửa sạch diêm tiêu.

Có thể ngâm thịt vào dung dịch diêm tiêu, đường và muối chế như sau:

Diêm tiêu...	250g
Đường...	1.000g
Muối...	2.250g
Nước chín...	7.500g

Thịt ngâm trong dung dịch này không những giữ được nguyên màu tươi đỏ như hai cách trên mà còn làm cho thịt ngon, có hương vị hơn nhiều.

d) Cách rang mặn thịt

Thịt có thể cất giữ trong một thời gian ngắn bằng cách rang mặn. Thịt thái từng miếng vừa phải cho vào chảo hoặc sành, không cho nước, đun nhỏ lửa; nước thịt chảy ra đủ làm chín thịt. Đến khi thịt chín kỹ thì rắc muối giã nhỏ (thành bột nhỏ) vào, đảo cho kỹ đến khi khô hết nước, miếng thịt rắn chắc mới thôi. Cần rang mặn, khi rang xong miếng thịt có một màng muối mỏng bao quanh. Đựng vào lọ, hộp không gỉ, khô, sạch, đậy

kín nắp, có thể giữ được nửa tháng về mùa hè, và một tháng về mùa đông.

*** Sấy khô và phơi khô thịt**

Sấy khô làm giảm độ ẩm của thịt. Trước khi sấy thịt được muối sơ bộ, sau đó đem phơi khô, không che đậy hoặc sấy trong các buồng thoáng gió, thịt sẽ mất đi khoảng 30-35% độ ẩm, do đó có thể giữ được lâu dài hơn.

Thịt phơi khô mất nhiều nước, do đó sự phát triển của vi sinh vật bị đình trệ, một số vi khuẩn chết đi, một số chuyển vào trạng thái không hoạt động, đa số bào tử nha bào tồn tại. Nếu độ ướt của thịt tăng lên thì sự phát triển của vi sinh vật lại làm hư hỏng thịt.

Nếu bảo quản lâu dài, thịt sấy khô có mỡ sẽ bốc mùi khó chịu do mỡ bị phân giải dưới ảnh hưởng của ôxy.

Hiện nay người ta dùng thịt không đủ tiêu chuẩn làm thức ăn cho người để chế biến thành bột thịt nuôi gia súc (thịt súc vật chết vì bệnh truyền nhiễm trừ một số bệnh như ty thương, dại, nhiệt thán...). Loại thịt này được khử khuẩn rồi đem sấy khô cho đến khi độ ẩm chỉ còn độ 7-10%, loại bột này giữ lâu không bị hỏng.

*** Xông khói thịt**

Thịt xông khói sẽ đặc lại, bề mặt khô đi, sức đề kháng chống vi khuẩn tăng lên, một phần nước mất đi trong thịt có thêm những chất sát khuẩn (như fomicrin, axit fenic, erezon, axeton, rượu gỗ, nhựa thông axit axetic).

Khói thấm vào trong lớp sâu của thịt rất chậm, cho

nên tác dụng của sự xông khói vào những lớp sâu của thịt rất yếu. Trong thịt chứa nhiều nước và ít muối, vi khuẩn trong thịt xông khói chết chậm hơn, có vi khuẩn còn sống sót lại.

Sự xông khói không có ảnh hưởng đến vi khuẩn gây bệnh. Ví dụ các loại vi khuẩn lợn đóng dấu có thể sống 30 ngày trong thịt muối và 14 ngày trong thịt xông khói, trực khuẩn lao vẫn sống trong thịt xông khói. Vì thế ta chỉ nên xông khói thịt lợn khỏe.

Ở miền Bắc nước ta có nơi đã sấy thịt bằng cách hun khói. Thịt thái dày độ 1cm, bản to rồi đưa lên trên dàn đốt củi lấy khói hun ở dưới. Cách này làm cho thịt khô đi một phần và để chất erezot của khói ngấm quanh miếng thịt giữ cho thịt khỏi thối. Nếu trước khi sấy đem ngâm thịt vào nước muối trong một ngày rồi sấy khô bằng cách hun khói thì có thể cất giữ thịt được vài ba tháng.

** Bảo quản thịt bằng nhiệt độ cao - Làm thịt hộp*

Thịt được khử khuẩn trong nồi hơi 115-120°C. Thời gian khử khuẩn và nhiệt độ khử khuẩn thay đổi tùy theo sản phẩm chế biến.

Thịt hộp sau khi khử khuẩn xong phải đem kiểm tra lại, cho vào tủ ấm 37°C trong 10 ngày. Nếu trong hộp thịt còn nha bào thì nha bào này bắt đầu nảy mầm, trở thành vi khuẩn, vi khuẩn sẽ phân giải protit tạo ra khí, áp suất trong hộp tăng lên, nắp hộp bị phồng lên, đó là hiện tượng phồng hộp. Những hộp có nắp phồng cần huỷ bỏ đi.

Sau khi khử khuẩn không phải tất cả các loại vi khuẩn đều chết. Các loại vi khuẩn như *Clostridium botulinum*, *Baccillus subtilis*, *Clostridium sporogenes*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Micrococcus* còn sống trong hộp thịt trong một thời gian rất lâu, nhưng không sinh sản, vì nhiệt độ đã làm yếu hoạt tính của chúng.

Trong công nghiệp người ta thường sản xuất thịt hộp bằng thịt bò, thịt lợn, thịt gia cầm (thịt ướp muối, thịt có rau v.v...) theo các giai đoạn sau đây: chuẩn bị nguyên liệu, đóng hộp ghép mí sơ bộ, ghép kín và kiểm tra độ kín của hộp sắt tây, thanh khuẩn.

Trong giai đoạn chuẩn bị nguyên liệu người ta thái, pha, lọc chân thịt, và ướp muối, ngâm thịt. Người ta không lấy mỡ đi, mà chỉ bóc lớp bề mặt của mỡ. Những miếng thịt lớn (500g) được chân trong nước nóng cho chín, ướp muối ngâm xong thịt được cắt thành miếng và xếp vào hộp; rót nước chân hoặc nước chấm đã đun nóng 80°C đến 90°C vào rồi ghép mí sơ bộ. Cuối cùng ghép kín hộp trong máy ghép chân không (công suất độ 12 nghìn hộp trong một giờ). Kiểm tra độ kín của hộp bằng cách cho hộp vào trong nước nóng 1-2 phút. Thanh khuẩn hộp thịt trong nồi hấp ướt cao áp ở nhiệt độ 112°C đến 121°C.

Hấp xong làm nguội hộp thịt đến nhiệt độ 40°C, rồi giữ trong phòng ấm từ 35°C đến 37°C trong 7 đến 10 ngày.

Sau đó loại bỏ những hộp bị phồng và thiếu trọng lượng. Dán nhãn, đóng thùng và đưa đi bảo quản ở

nhiệt độ từ 1-2°C và độ ẩm tương đối của không khí là 75-80%. Thời gian bảo quản hộp thịt là một năm đến vài năm.

III- VI SINH VẬT CỦA DA VÀ CÁCH BẢO QUẢN

1. Vi sinh vật của da

Da là một sản phẩm phụ của chăn nuôi, nếu biết xử lý và sử dụng tốt (cho nhu cầu trong nước và xuất khẩu) thì sẽ là một nguồn thu nhập tương đối quan trọng cho kinh tế quốc dân.

Da đã lột có 2 mặt là mặt ngoài (hoặc mặt lông) và mặt trong (mặt thịt).

Da cấu tạo chủ yếu bằng hai lớp chồng lên nhau là biểu bì và bì, giữa hai lớp có một màng mỏng gọi là màng trong.

Cấu tạo hóa học của da gồm có nước (70%) và các chất protit, lipid, khoáng.

Da là một môi trường tốt cho sự sinh trưởng của vi sinh vật.

Trên lớp lông của da và trên bề mặt của da có rất nhiều loài vi sinh vật do da bị nhiễm bẩn từ đất, từ không khí từ dụng cụ mổ hoặc tay chân công nhân mổ.

Hệ vi sinh vật này gồm có những vi khuẩn hoại sinh và nhiều loài vi khuẩn (như các giống *Bacillus*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Coccus*, *Mycobacterium*, *Spirochaeta*, *Proteus* v.v...) từ nước, đất, cây cối nhiễm vào da. Một số vi khuẩn bình thường hoại sinh có thể

duy trì tác động của những vi khuẩn nung mủ, những nấm men và nấm mốc hoại sinh hoặc sinh mủ, những nguyên sinh động vật hoại sinh hoặc gây bệnh (Leishmania).

Tuy nhiên, tẩm da ướt dễ bị nhiễm khuẩn, dễ bị hư hỏng nếu không được bảo quản tốt. Gia súc mổ thịt mắc một số bệnh ngoài da cũng làm cho da bị hư hỏng.

2. Những dạng hỏng của da do vi sinh vật

*** Da thối**

Sự thối rữa là một sự biến đổi của chất protit của da bị phân giải thành polypeptit và axit amin rồi hình thành chất khí khó ngửi (như sunfua hidro), khi tác động đến bì thì sự thối rữa làm cho da trở thành vô dụng.

Vi khuẩn phát triển mạnh trong biểu bì làm hình thành một lớp niêm dịch ở biểu bì, rồi tiến sâu vào bì làm cho bì trở nên dính, màu hơi xanh, làm bốc mùi amoniac; lớp mô dưới da bị phân giải sau khi lông rụng trở nên nhợt, nhẵn, màu tối sẫm. Biểu bì rụng từng lớp, lông tiếp tục rụng từng đám, da tan rã từng mảnh.

*** Da có vệt**

Da bị *vết muối* khi có vi khuẩn ưa mặn tác động (chịu đựng được nồng độ muối cao) làm hình thành những vết muối nhỏ như hạt kê, dính với nhau thành vết lớn màu vàng. Những vết muối này ăn sâu vào trong lớp da làm thủng da.

Da có thể bị *vết mốc* do có nấm mốc phát triển làm

hình thành những đám mốe trên da (có màu sắc khác nhau tùy loài nấm mốe).

*** Bệnh của da**

Những bệnh của da gây nhiều thiệt hại là bệnh ghẻ, bệnh Streptothricosis của bò, bệnh ghẻ (Demodex) của dê, bệnh nấm của tất cả các loài vật, và các bệnh truyền nhiễm.

a) *Bệnh nhiễm Demodex* gây ra do một con ghẻ truyền bệnh (bằng sự tiếp xúc trực tiếp hoặc gián tiếp) sống trong nang lông. Những con cái thụ thai thâm nhập sâu vào trong da, đẻ nhiều trứng, sinh ra những ấu trùng lan tràn ra những vùng khác của biểu bì và gây những bệnh tích mới. Sự ẩm ướt và côn trùng đóng một vai trò thuận lợi cho sự lan tràn của bệnh.

Người ta quan sát những chấm ghẻ trên mặt thịt của da, thấy những vệt tròn nhỏ như casein. Bề mặt của da có trạng thái lấm chấm rải rác. Bệnh ghẻ còn do những cái ghẻ khác gây ra (*Sarcoptes*) chúng rất nhỏ, đào sâu trong biểu bì thành những hang rồi đẻ trứng và sinh sống bằng những mảnh thượng bì. Chúng làm cho da nứt ra thành khe, dày ra, có vảy nâu nhạt trên bề mặt.

b) *Bệnh Streptothricosis* gây ra do một vi khuẩn (hay còn gọi là ve) thường thấy ở loài nhai lại (bò, cừu, dê). Ve đóng vai trò trong việc tiêm truyền bệnh. Da bị sây sát, do cây gai nhọn, độ ẩm ướt cao là những yếu tố hỗ trợ cho bệnh.

Bệnh thể hiện bằng sự xuất hiện trên biểu bì một lớp

sừng nứt vỡ và dày ra, và những biến chứng hoại tử, u nhú, mưng mủ, và gây một phản ứng ở bì thể hiện bằng những tấm sori dày đặc lại.

Ve cắn da để lại những dấu vết, những lỗ nhỏ, hoặc những sẹo chất sori làm cho da trở nên nhám, làm mất giá trị của da.

c) *Bệnh đậu* để lại trên da những sẹo nhỏ. Có một sự thoái hóa sori trên tất cả chiều dày của da.

d) *Bệnh truyền nhiễm*

Những sản phẩm động vật như da, lông, móng, sừng nếu bị nhiễm vi khuẩn gây bệnh truyền nhiễm thì có thể làm lây bệnh cho người và gia súc (chủ yếu là công nhân lột và xử lý gia công da, cán bộ thú y kiểm nghiệm da, người bán và mua da).

Da có thể mang vi khuẩn gây các bệnh nhiệt thán, brucellosis, ty thur, lở mồm long móng, leptospirosis, đóng dấu lợn, sốt thổ rùng (tularemia), đậu, v.v...

Vi khuẩn nhiệt thán ở trong da (ở mặt lông cũng như mặt thịt) có thể tồn tại lâu dài dưới dạng nha bào rất nguy hiểm. Việc kiểm tra vi khuẩn nhiệt thán ở da rất quan trọng (bằng phản ứng huyết thanh kết tủa Ascoli và các phương pháp chẩn đoán thí nghiệm khác) để tiêu diệt nguồn bệnh, ngăn ngừa lây lan cho gia súc và người. Những tấm da có vi khuẩn và nha bào nhiệt thán phải hủy bỏ (thieu đốt), những tấm da tiếp xúc với da nhiễm vi khuẩn nhiệt thán phải đem tiêu độc bằng dung dịch muối ăn 5% và axit clohidric (ở 40°C trong

30 giờ) hoặc ngâm trong dung dịch sunfua natri 5% trong 24 giờ, dung dịch axit fomic 10% và clorua thủy ngân 2% trong 48 giờ, sau đó trung hòa trong một dung dịch Clorua natri 10% trong một giờ.

3. Bảo quản da

*** Sấy khô da**

Sấy khô da để nước ra khỏi tổ chức da (vì nước rất thích hợp cho sự sinh trưởng của vi khuẩn) bằng cách hong khô trong không khí. Đó là một phương pháp đơn giản và kinh tế.

Da không qua xử lý muối, được đem phơi để độ ẩm còn khoảng 10-12%, làm cho hoạt động của vi khuẩn tạm bị ngừng. Không nên để da khô quá nhanh (phơi dưới ánh nắng mặt trời hoặc trong một luồng gió mạnh) vì nếu sấy khô quá nhanh thì những lớp bên trên của da có thể khô nhưng những lớp trong vẫn giữ độ ẩm ướt. Từ đó xảy ra sự sấy khô bên ngoài và sự thối rữa sâu vào bên trong. Và lại, dưới tác động của ánh nắng mặt trời, các sợi sinh keo của da sẽ biến thành keo, da trở nên cứng và khó cắt.

Trong mọi trường hợp, nên phơi da trong bóng mát, trong bầu không khí yên tĩnh, (chú ý: dành một khoảng cách để không khí lưu thông trên hai mặt của da).

Da phải được đưa vào nhà sấy hai giờ sau khi mổ thịt. Nên sấy da trên một khung gỗ hình vuông lớn, cạnh có đục lỗ để buộc dây căng da trên khung. Có thể vắt da để phơi trên một sợi dây thép, mặt thịt của da để

ra ngoài, đường trung tuyến của da ăn khớp với sợi dây thép. Có thể phơi da trong nhà sấy xây theo một hướng thuận lợi cho việc sấy da; da được đặt trong chiều gió và không bị nắng sáng hoặc nắng xế chiều chiếu thẳng góc. Sấy từ 24 giờ đến 48 giờ tùy loại da, 24 giờ cho da của gia súc lớn (bò, ngựa, trâu), 12 giờ cho da của gia súc nhỏ (dê, cừu, loài vật ăn thịt, gia cầm...).

*** Muối da**

Muối ăn (clorua natri) khi thấm sâu vào tấm da không làm hại da, trái lại hấp thu ẩm ướt của da và đóng vai trò khử khuẩn. Nếu nồng độ muối cao thì vi khuẩn không hình thành, nha bào trong da không những không phát triển mà còn chết đi; vi khuẩn có nha bào có thể sống nhưng không sinh sản được.

Có thể muối da bằng nhiều phương pháp: muối ướt, nước muối, muối khô, muối tổng hợp, ngâm asen.

+ **Muối ướt.** Căng da cho mặt lông xuống dưới, mặt thịt lên trên để cho nước nhờn trên mặt thịt chảy hết đi, rồi rắc muối ăn lên, xát mạnh. Sau đó đặt tấm thứ hai lên tấm thứ nhất để xát muối, rồi đến tấm thứ 3, thứ 4. Trên thực tế, người ta chồng chất da lên nhau, mặt thịt ở trên, giữa hai tấm da có một lớp muối dày. Độ cao của chồng da là 1,5 mét.

Muối ướt da. Da chồng chất lên nhau trên những phiến gỗ, mặt thịt lên trên).

Trọng lượng muối phải đạt tối đa 50% trọng lượng da, (thường từ 26 đến 50% tùy theo độ ẩm của da).

Khi khử nước, da mất độ 20% trọng lượng. Ở nơi khí quá ẩm, người ta dùng một hỗn hợp muối ăn (80%) và sunfat natri (20%) để muối.

Để một tuần lễ sau đó giữ hết muối ra, gấp da và giữ ở nhiệt độ từ 5 đến 8°C.

+ **Nước muối.** Đặt da thành chồng trong bể ngâm chứa một dung dịch muối (tỷ lệ 25% trọng lượng da lúc đầu) trong mấy giờ. Khi sờ vào da thấy ướt chứng tỏ sự khử nước đã đủ. Phương pháp này cho kết quả rất tốt, nó làm tăng trọng lượng bề ngoài của da.

Ngoài ra có thể ngâm da trong một dung dịch hỗn hợp muối và axit gồm có 10% muối ăn (muối bể hoặc muối mỏ) và 1% axit mạnh (sunfuric hoặc clohidric) so với trọng lượng của da. Axit chống lại sự thối rữa và muối làm ngừng tác động làm phồng da của axit. Da được ngâm nước muối và axit có màu trắng. Phương pháp này hay được dùng trước khi thuộc da.

+ **Muối khô.** Người ta muối da bằng phương pháp muối ướt rồi đem phơi khô ra ngoài không khí hoặc ngoài trời, căng trên sào dài, lớp lông vào trong, lớp thịt ra ngoài.

+ **Muối tổng hợp.** Ngâm da vào bể có chứa dung dịch muối ăn 26% trong 12-24 giờ, rồi lấy ra cho chảy ráo nước, đem căng ra để phơi 3-4 ngày; sau đó xếp gấp lại cho mặt lông lên trên, rắc một ít muối giữa 2 tấm da.

+ **Ngâm asen.** Mục đích để ngăn ngừa tác động của côn trùng (Dermestes) làm hư hỏng da sau này.

Ở những nước nhiệt đới, loại côn trùng này thường phát triển nhiều trên da chưa lọc sạch hết mỡ, và gây hư hại nhiều cho da và lông đã thuộc.

Người ta thường ngâm da trong những bể to có chứa dung dịch *arseniat natri* 3-5% (1kg trong 200 lít nước) trong 20 đến 30 phút đối với da của gia súc lớn và 10 đến 15 phút đối với da của gia súc nhỏ. Nên ngâm da ngay sau khi mổ thịt hoặc 2 đến 3 giờ sau là cùng.

Aseniat natri là một chất độc nên phải chú ý ngâm cẩn thận.

PHỤ LỤC

PHƯƠNG PHÁP KIỂM TRA VI KHUẨN TRONG THỊT

Những trường hợp cần phải xét nghiệm vi khuẩn học thịt

Cần tiến hành xét nghiệm vi khuẩn học thịt và các sản phẩm của thịt khi trong thịt nghi ngờ có mầm bệnh gây ngộ độc thức ăn và vi sinh vật gây các bệnh truyền nhiễm khác nguy hiểm cho người và gia súc.

Theo quy tắc vệ sinh thú y và điều lệ kiểm nghiệm thú sản, các trường hợp sau đây bắt buộc phải kiểm tra vi khuẩn học:

- + Khi nghi ngờ các trường hợp bại huyết, mủ huyết và trúng độc.

- + Tất cả các trường hợp gia súc chết bất ngờ đòi hỏi loại trừ các bệnh truyền nhiễm.

- + Khi mắc bệnh đường ruột.

- + Khi có bệnh trầm trọng đường hô hấp.

- + Khi có bệnh trầm trọng đường sinh dục, bệnh cấp tính của vú, các khớp xương, bao khớp và móng chân.

- + Khi có các vết thương lở loét rộng và lâu ngày có mủ và thối, thân nhiệt gia súc cao, bệnh ung nhọt vỡ mủ.

+ Khi trạng thái gia súc rất xấu, thân nhiệt hạ thấp hơn bình thường, súc vật gầy còm không rõ nguyên nhân.

+ Khi lấy ruột phủ tạng muộn quá 2 giờ sau khi mổ thịt.

+ Khi khám thân thịt nghi vấn mà không có phủ tạng.

+ Khi kiểm nghiệm các loại gia súc được miễn dịch cao độ ở các xưởng chế thuốc sinh hóa thú y (tối thiểu sau 3 tuần lễ từ khi tiêm vi khuẩn sống hoặc sau 1 tuần lễ từ lúc tiêm vi khuẩn chết mới được mổ thịt).

+ Khi nghi ngờ có bệnh phó thương hàn hoặc thịt nhiễm vi khuẩn nhóm Salmonella sau khi mổ thịt và những gia súc sống mang Salmonella.

+ Khi có bệnh lở mồm long móng cấp tính, và khi nghi mắc bệnh truyền nhiễm cấp tính.

+ Những gia súc chọc tiết chưa hết.

+ Thịt khả nghi không biết nguồn gốc, giết thịt không theo quy chế vệ sinh, thể lệ sát sinh.

Thịt hư hỏng có mùi ôi, thiu, thối!

- Cách lấy mẫu thịt và phủ tạng để xét nghiệm vi khuẩn học.

Để xét nghiệm vi khuẩn học người ta lấy các mẫu vật sau đây.

+ Một mẫu thịt độ 250-300g hình khối, mỗi cạnh dài độ 5-6cm, miếng thịt ở cơ ruồi chi trước, chi sau, mông thịt thăn, bắp thịt nghi ngờ v.v..., cùng với tổ chức liên kết bao bọc chung quanh còn nguyên vẹn; dùng dao

sạch cắt mẫu thịt bỏ vào lọ thủy tinh hay kim loại đã khử khuẩn.

+ Hai hạch lâm ba còn nguyên vẹn (hạch trước vai, hạch trước đùi, hạch cơ sinh đôi hạch dưới hàm) cùng với tổ chức liên kết bao bọc chung quanh.

+ Lách, thận nguyên vẹn, mảnh phổi miếng gan (độ 500g) với hạch lâm ba gan (nếu hạch lâm ba gan không lấy được thì lấy túi mật đã bỏ mật), xương ống.

+ Nếu có những nhận xét về giải phẫu bệnh đặc biệt hướng về một khí quan khác, thì lấy thêm một mảnh khí quan ấy và lấy nguyên vẹn hạch lâm ba của nó, các bệnh tích đặc hiệu.

+ Đối với thịt ướp muối giữa trong thùng với nước muối thì lấy mẫu thịt ở lớp trên, lớp giữa và lớp dưới cùng của thùng, với nước. Có thể lấy thêm xương ống.

+ Muốn kiểm tra vi khuẩn nhiệt thán nên lấy hạch lâm ba, xương ống còn tuỷ, lách, gan, máu tim..., trực khuẩn Salmonella thì lấy gan, túi mật, lách, thận, hạch lâm ba, ruột non ... trực khuẩn Brucella thì lấy máu tim, dịch vị, tử cung, tinh hoàn...

Phải lấy mẫu thịt phủ tạng ngay sau khi mổ thịt bằng những dụng cụ sạch vô khuẩn (đun nước sôi) tránh nhiễm khuẩn trong khi lấy, bỏ vào chai lọ, hộp thủy tinh hoặc kim loại đã khử khuẩn, đối với xương ống hoặc các mẫu vật công kênh có thể gói vào giấy sạch, cho vào hộp gỗ hoặc hộp giấy cứng, ống vầu có nắp đậy. Sau khi đóng gói dán nhãn xong gửi kèm theo mỗi mẫu vật một phiếu yêu cầu xét nghiệm ghi rõ: - Tên vật phẩm (thuộc loại gì, số

lượng, cách thức lấy - Nơi lấy mẫu vật phẩm là lò mổ, trại chăn nuôi... - Thời gian lấy - Mục đích xét nghiệm (mầm bệnh gì?) - Triệu chứng con vật ốm trước khi mổ nếu có thân nhiệt, thời gian tiến triển bệnh, bệnh tích trên con vật giết thịt - Chúc vụ, họ tên người lấy vật phẩm chữ ký và dấu của cơ quan gửi mẫu vật phẩm.

Nếu phòng xét nghiệm ở quá xa nơi mổ thịt (vài ngày đường) thì cần xử lý mẫu vật phẩm trước khi gửi bằng cách nhúng vào nước sôi hoặc creolin đun sôi, rồi gói vào vải gạc, giấy hoặc nguyên liệu đã tẩm ướt bằng creolin, bên ngoài bọc giấy thấm nước hoặc giấy lọc, cho vào thùng hoặc ống vầu có mặt của đã tẩm chất sát khuẩn, nên bảo quản mẫu vật phẩm ở tủ lạnh 4°C - 5°C , trong khi chờ đợi xét nghiệm.

*** Tiến hành xét nghiệm sơ bộ vi khuẩn học ở thịt**

+ Soi kính hiển vi (để kiểm tra tình hình nhiễm vi sinh vật của thịt ở bề mặt và bề sâu). Lượng vi sinh vật nhiều hay ít biểu hiện tình hình vệ sinh trong quá trình giết thịt, chuyển vận, mua bán xấu hay tốt, và tình hình bảo quản thịt sau khi mổ. Dùng dao sạch cắt một mẫu nhỏ thịt trên bề mặt thịt bằng hạt đậu xanh, in vết trên phiến kính, để khô rồi nhuộm Gram, soi kính hiển vi. Trên mỗi phiến kính, đếm số vi khuẩn trên 5 thị trường [cầu khuẩn và trực khuẩn gram (-), gram (+)], tính số trung bình. Sau đó kiểm tra bề sâu thịt, dùng cồn đốt mặt thịt ở một nơi khác, rồi dùng dao mổ nhỏ đã sát khuẩn khoét sâu vào miếng thịt, lấy một miếng thịt nhỏ bằng hạt đậu xanh ở 2 độ sâu khác nhau (2cm-3,5-4cm) in vết trên 2 phiến kính, để khô, nhuộm gram và

soi kính đếm số vi khuẩn gram (-) và gram (+) trên 5 thị trường và tính số trung bình. Nếu thịt tươi tốt thì ở các lớp bề sâu độ 3,5cm không thấy vi khuẩn.

***Tiêu chuẩn đánh giá thịt tươi
bằng phương pháp soi kính hiển vi***

Phẩm chất thịt	Độ nhiễm khuẩn
Thịt tươi	+ Trên phiến kính không tìm thấy vi khuẩn, hoặc trên một thị trường chỉ thấy 1,2 cầu khuẩn hay trực khuẩn gram (+) khi kiểm tra bề sâu của thịt. + Hoàn toàn không tìm thấy các thớ thịt bị thối rữa.
Thịt kém tươi	Trên phiến kính có 20-30 cầu khuẩn và trực khuẩn, thỉnh thoảng có thớ thịt bị thối rữa (khi kiểm tra bề sâu của thịt)

+ Thử các phản ứng sinh H_2S , Indola và làm tan chảy gelatin:

Xem cách thử phản ứng sinh H_2S ở phần kiểm tra sinh hóa học ở trên. Để thử phản ứng sinh Indola cấy một mẫu thịt độ 1g vào một ống nước pepton, để ủ ấm $37^\circ C$ trong 24 giờ, sau đó lấy ra nhỏ trên mặt môi trường 4-5 giọt dung dịch Kôvác (Kowacs) lắc đều, nếu xuất hiện trên mặt môi trường một vòng màu đỏ là có sinh indola. Khi nhỏ dung dịch Kôvác vào, indola sẽ kết hợp với P-dimetilamino benzandehit để tạo thành một hợp chất màu đỏ gọi là rosindol, trên bề mặt tiếp xúc xuất hiện một vòng màu đỏ sẫm.

Để thử phản ứng làm lỏng gelatin, dùng que cấy đầu thẳng cấy canh khuẩn vào một ống gelatin, để ở nhiệt độ 20-25°C, tốt nhất ở 22°-23°C trong 48 giờ để xem gelatin có tan chảy không tùy theo vi khuẩn có khả năng phân huỷ chất protit hay không.

Dựa trên tính chất sinh H₂S, indola và làm tan chảy gelatin để đánh giá xem thịt còn tươi hay đã thối rữa.

+ Phân lập và giám định vi khuẩn hiếu khí gây ngộ độc thức ăn và các bệnh truyền nhiễm khác.

Người có thể bị ngộ độc thức ăn do các loài vi sinh sau đây:

Staphylococcus aureus, *Streptococcus faecalis*, *Salmonella typhimurium*, *Sal. cholerae* suis, *Sal. enteritidis*, *Sal. typhimurium*, *Sal. newport*, *Sal. enteritidis*, *Arizona*, *Shigella flexneri*, *Sh. Sonnei*, *Sh. boydii*, *E. Coli* *Proteus vulgaris*, *Pr. mirabilis*, *Pr. morgani*, *Pr. rellgeri*, một số trực khuẩn gram (+) có nha bào như *Bacillus anthracis*, *Beereus*, và một số vi khuẩn kỵ khí họ *Costridium* như *Cl. perfringens*, *Cl. botulinum*.

Thịt còn có thể nhiễm một số vi khuẩn gây bệnh truyền nhiễm như vi khuẩn *đóng dấu lợn*, *tụ huyết trùng lợn*, *Listeria*, *Monocy togenes*, *Diplococcus*, *Brueella*, xạ khuẩn *Actinomyces*, vi khuẩn nhiệt thán v.v...

Khi mẫu vật phẩm được gửi đến phòng xét nghiệm vi sinh vật học cần nghiên cứu kỹ các mẫu này và các bảng yêu cầu xét nghiệm cùng các chỉ dẫn, các tài liệu kèm theo để có hướng xét nghiệm đúng, đi sâu phân tích triệu chứng bệnh tích của con vật, triệu

chứng của người bị ngộ độc và loại thực phẩm thức ăn đã dùng.

Mặc dầu đã có những tài liệu về lâm sàng và dịch tễ học soi sáng hướng xét nghiệm, phải tiến hành kiểm nghiệm một cách khách quan.

Công tác phân lập và giám định vi khuẩn hiếu khí gây bệnh trong thịt tiến hành qua các bước soi kính hiển vi, nuôi cấy, phân lập trong các môi trường, giám định các đặc tính sinh hóa, tiêm truyền động vật thí nghiệm và làm các phản ứng huyết thanh ngoài ra cần làm thêm xét nghiệm bệnh lý giải phẫu.

1. Soi kính hiển vi kiểm tra hình thái vi khuẩn

Hơ qua lửa cồn mẫu vật xét nghiệm để đốt cháy lớp ngoài rồi dùng kéo vô khuẩn cắt vài cục nhỏ in vết trên 2-10 phiến kính mỗi mẫu, đánh dấu và số lên đồ phiến, để khô, cố định bằng cách hơ qua 3 lần trên ngọn đèn cồn và nhuộm gram quan sát trên kính hiển vi để nắm tình hình vi sinh vật (số lượng và đặc tính hình thái vi khuẩn).

2. Nuôi cấy phân lập trong các môi trường

Lọc bạc nhạc tổ chức liên kết, tổ chức mỡ trên các cơ, hạch lâm ba và phủ tạng cần xét nghiệm, nhúng vào cồn trong vài giây rồi đốt bề mặt của vật phẩm. Dùng kéo hoặc dao mổ con đã khử khuẩn cắt từ giữa vật phẩm lấy những cục nhỏ độ 2-3cm, đối với hạch lâm ba thì cắt ra và cấy bằng bề mặt vết cắt, đối với túi mật thì lấy chất cao từ mật trong để cấy.

Cấy vật phẩm trên các môi trường phân lập như

thạch nước thịt pepton, môi trường tăng sinh hoặc các môi trường phân lập chọn lọc khác. Để tiết kiệm môi trường có thể chia đôi đĩa thạch, cấy 2 vật phẩm trên mỗi đĩa. Muốn có những khuẩn lạc mọc riêng lẻ và thưa, có thể cấy trên 3 hoặc 4 vùng của đĩa thạch, lần đầu dùng cặp lấy cục vật phẩm đã chuẩn bị sẵn miết nhẹ một vòng hoặc cấy trên 1/4 đĩa thạch, sau đó dùng que thủy tinh vô khuẩn đầu được gấp thẳng góc với trục que để cấy nối liền những đường cấy ở vùng thứ nhất sang vùng thứ 2 (đĩa thạch đã được chia thành 4 góc bằng bút chì mờ) tiếp tục cấy vùng thứ 3 và thứ 4. Để ủ ấm 16 đến 24 giờ, các khuẩn lạc sẽ phát triển riêng biệt dễ phân lập.

Tùy theo hướng xét nghiệm mà chọn môi trường thích hợp. Cấy mẫu vật vào môi trường tăng sinh Mule Kofman rồi cấy chuyển sang môi trường Endo, E.M.B, xanh Trung Quốc, S.S (Salmonella - Shigella) Istrate v.v... để tìm Salmonella. Cấy vào môi trường Endo, E. M. B S.S. Istrati, Gasne v.v... để tìm vi khuẩn đường ruột E. Coli shigella. Cấy vào nước ngưng tụ ở đáy thạch nghiêng (không được đục chạm đến bề mặt môi trường) để tìm Proteus (khuẩn lạc phát triển nhiều lan tràn). Cấy vào môi trường thạch máu rồi chuyển sang môi trường Sapman để phân lập tụ cầu khuẩn, cấy vào môi trường tăng sinh nước thịt và thạch kali tenlurit để tìm Streptococcus paecalis. Cấy vào môi trường nước thịt glucoza rồi đun cách thủy 85°C trong 30 phút làm lạnh ngay, sau cùng cấy truyền sang thạch máu để phân lập các vi khuẩn gram (+) có nha bào. Cấy vào môi

trường nước thịt yếm khí, môi trường Tarosi, nước thịt VF để phân lập vi khuẩn yếm khí thuộc giống Clostridium.

Sau 16-24 giờ quan sát sự phát triển của những khuẩn lạc trên môi trường thạch phân lập. Để xác định độ nhiễm khuẩn chung của mẫu vật phẩm, người ta đếm số lượng khuẩn lạc phát triển trên đĩa thạch nước thịt pepton theo ký hiệu sau đây:

Không có sự sinh trưởng của vi khuẩn: -

Số lượng khuẩn lạc tới 20 cái: +

Số khuẩn lạc từ 20 đến 50 cái: ++

Số lượng khuẩn lạc trên 50 cái: +++

Tuỳ theo hình thái, kích thước và đặc điểm của khuẩn lạc mà có hướng xét nghiệm về từng loài vi khuẩn.

3. Giám định đặc tính sinh hóa của vi khuẩn phân lập. Để xác định các đặc tính sinh hóa của vi khuẩn phân lập được tiếp tục cấy truyền sang môi trường thạch máu để kiểm tra đặc tính dung huyết, môi trường sữa quỳ xem có làm đông sữa không, môi trường gelatin xem có làm tan chảy không, môi trường thạch lỏng hoặc nước thịt pepton để kiểm tra di động, các môi trường đường, môi trường kiểm tra sự sản sinh H_2S (thạch chì), indola (nước pepton), môi trường thử phản ứng M. R. (nước pepton gluco), phản ứng VP (nước pepton gluco), môi trường xitrat xem có sử dụng xitrat không, môi trường thử phản ứng hoàn nguyên nitrat thành nitrit, môi trường urê v.v...

4. Tiêm truyền động vật thí nghiệm để xác định

tính gây bệnh của vi khuẩn đối với động vật thí nghiệm. Chọn những động vật thích hợp cho từng mầm bệnh để kiểm tra đặc tính gây bệnh và độc lực của vi khuẩn. Khâu này là một trong những khâu quyết định của công tác xét nghiệm.

5. Giám định đặc tính kháng nguyên của vi khuẩn bằng các phản ứng huyết thanh học. Tùy theo loài vi khuẩn phân lập được mà tiến hành các phản ứng huyết thanh học như phản ứng kết tủa (vi khuẩn nhiệt thán); phản ứng ngưng kết (vi khuẩn đường ruột *Semonella*, *E. Coli* phản ứng vi ngưng kết tan (*Leptospira*), phản ứng kết hợp bổ thể (*malleonuyces malbi*, *Brucella*...).

- *Xét nghiệm tụ cầu khuẩn gây bệnh Staphylococcus aureus.*

+ *Soi kính hiển vi* đồ phiến vật phẩm, mủ nhuộm gram thấy cầu khuẩn hình tròn đường kính $0,7-1\mu$, tập trung lại thành chùm như chùm nho, gram dương, không di động, không sinh nha bào.

+ *Nuôi cấy phân lập.* Cấy mẫu vật phẩm (mủ, hạch lâm ba, phổi...) rìa cấy lên đĩa thạch máu (có 5% máu cừu). Để ủ ấm 37°C trong 18 đến 24 giờ. Xuất hiện những khuẩn lạc tròn ướt bóng, có vùng dung huyết chung quanh không còn màu đỏ. Giám định tính gây bệnh của tụ cầu khuẩn bằng một số phản ứng như phản ứng lên men đường manit, phản ứng làm đông huyết tương (coagulaza), tính chất gây hoại tử trong da động vật và phản ứng phosphataza. Thử phản ứng lên men đường manit bằng môi trường Sapman.

Môi trường sapman màu vàng cam. Tụ cầu khuẩn gây bệnh len men đường manit, làm cho môi trường trở nên toan tính và có màu vàng (pH 6,8), còn tụ cầu khuẩn không gây bệnh làm cho môi trường đổi thành màu đỏ (pH 8,4).

+ *Phản ứng làm đông huyết tương (coagulaza).*

Phản ứng này có thể làm trong ống nghiệm hoặc trên phiến kính. Tụ cầu khuẩn gây bệnh có enzym làm đông huyết tương (plasmocoagulaza) cho nên có thể tiến hành phản ứng bằng cách lấy 0,5ml huyết tương thô hoặc lợn cho vào một ống nghiệm nhỏ, rồi nhỏ vào vài giọt canh khuẩn tụ cầu khuẩn. Để trong tủ ấm 37°C trong 6 giờ. Nếu huyết tương đông đặc lại là dương tính. Có thể dùng một phiến kính nhỏ hỗn dịch vi khuẩn ở phía 2 đầu, rồi nhỏ vào một giọt huyết tương ở giọt đầu và một giọt nước muối sinh lý ở giọt cuối (đối chứng), trộn đều bằng que cấy. Nếu ở giọt đầu có huyết tương bị đông và giọt cuối đối chứng có nước sinh lý không đông là kết quả dương tính (có coagulaza). Để kiểm tra tính chất gây hoại tử trong da động vật thí nghiệm, người ta dùng hỗn dịch tụ cầu khuẩn trong nước muối sinh lý tiêm 0,3 ml vào nội bì thỏ, 0,2 ml vào nội bì chuột lang (nơi tiêm đã được nhổ hết lông, dùng canh khuẩn thạch 24 giờ chứa 5 tỷ vi khuẩn trong 1ml). Sau 24 đến 72 giờ nếu nơi tiêm thâm tím lại là có kết quả dương tính.

+ *Phản ứng photphatasa.*

Muốn tiến hành phản ứng này cần chế môi trường *photphatasa* và dung dịch colamin fenola - ftalein photphat. Cách chế dung dịch colamin fenola - ftalein

photphat: cho 1 gam colamin lenoliftalein photphat vào 200ml nước cất, khuấy cho tan, lọc qua lọc xaizơ.

Cách chế môi trường photphatasa: lấy 100ml thạch thường pH 8,5 đem đun chảy rồi để nguội đến 50°C, thêm vào 2ml dung dịch colamin fenola - ftalein photphat 0,5% lắc trộn đều, đổ ra hộp lồng, để nguội. Khi dùng, cấy cầu khuẩn, để ủ ấm 37°C trong 24 giờ rồi nhỏ dung dịch amoniac 0,5/N trên khuẩn lạc đã mọc. Kết quả dương tính nếu khuẩn lạc có màu hồng.

· Phương pháp phát hiện độc tố ruột trong canh khuẩn lọc

Muốn xác định tác động gây ỉa chảy của tụ cầu khuẩn cần phát hiện sự có mặt của độc tố ruột (enterotoxin) trong chất lọc của canh khuẩn. Có nhiều cách phát hiện độc tố ruột trong chất lọc canh khuẩn. Thí nghiệm cho khi uống chất lọc canh khuẩn sẽ cho kết quả cao hơn là tiêm vào phúc mạc hoặc tĩnh mạch khi hoặc mèo con, nhưng người ta biết rằng về vấn đề này khi chịu đựng được hơn người và có thể quen với độc tố ruột nếu được cho vào cơ thể nhiều lần. Hơn nữa khi đắt tiền, khó sử dụng. Tốt nhất là tiêm chất lọc canh khuẩn cho mèo con hoặc mèo trưởng thành.

Để chế chất lọc canh khuẩn cho khi uống người ta dùng môi trường bán tổng hợp thạch mềm bố trí thành lớp mỏng trong hộp lồng Petri hoặc bình, chai lọ để cấy đều trên bề mặt vài giọt canh khuẩn non tụ cầu khuẩn cần giám định. Để trong tủ ấm 37°C trong 40 giờ và bầu không khí có 30% khí cacbonic và 70% oxy. Ép canh khuẩn trên vải gạc và đem ly tâm ở tốc độ cao. Lấy dịch

nổi lên trên đem khử khuẩn qua lọc xaizơ nếu cần. Cho 3 khỉ (*Macaca mulatta*) uống 40ml chất lọc canh khuẩn này bằng ống dò dạ dày. Theo dõi 6 giờ để kiểm tra xem có nôn mửa không. Nếu chất lọc chứa độc tố ruột, khỉ bắt đầu mửa sau 2 giờ rưỡi đến 3 giờ.

Để chế chất lọc canh khuẩn dùng để tiêm tĩnh mạch hay phúc mạc cho mèo, người ta lọc canh khuẩn tụ cầu khuẩn qua lọc xaizơ rồi đem xử lý để loại trừ độc tố α và β , sửa pH của chất lọc thành pH 7 bằng cách cho thêm vào axit axetic loãng và đun cách thủy trong 30 phút. Đem quay ly tâm để loại chất kết tủa ra rồi dùng dịch nổi lên trên để tiêm. Xử lý bằng nhiệt như thế có tác dụng làm mất hoạt tính của dung huyết tố α và β , chỉ còn tồn tại độc tố ruột (không bị nhiệt tiêu diệt vì có sức đề kháng với nhiệt) với số lượng đủ để gây phản ứng cho động vật thí nghiệm - ngoài ra có thể làm vô hoạt dung huyết tố bằng phocmôn hoặc trung hòa bằng kháng độc tố đặc hiệu. Trong trường hợp này kháng độc tố đem dùng không được chứa kháng thể trung hòa độc tố ruột. Những kỹ thuật này không đơn giản và đòi hỏi nhiều thì giờ hơn là đun sôi đơn giản, nhưng người ta phải áp dụng trong trường hợp nghiên cứu chất lọc có ít, rất ít độc tố ruột. Những chất lọc được xử lý cần được đun lại ở 37°C trước khi tiêm và khi tiêm phải bơm từ từ.

Có thể dùng mèo trưởng thành khỏe mạnh cho ăn một bữa ăn trung bình một thời gian ngắn trước khi tiêm vào tĩnh mạch độc tố ruột, làm như thế có thể làm tăng nôn mửa, có thể loại trừ những con ốm không ăn.

Tiêm chậm vào tĩnh mạch kheo (vein saphene) 0,5-5ml chất lọc canh khuẩn tùy theo hoạt tính của độc tố.

Có thể dùng mèo con từ sáu tuần đến 3 tháng tuổi nặng từ 300 đến 700g (có thể đến 1kg) tiêm vào phúc mạc 3ml chất lọc đã được xử lý, hoặc 5ml nếu không thấy phản ứng. Sau khi tiêm chất lọc có độc tố ruột thấy xuất hiện hội chứng mệt nhọc khác thường, tiếp theo là nôn và mửa, kèm theo đi ỉa chảy trong 30 phút đến 4 giờ sau khi tiêm chất lọc. Không dùng những con vật đã tiêm thí nghiệm trong nhiều lần vì khả năng quen độc tố ruột có thể tăng.

Có thể dùng thí nghiệm Donman trên mèo, cấy Staphylococcus vào nước thịt có 0,1% thạch và 1% tinh bột mì pH 6, để ở tủ ấm 37°C trong bầu không khí có CO₂ với ít O₂ (để trong chuông thủy tinh đầy kín trong thấp một ngọn nến) trong 5 ngày, rồi đem lọc qua lọc xaizơ, tiêm vào phúc mạc 2 mèo non 2ml chất lọc canh khuẩn (cho mèo ăn một ít cơm trước khi tiêm vài giờ). Nếu chất lọc có độc tố ruột thì sau khi tiêm một lúc, mèo run rẩy, nôn mửa, ỉa chảy, nhiệt độ tăng. Vài giờ sau, mèo trở lại bình thường.

- *Xét nghiệm vi khuẩn đường ruột, thương hàn và những vi khuẩn gây ngộ độc thức ăn khác.*

Các bước xét nghiệm cần tiến hành theo sơ đồ xét nghiệm vi khuẩn đường ruột.

Trong khi soi kính tiêu bản nhuộm gram cần kiểm tra hình thái của vi khuẩn (chú ý những vi khuẩn nhỏ, trực khuẩn 2 đầu tròn gram âm gây bệnh).

Trong khi nuôi cấy phân lập trên các loại môi trường thạch đĩa chọn lọc (như môi trường Endô, thạch EMB, thạch Mắc công cây, thạch S.S, môi trường Istrati, Vinson Blai, Kristenxen v.v...) cần phân biệt các khuẩn lạc của vi khuẩn đường ruột với nhau, phân tích tác động đến đường lactoz, hình thái tính chất và màu sắc của khuẩn lạc, để có hướng xét nghiệm về mặt sinh hóa học các nhóm vi khuẩn đường ruột.

Trong việc giám định vi khuẩn đường ruột trong thịt, các phản ứng sinh hóa đóng vai trò rất quan trọng, nhất là các phản ứng lên men đường để phân biệt các vi khuẩn và các nhóm vi khuẩn với nhau.

Trong việc giám định vi khuẩn đường ruột bằng phản ứng huyết thanh học, phản ứng ngưng kết góp phần định típ và định chủng, định nhóm các vi khuẩn đã phân lập được. Có thể tiến hành phản ứng ngưng kết trên phiến kính hoặc trong ống nghiệm.

Cần phải chuẩn bị đầy đủ các loại kháng huyết thanh cần thiết. Đối với *Salmonella* ngoài *Salm, typhira* cần có 4 loại kháng huyết thanh ngưng kết *Salmonella paratyphi B*, *Salm, typhinuerium*, *Salm Cholerae suis* và *Salm enterilidis* (những vi khuẩn thương hàn và phó thương hàn này gây bệnh cho người khi ăn thịt nhiễm khuẩn).

Đối với *E. Coli* cần có một số kháng huyết thanh thuộc các típ *E. Coli* gây bệnh cho người (thuộc 2 nhóm đa giá poly A và poly B). Đối với *Salmonella*, người ta lấy kháng nguyên phân lập được làm phản ứng ngưng kết trên phiến kính trước tiên với kháng huyết thanh O

nhiều hóa trị thuộc các nhóm từ A đến E (kháng huyết thanh đa giá liên nhóm A - E), nếu có phản ứng dương tính thì lại tiếp tục làm phản ứng ngưng kết với kháng huyết thanh O và H của nhóm, cuối cùng làm phản ứng với kháng huyết thanh của chủng nghi ngờ (huyết thanh đơn giá).

Riêng đối với 4 típ kháng huyết thanh *Salmonella* nói trên, có thể tiến hành phản ứng ngưng kết trên phiến kính trước tiên bằng cách dùng kháng huyết thanh đa giá hỗn hợp bốn loại huyết thanh kháng *Salm paratyphi B*, *Salm typhi murueta*, *Salm cholerae suis* và *Salm enteritidis* pha loãng 1:10. Nhỏ một giọt kháng huyết thanh đa giá và một giọt nước sinh lý (làm đối chứng) ở hai đầu một phiến kính mỏng trong sạch. Dùng que cấy lấy một ít khuẩn lạc điển hình nghi ngờ cho vào giọt kháng huyết thanh đa giá hỗn hợp, khuấy trộn đều. Đốt vòng que cấy rồi lấy khuẩn lạc vi khuẩn phân lập hòa vào giọt nước sinh lý đối chứng. Đọc phản ứng sau 1-2 phút. Phản ứng dương tính, có ngưng kết nếu vi khuẩn tập trung dính lại ở dạng bột trắng nhỏ hoặc cục nhỏ lợn cợn, huyết thanh trở nên trong sáng. Phản ứng âm tính, như giọt nước sinh lý có vi khuẩn đối chứng nếu đục đều, vi khuẩn không dính lại với nhau. Nên đọc kết quả trên nền đen, phiến kính hơi nghiêng và quan sát qua kính lúp.

Nếu có kết quả dương tính thì tiếp tục làm phản ứng ngưng kết với huyết thanh đơn giá của từng típ kháng huyết thanh riêng biệt với độ pha loãng 1 : 50.

Phản ứng ngưng kết trong ống nghiệm tiến hành với

các loại kháng huyết thanh của vi khuẩn đường ruột như phản ứng ngưng kết trên phiến kính.

Mỗi loại kháng huyết thanh dùng một dây 6 ống nghiệm ngưng kết đặt vào giá ống nghiệm. Có 4 dây cho 4 loại kháng huyết thanh *Salmonella paratyphi B*, *Salm typhi murium*, *Salm cholerae suis* và *Salm enteritidis*. Ở ống nghiệm ngưng kết thứ nhất cho vào 2ml kháng huyết thanh đã pha loãng 1/100. Cho vào các ống nghiệm, từ ống thứ hai đến ống thứ 5 mỗi ống 1ml nước sinh lý đã được khử khuẩn. Cho vào ống nghiệm thứ 6 một ml huyết thanh pha loãng 1 : 100, hai ống 5 và 6 là ống đối chứng kháng nguyên và huyết thanh.

Dùng ống hút có khắc hút 1ml huyết thanh 1 : 100 chuyển sang ống 2, lắc trộn đều, ống 2 có huyết thanh pha loãng 1/200. Hút 1ml huyết thanh pha loãng 1 : 200 ở ống 2 chuyển sang ống 3, lắc trộn đều rồi hút 1ml huyết thanh ở ống 3, lắc trộn đều rồi hút 1ml huyết thanh ở ống 3 đã pha loãng 1 : 400, sang ống 4, trộn đều rồi hút 1 ml trong ống 4 bỏ đi, ống 4 có huyết thanh pha loãng 1 : 800. Nếu muốn có hiệu giá ngưng kết cao hơn thì thêm một số ống nghiệm ngưng kết nữa.

Kháng nguyên là huyền dịch, rửa vi khuẩn trên canh khuẩn thạch nghiêng 24 giờ bằng nước sinh lý (mỗi ống thạch nghiêng cho 2-4ml nước sinh lý). Dùng ống hút hút huyền dịch vi khuẩn đã phân lập giở vào 5 ống ngưng kết từ ống 1 đến ống 5 mỗi ống 2 giọt. Lắc đều, các ống đều đục vẩn mờ nhẹ.

Lắc đều giá ống nghiệm rồi để vào tủ ấm trong 2 đến

4 giờ. Lấy ra xem, nhận định kết quả sơ bộ, rồi để ở nhiệt độ ở phòng trong 20-24 giờ.

Đọc kết quả. Phản ứng dương tính nếu hình thành ở đáy ống nghiệm hình dù, nước trong ống nghiệm trở nên trong sáng, khi lắc ống nghiệm, chất ngưng kết ở đáy phân tán ra ở dạng bột hoặc hạt, ống nghiệm đối chứng vi khuẩn đục đều, ống huyết thanh đối chứng không thay đổi trạng thái. Phản ứng ngưng kết có thể có hai dạng là dạng ngưng kết thân O với sự tạo thành những cục ngưng kết nhỏ dạng hạt, và dạng nguyên kết lông H. Trong đó vi khuẩn dính lại dưới dạng bột.

Ký hiệu thường dùng để ghi độ ngưng kết:

++++ hình thành hình dù khó tan vỡ thành bột hoặc hạt, huyết thanh hoàn toàn trong sáng.

+++ Tạo thành hình dù dạng bột tương đối chắc hoặc thành hạt nhỏ, huyết thanh trong.

++ Chất ngưng kết ở đáy ống dễ tan thành bột hoặc hạt hoặc huyết thanh đục.

+ Chất ngưng kết dính lại không chắc, đóng thành cụm nhỏ, huyết thanh đục.

- Không có hiện tượng ngưng kết.

Muốn đọc phản ứng được dễ dàng nên dùng gương lõm của kính hiển vi qua ánh sáng phản chiếu, hoặc gương soi ngưng kết.

- Dùng phản ứng kết tủa để phát hiện vi khuẩn phổ thương hàn trong thịt.

Chế kháng huyết thanh kết tủa bằng cách miễn dịch thỏ khoẻ trưởng thành bằng các loại vi khuẩn phổ

thương hàn *Salmonella typhi murium*, *Salm cholerae suis* và *Salm enterilidis*. Trước khi miễn dịch phải kiểm tra huyết thanh của máu thử bằng phản ứng ngưng kết đối với ba loài vi khuẩn phổ thương hàn nói trên, phản ứng này phải âm tính. Miễn dịch thử bằng vacxin phổ thương hàn bằng cách cho thêm vào một huyền dịch vi khuẩn có đậm độ 2 tỷ vi khuẩn trong 1ml. 0,1% focmon và giữ ở nhiệt độ ở phòng trong 48 giờ. Tiêm vacxin vào tĩnh mạch tai thử 5 lần trong 5 ngày, lần đầu tiêm với liều 0,2 ml, và sau đó 1,5 ml. Mười ngày sau lần tiêm cuối cùng, tiến hành lấy máu toàn bộ. Bảo quản huyết thanh lấy được bằng 1% axit boric (so với thể tích chung của huyết thanh). Kiểm tra vô khuẩn rồi đóng ống huyết thanh để tiêu dùng hàng ngày. Huyết thanh kết tủa cần có hiệu giá trên 1 : 300.000.

Có thể tiến hành phản ứng kết tủa theo phương pháp của P.V. Ivanopsep hoặc phương pháp của Viện vi khuẩn học Matxcova.

+ *Phương pháp của P.V. Ivanopsep*: Người ta cắt các mẫu thịt xét nghiệm thành cục nhỏ và cho vào một ống nghiệm đựng 10 ml dung dịch 1 : 100.000 lục sáng (ve bóng, vert brillant). Để trong tủ ấm từ 18 đến 20 giờ, chia vào một số ống nghiệm, cho thêm vào 0,1 ml dung dịch axit axetic 20% cho mỗi ống đựng 2 ml kháng nguyên. Để các ống nghiệm vào bình nước nóng trong 30 phút, rồi làm lạnh bằng nước lạnh. Cho thêm vào mỗi ống 1-2 giọt dung dịch xanh bromotimola 0,1% trong cồn, và giở vào dung dịch NaHCO_3 20% cho đến khi xuất hiện màu xanh (pH 7,2-7,3). Lọc qua bông non

thạch miên (amianté). Có thể lọc 2-3 lần qua giấy lọc hoặc ly tâm cho trong suốt.

Để tiến hành phản ứng kết tủa, dùng bốn ống nghiệm nhỏ đổ vào 0,1 ml huyết thanh kết tủa, ống thứ nhất huyết thanh *Salm typhimurium*, ống thứ hai huyết thanh *Salm cholerae suis*, ống thứ ba huyết thanh *Salm enteritidis* ống thứ tư huyết thanh thử khỏe không được miễn dịch (ống đối chứng). Sau đó dùng ống hút Paxto hút kháng nguyên lọc mẫu thật xét nghiệm đã chế cho vào mỗi ống 0,1 ml. Đặt vào giá ống nghiệm, để ở nhiệt độ trong phòng và tiến hành quan sát trong vòng 40 phút. Đọc phản ứng ở trên nền đen.

Phản ứng kết tủa dương tính nếu trong thời gian từ 5 đến 8 phút xuất hiện ở ranh giới kháng nguyên và kháng thể một vòng kết tủa đặc màu trắng xám.

+ Phương pháp của Viện vi khuẩn học Matxcova.

Người ta dùng huyết thanh kết tủa của 3 loài vi khuẩn phó thương hàn chế từ thỏ như đã nói ở phần trên. Để chế kháng nguyên, cấy mẫu thật cần xét nghiệm trên đĩa thạch. Để trong tủ ấm từ 16-18 giờ. Lấy ra rửa khuẩn lạc trên mặt thạch bằng 4-5 ml dung dịch axit axetic 1%. Rót chất rửa mặt thạch vào ống nghiệm, đem đun sôi trong bình nước trong 80 phút. Sau đó lọc qua bông thạch miên, rồi cho vào 1-2 giọt dung dịch axit rozalic (coralin). Dung dịch axit rozalic pha như sau:

Axit rozalic:	1g
Cồn:	10 ml
Nước cất:	10 ml

Hòa axit rozalic vào cồn, lắc đều cho tan và cho thêm nước. Nhỏ từng giọt dung dịch NaHCO_3 20% vào kháng nguyên đến khi có màu hồng nhạt chứng tỏ phản ứng trung tính hoặc kiềm yếu.

Để tiến hành phản ứng kết tủa cho vào 0,1 ml huyết thanh kết tủa ống nghiệm nhỏ đường kính 0,5cm rồi dùng ống hút nhỏ lên trên 0,1 ml kháng nguyên lọc. Chú ý nhỏ cẩn thận đừng để kháng thể và kháng nguyên trộn lẫn với nhau, phải có ranh giới nhìn thấy rõ ràng.

Phản ứng dương tính nếu ở chỗ tiếp xúc giữa kháng nguyên và kháng thể hình thành một vòng trắng. Quan sát từng ống một cứ 20-30 phút một lần trong vòng 2-3 giờ.

Phản ứng kết tủa này phát hiện vi khuẩn phó thương hàn trong thịt rất nhanh vì thể rất thuận lợi để xác định vi khuẩn nhiễm vào thịt.

- Phương pháp xác định nhanh chóng vi khuẩn phó thương hàn trong thịt.

Để có kết quả xét nghiệm nhanh chóng, người ta đã nghiên cứu cải tiến các khâu kiểm nghiệm, lựa chọn môi trường phân lập có hiệu quả nhất, áp dụng các biện pháp thúc đẩy nhanh chóng sự sinh trưởng của vi khuẩn, nuôi cấy số lượng lớn vi khuẩn vào thể tích môi trường không lớn. Với điều kiện làm việc khẩn trương, liên tục, không ngừng của phòng thí nghiệm, và áp dụng sơ đồ xét nghiệm hợp lý, có thể kết thúc việc xét nghiệm trong vòng 24 đến 48 giờ. Cấy mẫu vật phẩm xét nghiệm lên môi trường phân lập, chọn lọc có chất

tăng sinh để vi khuẩn có thể mọc nhanh chóng như môi trường tăng sinh Levina, cấy nhiều nguyên liệu vào 1/4 đĩa thạch, sau đó dùng que thuỷ tinh bẻ cong thuốc thợ rĩa ra các vùng còn lại. Nếu nguyên liệu bị nhiễm tạp khuẩn thì dùng thạch bacto... nếu thịt ướp lạnh thì nên để vào tủ ấm 3-4 giờ trước khi cấy lên môi trường tăng sinh. Để các đĩa môi trường tăng sinh vào tủ ấm trong 16 giờ sau đó lấy ra quan sát các khuẩn lạc, đánh dấu các khuẩn lạc nghi ngờ. Nhuộm gram soi kính. Kiểm tra di động. Sau đó tiến hành phản ứng ngưng kết với kháng huyết thanh đa giá *Salmonella typhi murym*, *Salm cholerae suis* và *Salm enteritidis* pha loãng 1 : 10. Nếu có kết quả ngưng kết dương tính thì tiến hành phản ứng ngưng kết riêng với từng loại huyết thanh pha loãng 1 : 50.

Từ 3-5 khuẩn lạc nghi ngờ, tiến hành các phản ứng sinh hóa, phản ứng lên men đường với các môi trường đường đã để tủ ấm 2 giờ. Quan sát và nhận định kết quả sau 6-8 giờ nuôi cấy ở tủ ấm.

- Xét nghiệm trực khuẩn nhiệt thán

Việc xét nghiệm trực khuẩn nhiệt thán trong phòng thí nghiệm tiến hành theo các bước sau đây:

- + Soi kính trực tiếp các tiêu bản vật phẩm nghi ngờ (máu, hạch, thịt, phủ tạng, da...).
- + Nước cấy phân lập trong môi trường.
- + Tiêm động vật thí nghiệm.
- + Làm phản ứng kết tủa.

Trong quá trình xét nghiệm cần phân biệt với những

vi khuẩn giống vi khuẩn nhiệt thán, trực khuẩn giả nhiệt thán *Bacillus pseudo anthracis*, *Bacillus anthracoides*, và *Bacillus megatherium*, *B. subtilis*, *B. licheni formis*, *B. mesentericus*, *B. mycoides*.

Có thể tìm thấy vi khuẩn trong máu, phủ tạng và mẫu vật phẩm. Dùng phương pháp nhuộm giáp mô thích hợp như phương pháp Hixơ hoặc phương pháp Soltys, có thể phát hiện được giáp mô của vi khuẩn, một yếu tố quan trọng để giám định vi khuẩn. Nếu có sự thối rữa bắt đầu trong xác chết hoặc mẫu vật phẩm thì khó xét nghiệm bằng phương pháp soi kính hoặc nước cấy phân lập trong môi trường, vì vi khuẩn bị các quá trình thối tiêu diệt nhanh chóng.

Phương pháp chẩn đoán nhanh chóng trực khuẩn nhiệt thán trên môi trường dinh dưỡng huyết thanh trong không khí có CO₂. Lấy 5-10g bệnh phẩm, máu, hạch lâm ba, gan, lách hòa với 3-4 lần nước cất, đem nghiền nát, lọc qua phễu có lớp bông thủy tinh dày 8-10cm để giữ cặn, rồi lấy 10-15 ml huyền dịch lọc được đem lọc lần thứ hai qua lọc xaizơ với màng lọc số 3. Lấy chất cặn trên màng lọc, cấy vào 2-3 đĩa thạch có môi trường dinh dưỡng huyết thanh. Đánh dấu chỗ cấy ở mặt trái đĩa cấy rồi đặt vào bình sấy vô khuẩn có CO₂. Để trong tủ ấm 37°C. Sau 4 giờ khuẩn lạc bắt đầu mọc.

Làm đồ phiên nhuộm với dung dịch safranin 1% soi kính thấy vi khuẩn nhiệt thán hình chuỗi ngắn có giáp mô màu vàng nhạt bao bọc chung quanh. *Bacillus anthracoides* và *B. pseudo anthracis* không hình thành giáp mô.

Nuôi cấy phân lập trên môi trường thạch đĩa hoặc thạch máu. Da chứa nhiều nha bào vi khuẩn. Vì vậy chúng ta nên đun nóng trước khi cấy. Đối với da tươi đun 65-80°C trong 30 phút, để giết vi khuẩn và tạp khuẩn khác rồi mới cấy, đối với da khô thì đổ thạch đun nóng 80°C vào phía trên của miếng da khô trong đĩa.

Tiêm dưới da bệnh phẩm cho chuột bạch hoặc chuột lang có thể giết chết những động vật thí nghiệm này trong vòng 48 giờ, mổ khám thấy có bệnh tích thủy thũng lây nhầy như chất keo lòng trắng trứng hoặc gelatin ở nơi tiêm, đem soi kính sau khi nhuộm, thấy trực khuẩn nhiệt thán có giáp mô. Vi khuẩn giả thán không gây bệnh cho những động vật thí nghiệm này với liều tiêm và cách tiêm tương tự.

Dùng phản ứng kết tủa Ascoli để phát hiện vi khuẩn nhiệt thán, có ý nghĩa quyết định trong việc công tác xét nghiệm. Chế kháng nguyên bằng mẫu vật phẩm nghi ngờ được nghiền nát với nước sinh lý, đun sôi và lọc trong. Cho 0,2-0,5ml kháng nguyên này vào một ống nghiệm có đường kính rất nhỏ, rồi cho kháng huyết thanh kết tủa, chế với vi khuẩn có giáp mô vào, chú ý dùng để trộn kháng nguyên và kháng thể. Phản ứng dương nếu ở đường ranh giới giữa hai chất hình thành một vòng kết tủa đục trắng trong vòng 15 phút.

**** Xét nghiệm vi khuẩn học đồ hộp thịt động vật***

- Nguyên tắc chung

Về mặt vi khuẩn học, người ta chia những sản phẩm thịt chế biến thành 4 loại.

+ *Sản phẩm thịt tươi*, không được xử lý bằng một phương pháp nào, sản phẩm này chứa hệ vi khuẩn tự nhiên của thịt tươi.

+ *Sản phẩm thịt tươi muối* không được xử lý bằng sức nóng, nhưng được gia thêm, ở nồng độ thay đổi, những hóa chất dùng để ướp muối. Do tác động chọn lọc của natri clorua, nitrat và nitrit, hệ vi khuẩn của những sản phẩm này gồm chủ yếu những vi sinh vật đề kháng với tác dụng của muối, những hóa chất ức chế này có một tác động chọn lọc đến các quá trình sinh vật học.

+ *Sản phẩm thịt chín hoặc rán, muối hoặc không muối*. Những sản phẩm này được xử lý bằng sức nóng ở nhiệt độ thấp. Hệ vi sinh vật của chúng gồm phần lớn những loài vi khuẩn hình thành nha bào (*Bacillus*, *Clostridium*) và một số loài không hình thành nha bào, nhưng kháng nhiệt (*Enterococcus*, *Streptococcus viridans* và *Thermobacterium*). Nếu những sản phẩm này không những được đun nóng mà lại còn được ướp nước muối, những thành phần hóa học của nước muối thì sẽ ức chế hoạt động của những vi sinh vật còn sống sót.

+ *Sản phẩm thịt thanh khuẩn*. Đó là những sản phẩm được xử lý bằng sức nóng ở nhiệt độ cao (nồi chưng hấp ướt cao áp). Về mặt lý thuyết, chúng là vô khuẩn nếu là được chứa đựng trong những đồ đựng sạch và đóng kín hoàn toàn.

Nói chung việc xét nghiệm vi khuẩn học những sản phẩm thịt có mục đích kiểm tra một hoặc nhiều đặc

tính sau đây: trạng thái tươi, khả năng bảo quản, điều kiện vệ sinh sản xuất của sản phẩm, và tình hình chứa vi sinh vật gây bệnh. Muốn đạt được những chỉ tiêu này, nhà vi khuẩn học phải làm một sự phân tích vừa về lượng vừa về chất của hệ vi khuẩn trong sản phẩm cần xét nghiệm. Phương pháp này bao gồm việc sử dụng những môi trường chọn lọc và những chất chỉ thị cho phép phân biệt những nhóm vi sinh vật quan trọng, hơn nữa việc phân tích thực tế những kết quả xét nghiệm thường tùy thuộc vào một sự đánh giá về số lượng, cho nên cần áp dụng những kỹ thuật nuôi cấy về số lượng và bán số lượng.

- Lấy mẫu và kiểm tra bên ngoài đồ hộp.

Lấy một số hộp để xét nghiệm theo tỷ lệ 0,05-0,1% nếu bề ngoài hộp bình thường và tỷ lệ 0,1-0,5% nếu bề ngoài hộp không bình thường (hộp phồng nắp, thùng rò rỉ...). Ở nơi sản xuất, khi đồ hộp đang được hấp tiệt khuẩn trong nồi chưng, lấy từ mỗi lần hấp ba hộp, 1 hộp ở lớp trên, hộp thứ hai ở lớp giữa và hộp thứ ba ở lớp dưới cùng. Khi phân tích người ta lấy một hộp, còn hai hộp kia giữ lại cho đến cuối lúc phân tích, khi chọn hộp để phân tích, lần lượt trong các đợt xét nghiệm, lần đầu, lấy hộp ở bên trên nơi chưng, lần thứ hai lấy hộp ở lớp giữa và lần thứ ba lấy hộp ở lớp dưới.

Trước hết kiểm tra bên ngoài của đồ hộp. Xem ngày sản xuất để biết thời gian bảo quản, rồi xem dạng bên ngoài của hộp, nắp đáy hộp có bị phồng lên không? Có bị thùng, dò, nước chảy ra không? Hộp có bị bóp méo không? Có thể dùng lupa (bội số x 2, x 5) để quan sát rõ hơn.

Để kiểm tra độ kín của đồ hộp, cho hộp vào thùng nước nóng trên 85°C hoặc nước sôi, cho ngập nước độ 30mm trong 5-10 phút, có lật hộp ở giữa thời gian kiểm tra. Nếu hộp bị hở thì bọt hơi sẽ phun ra đều ở nơi hở của hộp.

Sau khi kiểm tra bên ngoài hộp xong, để các hộp mẫu vào tủ ẩm 37°C trong 5 ngày, và dành một số hộp ở nhiệt độ 55°C để xét nghiệm vi khuẩn ưa nhiệt. Trong thời gian để ở tủ ẩm chúng ta cần đảo trộn đều vài lần.

• Tiến hành xét nghiệm vi khuẩn học.

Lấy hộp ở tủ ẩm ra, để nguội, kiểm tra xem hộp có phình ra ở nắp hoặc ở đáy không. Rửa sạch hộp bằng xà phòng với bàn chải cứng lau khô, lau qua cồn rồi hơ trên ngọn lửa cồn trong 15 giây rồi mở hộp bằng dụng cụ vô khuẩn. Đặt lên khay men vô khuẩn rồi đậy bằng nắp hộp lồng đã triệt khuẩn.

Để dùi nắp hộp, dùng một cái khoan có tiết diện hình quả trám kích thước $1 \times 1,5$ cm đã triệt khuẩn đặt vào giữa nắp hộp với góc $35-40^{\circ}$, rồi dùng tay ấn khoan xuống để đục thủng một lỗ hình quả trám, rút khoan ra và đậy kín nắp hộp lại ngay.

Lấy nguyên liệu trong hộp bằng ống thủy tinh vô khuẩn đường kính 0,8 cm. Miệng ống đủ sắc để cắt và lấy thịt. còn đầu kia của ống thủy tinh được bịt ở một đầu kín bằng nút bông. Sau đó dùng một đĩa thủy tinh nhỏ cho vào ống để đẩy nút bông cho nguyên liệu lọt ra khỏi ống để cấy.

Nếu không có khoan thì có thể dùng cái đột lỗ hoặc dao mổ đồ hộp.

Đối với hộp thịt bị phồng, dùng một mũi khoan và một phễu đã được thanh khuẩn ở lò hấp khô 180°C trong 1 giờ. Đặt phễu lên nắp hộp, rút nút bông ra, cho dùi khoan vào chân phễu, dùng búa đập cho dùi chọc thủng hộp. Hơi và nguyên liệu trong hộp bị phồng sẽ phụt ra phễu và rơi xuống khay. Khi các chất đã phun ra xong, thì dùng khăn vô khuẩn lau sạch hộp, đậy hộp lại bằng một nắp hộp lỏng.

Chú ý mọi động tác phải hết sức vô khuẩn, tránh nhiễm khuẩn bên ngoài vào hộp thịt. Nên tiến hành xét nghiệm trong một buồng vô khuẩn.

Để xét nghiệm về mặt vi khuẩn học thịt hộp người ta tiến hành xét nghiệm vi sinh vật hiếu khí, vi khuẩn yếm khí và vi khuẩn ưa nhiệt.

+ Xét nghiệm vi khuẩn hiếu khí.

Soi kính hiển vi trực tiếp:

Làm tiêu bản nguyên liệu lấy từ thịt hộp ra. Nhuộm gram và soi kính hiển vi. Việc làm này cho một ý niệm về mật độ vi khuẩn trong sản phẩm phân tích, rất cần thiết để ấn định độ pha loãng để nuôi cấy sau này. Người ta ước lượng rằng mỗi vi khuẩn trên thị trường (xem nhuộm với vật kính dầu) tương ứng với 500.000 vi khuẩn trong mỗi gam sản phẩm thịt hộp. Khi số lượng vi khuẩn trên một thị trường lớn, người ta có thể chắc chắn tìm ra một mật độ vi khuẩn rất cao. Đối với sản phẩm đã đun, ướp đông hoặc sấy khô, một số vi khuẩn,

mặc dầu bắt màu gram, nhưng có thể đã chết trong trường hợp này, một mật độ vi khuẩn cao trên đồ phiến đi đôi với một số lượng nhỏ có hạn khuẩn lạc mọc trên môi trường nuôi cấy chứng tỏ rằng sản phẩm đã nhiễm khuẩn cao trước khi được thanh khuẩn. Mặt khác, việc soi kính trực tiếp có thể cung cấp những tài liệu có giá trị về thành phần của hệ vi khuẩn, phát hiện loại vi sinh vật chủ yếu hoặc một số vi khuẩn ít khi gặp, và cho phép chọn một số phương pháp nuôi cấy thông thường (vi khuẩn hiếu khí, yếm khí, nấm men v.v...).

Nuôi cấy phân lập

Lấy mẫu vật phẩm bằng ống thủy tinh để cấy như đã nói ở trên. Nếu vật phẩm đặc hoàn toàn thì có thể cho vào bình thủy tinh có nước sinh lý, lắc để nghiền nhỏ ra, rồi hút hỗn dịch để cấy. Nếu là chất lỏng thì dùng ống hút để hút rồi cấy.

Cấy nguyên liệu lấy từ hộp thịt vào 2 ống nước thịt pepton có 1% gluco, pH 7,2-7,4, mỗi ống cấy hơn 1g chất chứa của hộp. Để trong tủ ấm 37°C trong 2-5 ngày, nếu sự sinh trưởng của vi khuẩn không xuất hiện sớm hơn.

Khi vi khuẩn đã mọc, nhận định tính chất mọc của canh khuẩn, làm đồ phiến, nhuộm gram và soi kính hiển vi.

Tiến hành phân lập vi khuẩn trên môi trường tăng sinh, môi trường chọn lọc đối với vi khuẩn đường ruột, phổ thương hàn hoặc các môi trường phân lập vi khuẩn hiếu khí khác.

+ *Xét nghiệm vi khuẩn yếm khí*

Song song với việc nuôi cấy phân lập vi khuẩn hiếu khí, người ta tiến hành xét nghiệm vi khuẩn kỵ khí bằng cách lấy nguyên liệu vào 2 ống nước thịt gan yếm khí hoặc môi trường Tarofí (nước thịt pepton có cục gan), có lớp dầu parafin ở trên mặt. Trước khi cấy đem môi trường đun cách thủy 100°C trong 30 phút để làm thoát ôxy rồi làm nguội nhanh dưới vòi nước chảy hoặc để tủ lạnh đến 45°C , sau cùng nhỏ lên mặt ống môi trường 1-2ml dầu parafin vô khuẩn.

Cấy bằng ống thủy tinh to vào mỗi ống ít nhất 5g chất chứa trong hộp thịt, cả chất lỏng lẫn chất đặc, chú ý đừng để lọt khí ở ống cấy vào trong môi trường.

Để vào tủ ấm 37°C trong 3 đến 10 ngày, nếu sự sinh trưởng của vi khuẩn không xuất hiện sớm hơn, nhận định tính chất mọc của canh khuẩn.

Khi vi khuẩn đã phát triển làm đục môi trường thì dùng ống hút Paxto hút bỏ hết lớp dầu parafin trên mặt ra, tiến hành làm đồ phiến nhuộm gram, soi kính hiển vi. Nhận định về hình thái của vi khuẩn, hai đầu tròn hoặc vuông, hình thái và vị trí của nha bào, vi khuẩn có giáp mô hay không.

Phân lập vi khuẩn yếm khí bằng cách cấy truyền canh khuẩn sang 10-12 ống thạch V.F.

+ *Giám định Clostridium botulinum*

Độc tố của bệnh độc thịt rất nguy hiểm, một số típ gây chết ở liều rất nhỏ cho người ăn phải, vì thế tiếp xúc phải hết sức cẩn thận khi trực tiếp với mẫu vật phẩm nghi

ngờ. Khi phải sử dụng đến mẫu thực phẩm, canh khuẩn hoặc canh lọc *Clostridium botulinum* thì chú ý không bao giờ được hút ống hút bằng mồm. Nên nhớ rằng độc tố độc thịt có thể hấp thụ qua kết mạc mắt hoặc qua vết thương ở da.

Lấy chất lỏng trong hộp thịt ra bôi kính, nhuộm gram và soi kính hiển vi. Nếu là thịt đặc thì pha loãng với nước sinh lý rồi bôi kính. Trục khuẩn độc thịt gram dương, hình gậy to có kích thước $0,9-1 \times 4-8 \mu$ hai đầu tròn, có nha bào hình bầu dục ở một đầu tế bào vi khuẩn hình quần vợt.

Nếu canh khuẩn nước thịt gan yếm khí cấy thịt có vi khuẩn hình thái như thế thì tiếp tục cấy vào thạch máu và phân lập khuẩn lạc trong 10-12 ống thạch đứng V.F (trước khi cấy đun chảy ống thạch V.F 100°C trong 30 phút để giải thoát oxy và ủ cách thủy $40-45^{\circ}\text{B}$, rồi mới cấy bằng ống hút Paxto liên tục từ ống thứ nhất đến ống cuối cùng). Để trong tủ ấm 37°C từ 2 đến 4 ngày.

Nếu có khuẩn lạc thuần nhất thì cấy sang môi trường thịt gan yếm khí, nước thịt V.F và xác định các đặc tính sinh hóa học.

Kiểm tra di động bằng một ống hút Paxto đầu kéo thật nhỏ như kim khâu hút canh khuẩn trong nước thịt gan yếm khí. Hàn đầu ống hút lại, rồi hàn đoạn trên của đầu để bẻ rời đầu khỏi ống hút. Đặt trên phiến kính, gắn parafin lại cho dính vào phiến kính rồi xem kính hiển vi bằng vật kính khô có bội số nhỏ, xem vi khuẩn có di động không (*Cl. botulinum* di động).

Quan sát khuẩn lạc trong thạch máu. Trên thạch máu khô *Cl. botulinum* phát triển những khuẩn lạc hờ dung huyết, nhỏ bằng phẳng, rìa hơi không đều, bóng và trong suốt.

Các típ của *Cl. botulinum* lên men đường không đều. Nhóm A-B lên men, sinh axit và hơi các đường gluco, manto, levulo, salixin, izodunxit, nhóm C lên men sinh axit gluco, manto, galacto, levulo nhưng không lên men lacto, salixin, izodunxit, dunxit. Để phát hiện độc tố trong thức ăn và trong canh khuẩn, tiêm vào phúc mạc hai chuột bạch 0,1-0,5 ml hoặc chuột lang 0,5-2ml nguyên liệu lấy từ hộp thịt ra đã lọc hoặc ly tâm (sau khi đã cho thêm một ít nước sinh lý, nhất là đối với nguyên liệu đặc) và tiêm cho 1 hoặc hai chuột đối chứng một lượng tương đương nguyên liệu đã đun sôi. Nếu động vật được tiêm nguyên liệu đun sôi sống, trái lại động vật được tiêm mẫu vật phẩm không đun chết, người ta tiếp tục làm phản ứng trung hòa, dùng kháng độc tố độc thịt thuộc các típ A, B và E thường gặp trúng độc cho người, người ta tiêm cho một lô chuột bạch hoặc chuột lang hỗn hợp kháng độc tố các típ với nguyên liệu thức ăn pha chế như trên. Dùng ống tiêm hút liều nguyên liệu thức ăn và 0,2 ml kháng độc tố, trộn đều, để ở nhiệt độ phòng thí nghiệm trong 20 phút để trung hòa hoàn toàn trước khi tiêm vào phúc mạc chuột. Phản ứng trung hòa cho phép định típ *Cl. botulinum*. Nếu độc tố có hoạt tính cao thì động vật thí nghiệm chết rất nhanh chỉ vài giờ sau khi có triệu chứng thở hổn hển, bụng co bóp lại

liệt chân. Một độc tố yếu chỉ gây triệu chứng nhẽo cơ bụng kèm theo bước đi lê lết. Trong trường hợp này động vật có thể sống trong 3 đến 4 ngày, hoặc lâu hơn: cũng có khi động vật ốm rõ ràng có thể khỏi. Để phát hiện độc tố độc thịt trong canh khuẩn nuôi cấy, người ta dùng canh khuẩn nước thịt gan yếm khí có 1% dextro để cho sự sinh trưởng của vi khuẩn yếm khí thuận lợi hơn và kích thích sự sản sinh độc tố. Nuôi ở tủ ấm 37°C từ 4 đến 6 ngày, ly tâm canh khuẩn rồi lấy nước nổi tiêm cho chuột bạch hoặc chuột lang theo phương pháp và liều lượng như khi dùng nguyên liệu thức ăn. Nếu động vật chết thì tiếp tục định tít vi khuẩn bằng cách dùng những kháng độc tố đặc hiệu, như đã nói ở phần trên.

Còn có thể tiến hành phản ứng ngưng kết trong ống nghiệm với giống vi khuẩn đã phân lập trong nước thịt yếm khí 1-2 ngày. Pha loãng kháng huyết thanh trong các ống ngưng kết với tỷ lệ từ đậm độ 1 : 100, 1 : 200, 1 : 400 đến 1 : 6.400. Trong mỗi ống có 0,5 ml huyết thanh loãng. Bố trí thêm một ống đối chứng kháng nguyên đựng 0,5 ml nước sinh lý. Dùng ống hút Paxto cho vào mỗi ống 4-5 giọt canh khuẩn, kể cả ống đối chứng kháng nguyên. Lắc nhẹ các ống nghiệm và để vào tủ ấm 37°C trong 2 giờ. Sau đó đọc kết quả và để ở nhiệt độ phòng thí nghiệm trong 24 giờ. Phản ứng dương tính nếu có tính chất ngưng kết dưới dạng bột nhỏ đóng vẩn ở dưới đáy ống nước ở trên trong, phản ứng âm tính nếu các ống nghiệm vẩn đục đều, như ống đối chứng kháng nguyên.

*** Xét nghiệm vi khuẩn học lập xương, xúc xích dăm bông**

Việc xét nghiệm vi khuẩn học chế phẩm thịt sống (chủ yếu là thịt lợn sống băm và ướp muối), bao gồm việc kiểm tra hình thái trực tiếp bằng kính hiển vi, việc rĩa cấy trên thạch đĩa để đếm vi khuẩn hiếu khí, trên thạch máu để phát hiện vi khuẩn dùng huyết và những vi khuẩn gây ngộ độc thức ăn, việc xét nghiệm tìm *Salmonella* về xét nghiệm tìm *Costridium*.

- *Xác định số lượng vi khuẩn hiếu khí, trực khuẩn đường ruột và vi khuẩn dung huyết.*

Đốt bề mặt của lập xương, xúc xích bằng đầu dao hoặc thìa đã đốt nóng. Dùng kéo vô khuẩn cắt mẫu vật phẩm lấy 2g. Dem nghiền nát trong cối với 18 ml nước sinh lý, thành huyền dịch 1/10, rồi đem pha loãng trong những ống đựng 9ml nước sinh lý. Dùng hai dây song song hộp lồng Petri, cho vào hộp lồng huyền dịch pha loãng ở độ khác nhau, rồi đổ môi trường thạch đã đun nóng 50-60°C lên trên, môi trường này là thạch nước thịt pepton cho dây đĩa thứ nhất và thạch máu 5% cho dây đĩa thứ hai. Sau khi thạch đã cứng, cho những đĩa thạch thường vào tủ ẩm 30°C trong 3 ngày và những đĩa thạch máu để ở tủ ẩm 37°C trong 1 ngày. Sau đó đếm số khuẩn lạc phát triển trên thạch đĩa thường bằng một máy đếm khuẩn lạc, kết quả chỉ tổng số vi khuẩn hiếu khí trong một gam. Trong đĩa thạch máu, người ta đếm số lượng khuẩn lạc dung huyết (bao gồm liên cầu khuẩn dung huyết, tụ cầu khuẩn và *Bacillus cereus*) và đếm khuẩn lạc của vi cầu khuẩn và liên cầu khuẩn không dung huyết, chỉ gây dung huyết

nhẹ hoặc làm cho hồng cầu có màu lục nhạt (cầu khuẩn ruột và liên cầu khuẩn thuộc nhóm viridans). Ghi chép những số liệu cho từng nhóm vi sinh vật. Chú ý đặc biệt đến những loài vi khuẩn gây ngộ độc thức ăn như tụ cầu khuẩn dung huyết *B. cereus* và cầu khuẩn ruột. Việc kiểm tra đưa đến sự phân tích số lượng và chất lượng của hệ vi khuẩn môi trường thạch máu có tác dụng đặc biệt trong mục đích này. Ngoài những nhóm và loài vi khuẩn nói trên, người ta có thể giám định nhóm *Bacillus* và những vi khuẩn hình gậy ngắn gram âm (như vi khuẩn dạng *E. Coli*, *Proteus*, *Pseudomonas* và những vi khuẩn khác), căn cứ vào những đặc tính củ khuẩn lạc trên môi trường nuôi cấy, hoặc trên thạch thường, hoặc trên thạch máu. Người ta có thể cấy 0,1 ml huyền dịch pha loãng trên thạch Endo bằng cách dùng cào thuỷ tinh hay kim khí để san đều trên mặt thạch để tìm khuẩn lạc trực khuẩn đường ruột.

Xác định số lượng chung của vi khuẩn trong lap xương là phương pháp bổ sung của việc xác định độ tươi của lap xương. Trong 1g lap xương có trên 1,5 triệu vi khuẩn chứng tỏ lap xương đã bị hỏng.

- *Xét nghiệm vi khuẩn thương hàn, phó thương hàn và các loài vi khuẩn đường ruột khác.*

Cấy huyền dịch lap xương chế như trên (để xác định số lượng chung của vi khuẩn) vào môi trường tăng sinh Miele Kofman có tetrathionat, rồi rĩa cấy trên môi trường thạch phân lập vi khuẩn đường ruột. Tiếp tục xét nghiệm như phương pháp nuôi cấy phân lập và giám định vi khuẩn đường ruột ở thịt.

Để phát hiện vi khuẩn *Proteus vulgaris* người ta cấy những mảnh nhỏ thịt băm lấy từ rìa và giữa lạp xương vào nước ngưng tụ của ống thạch nghiêng.

Để giám định vi khuẩn yếm khí *Clostridium* cần tiến hành như trong trường hợp xét nghiệm đồ hộp.

Sau khi kiểm tra bằng kính hiển vi (hoặc bằng một phương pháp khác) đưa đến nghi vấn có *Clostridium* trong lạp xương với số lượng quan trọng. Việc xét nghiệm này cho phép không những phát hiện *Clostridium* mà còn cho phép ước lượng số lượng vi khuẩn. Nhưng kỹ thuật đếm số lượng vi khuẩn yếm khí có một số khó khăn vì những phương pháp nuôi cấy yếm khí, thông thường không đặc hiệu cho vi khuẩn yếm khí. Những điều kiện nuôi cấy yếm khí thật nghiêm khắc cũng không thể ngăn trở một số giống vi khuẩn, yếm khí tuy tiện phát triển bên cạnh những vi khuẩn yếm khí bắt buộc. Nếu nguyên liệu xét nghiệm chứa cả hai loại vi khuẩn hiếu khí và yếm khí, như trong trường hợp phổ biến, những canh khuẩn cấy đầu tiên chứa hỗn hợp vi sinh vật yếm khí và không yếm khí, sự đun nóng có thể tiêu diệt hết tất cả những tế bào dinh dưỡng vi khuẩn bình thường và chỉ để tồn tại nha bào, của một số loài vi khuẩn hiếu khí có khả năng sinh nha bào như *Clostridium*. Nhưng người ta đã chứng minh rằng có nhiều sản phẩm tự nhiên chứa nhiều tế bào dinh dưỡng của *Clostridium* hơn là nha bào; như thế nếu chỉ đơn giản đếm số bào tử trong một canh khuẩn đun nóng thì có thể có những kết quả sai. Vì không có những phương pháp chọn lọc đặc biệt để nuôi

cấy vi khuẩn yếm khí, nên không tránh khỏi việc phải dùng những kỹ thuật nuôi cấy làm phát triển những vi khuẩn khác bên cạnh vi khuẩn yếm khí, mặc dù phải ước tính mật độ của những vi khuẩn này theo một số phản ứng đặc biệt của những canh khuẩn dương tính. Môi trường Kroxlai (Crosiley), đáp ứng những yêu cầu này hơn những môi trường khác. Vi khuẩn loại *Clostridium* nuôi cấy trên môi trường sữa có xích bromcrezon gây những biến đổi đặc trưng cho nên trong hầu hết các trường hợp, người ta có thể khẳng định không sai rằng canh khuẩn chứa hoặc không chứa vi khuẩn yếm khí, hơn nữa những phản ứng khác nhau cho phép phân biệt loại yếm khí dung giải protein với loại yếm khí dung giải xacaro. Ngược lại, môi trường Kroxlai có 1 điểm không lợi là liên cầu khuẩn sản sinh axit, có thể mọc nhanh hơn *Clostridium* nếu những vi khuẩn này có ít và nếu chúng axit hóa môi trường sữa thì có thể ngăn trở sự sinh sản của những vi khuẩn nói trên. Vì thế nên dùng thêm cùng một lúc *môi trường của Von Hibler* gồm nước óc có nhiều chất đậm, rất tốt cho sự nuôi cấy yếm khí, nhưng *Clostridium* phát triển trên môi trường này không cho những phản ứng điển hình dễ phân biệt, chỉ thấy một số loài vi khuẩn dung giải protein sinh sunfua hidro làm đen môi trường và sản sinh mùi thối. Có thể xác định sự có mặt của *Clostridium* trong canh khuẩn nghi ngờ bằng cách soi đồ phiến canh khuẩn ở buồng ướt trong kính hiển vi.

Người ta dùng hai dãy ống, dãy thứ nhất dựng môi trường Kroxlai (sữa, cá, thêm xích Bromocrezon và

xanh bromothimola) dãy thứ hai dựng môi trường nước óc của Von Hibler, mỗi ống cấy 1ml huyền dịch pha loãng từ 10^{-1} đến 10^{-6} hay hơn, dùng để cấy trên thạch thường và thạch máu. Trước khi dùng, cần thải trừ ôxy có trong ống môi trường Kroxlai bằng cách đun sôi và để nguội. Để các ống môi trường vào tủ ấm 37°C ít nhất 72 giờ.

Cách chế môi trường của Von Hibler

Cắt óc ngựa hoặc óc bò thành miếng nhỏ rồi trộn với một dung tích nước bằng lượng óc, đem đun bằng hơi nước trong 30 phút. Phân bố hỗn dịch trong ống vô khuẩn đến vài phân cách nút và ngăn cách với không khí bên trên bằng 1ml dầu parafin. Hấp uest ở nồi chưng 115°C trong 30 phút, 2 lần cách nhau 24 giờ.

Sau đó đọc kết quả trong ống môi trường Kroxlai: những biến đổi do sự phát triển của vi khuẩn gây ra (như sự lên men lactoza, sự sản sinh hơi, sự đông vón và pepton hóa sữa, phát hiện một số đặc tính sinh hóa chủ yếu của vi khuẩn) cho phép chẩn đoán sơ bộ. Để khẳng định, cần rĩa cấy canh khuẩn dương tính trong ống nghiệm trên thạch đĩa và quan sát canh khuẩn thuần khiết trên môi trường mới này.

+ Phản ứng của các vi khuẩn yếm khí

Phản ứng trung hòa hoặc kiềm (màu tím), có hơi, hình thành một chất đông vón mềm, đi đôi với sự hòa tan nhanh chóng của casein, hình thành một chất dịch màu nâu nhạt: cần màu sẫm, mùi thối; những đặc trưng này phát hiện sự có mặt của *Clostridium putrificum*, *Cl sporogenes*, *Cl flaeelliferum*, *Cl oedematiens*, *Cl listohyticum*.

Chất đông vón mềm sau 2-3 ngày: pH không thay đổi, sản sinh hơi yếu, sau cùng pepton hóa hoàn toàn đi đôi với phản ứng kiềm; không có mùi thối: những đặc điểm này phát hiện sự có mặt của *Cl centrosporogenes*.

Hơi axit (màu vàng nhạt), chất đông vón mềm, có hơi, có khi hoàn nguyên chất chỉ thị: những đặc điểm này phát hiện sự có mặt của *Cl sphenoides*.

Axit (màu vàng sẫm), chất đông vón cứng, có hơi; khi hoàn nguyên chất chỉ thị: những đặc điểm này phát hiện sự có mặt của *Cl butylicum*.

Axit và hơi (lên men dữ dội): những đặc điểm này phát hiện sự có mặt của *Cl perfringens*. Hơi ít hơn và trạng thái đục của sữa mất kem phát hiện sự có mặt của *Cl tertium*.

+ Phản ứng của một số loài vi khuẩn hiếu khí

Phản ứng kiềm; pepton hóa không hoàn toàn bắt đầu từ bề mặt và lan dần đến bề sâu; không có hơi; không có mùi thối và màu đen; những đặc điểm này phát hiện sự có mặt của *B. subtilis*, *B. vulgaris*.

Chất đông vón axit, không có hơi, có khi có phản ứng axit nhưng không có chất đông vón, có thể pepton hóa: những đặc điểm này phát hiện sự có mặt của *B. cereus*, *B. coagulans*, *B. silvoticus*; vi khuẩn sản sinh axit lactic (liên cầu khuẩn, trực khuẩn lactic). Xét nghiệm *Closridium botulinum* cũng giống như trường hợp xét nghiệm vi khuẩn trong đồ hộp.

+ Quan hệ giữa số lượng vi khuẩn và điều kiện vệ sinh sản xuất. Những chế phẩm thịt sống thường chứa

những số lượng rất lớn vi khuẩn. Như thế không nhất thiết là do điều kiện vệ sinh sản xuất xấu, vì thịt dùng để sản xuất những chế phẩm này thường được bảo quản trong một thời gian trong lạnh trước khi đem dùng. Chính trong thời gian này hệ vi sinh vật sinh sản nhiều. Khi đem dùng thịt này nhiễm khuẩn nặng trên bề mặt nhưng vẫn tươi để chế biến, thịt của xúc xích lập xường và nhồi đã chế biến chứa rất nhiều vi khuẩn. Nói một cách khác, việc sử dụng những nguyên liệu có mật độ vi khuẩn cao đưa đến việc sản xuất những chế phẩm có hệ vi sinh vật phong phú nếu quá trình chế biến không bao gồm một giai đoạn tiêu diệt vi sinh vật (ví dụ: bằng cách đun nấu). Hơn nữa, việc sờ mó để chế biến những thịt này cũng như máy móc và dụng cụ sản xuất làm nhiễm khuẩn nhanh chóng và trầm trọng. Do đó cần áp dụng những biện pháp vệ sinh thật chặt chẽ.

Nồng độ muối trong nước là yếu tố quyết định hoạt động của vi sinh vật.

Nếu tỷ lệ này cao (nghĩa là bằng hoặc cao hơn 20%) thì vi khuẩn ít có khả năng sinh sản (mặc dù vẫn sống) chúng không hoạt động và giảm số lượng trong quá trình bảo quản. Nếu tỷ lệ giữa muối và nước ở giữa 10 và 20 thì một số vi sinh vật có sức đề kháng cao đối với muối có thể phát triển. Thường những vi khuẩn này không tác động đến protein và những thành phần cấu tạo khác của thịt, (đặc biệt sự hoạt động của enzym phân giải protein bị những nồng độ muối và những hóa chất dùng để ướp muối khác ức chế). Trong những phương pháp ướp muối ở nồng độ thấp nên tỷ lệ muối

nước thấp hơn 10, thì một số lớn các loài vi sinh vật có thể vẫn phát triển, kể cả vi cầu khuẩn, cầu khuẩn ruột. (*Achromobacter*, *Proteus* và *Pseudomonas*). Khi tỷ lệ này dưới 5-6 thì người ta đã tìm thấy *Clostridium*, đồng thời sự hoạt động enzym bị ức chế hơn; sự tiến triển và tốc độ của quá trình phân giải gần giống những điều kiện gặp trong những chế phẩm thịt không muối. Do đó, việc đếm số lượng vi khuẩn có thể rất có ích cho việc đánh giá trạng thái tươi và khả năng bảo quản thịt muối ở nồng độ thấp.

*** Xét nghiệm vi khuẩn học những chế phẩm bằng thịt băm nhỏ được xử lý bằng nhiệt độ thấp** (nấu chín hoặc rán)

Loại chế phẩm thịt này gồm những sản phẩm không được Paxto hóa (như pate gan nhồi đun chín trong gia đình...) bao gói không kín, chế phẩm thịt lợn đóng hộp ướp muối và đun ở nhiệt độ thấp. Hệ vi sinh vật còn tồn tại gồm có những vi sinh vật gram dương kháng nhiệt, hình thành nha bào hoặc không, những vi sinh vật gram âm không chịu nóng (như vi khuẩn nhóm *Escherichia* - *Aerobacter*) không còn tồn tại nếu chế phẩm không bị nhiễm khuẩn một lần nữa sau khi đun nấu. Tình trạng vi sinh vật học của loại sản phẩm này gần giống tình trạng của sữa paxto hóa. Do đó những nguyên tắc xét nghiệm vi khuẩn học cũng gần giống nhau. Những chế phẩm thịt này được xử lý ở những nhiệt độ cao hơn và trong một thời gian dài hơn sữa trong quá trình paxto hóa: nhưng thịt dẫn nhiệt kém, do đó tác dụng thực tế không cao hơn. Thời hạn sử dụng

những sản phẩm này dĩ nhiên rất hạn chế và thay đổi tùy theo nhiệt độ bảo quản. Nhiều yếu tố khác có ảnh hưởng đến thời hạn bảo quản, như cách xử lý (chế phẩm ướp muối hoặc không, hàm lượng muối trong nước) và cách bao gói (bao gói kín hay không).

Công tác xét nghiệm vi khuẩn học những sản phẩm thịt này phải giải quyết một số vấn đề sau đây:

+ Khi đem bán hoặc sau 2 ngày bảo quản ở một nhiệt độ nhất định (18°C), sản phẩm có gây trúng độc thức ăn không?

+ Khi bán, chất lượng vi khuẩn học của sản phẩm có hợp cách không (như những sản phẩm xử lý bằng sức nóng).

+ Khả năng bảo quản của sản phẩm có cho phép giữ sản phẩm trong một thời hạn phải chăng ở những nhiệt độ thích hợp.

Muốn thế người ta tiến hành một xét nghiệm vi khuẩn học kép: xét nghiệm thứ nhất làm ngay tại chỗ, xét nghiệm thứ hai tiến hành sau khi để vào tủ ấm ở 18°C trong 2 ngày. Xét nghiệm ngay tại chỗ vật phẩm gồm có việc ria cấy trên thạch đĩa petri để xác định số lượng vi sinh vật hiếu khí, xét nghiệm vật phẩm đã để tủ ấm bao gồm việc ria cấy trên thạch máu để đếm số lượng vi sinh vật có thể gây ngộ độc thức ăn (tụ cầu khuẩn dung huyết, *B. cereus* cầu khuẩn ruột) và vi khuẩn dạng Coli để phát hiện Clostridium.

MỤC LỤC

	Trang
<i>Lời nói đầu</i>	5
Phần I. VI SINH VẬT TRONG CHĂN NUÔI	7
I. Vi sinh vật trong thực vật và chế biến thức ăn gia súc	7
II. Vi sinh vật ở đường tiêu hóa của động vật và việc phòng bệnh	40
Phần II. VI SINH VẬT TRONG CÁC SẢN PHẨM CHĂN NUÔI	47
I. Vi sinh vật trong sữa và phương pháp bảo quản	47
II. Vi sinh vật trong thịt và cách bảo quản	70
III. Vi sinh vật của da và cách bảo quản	89
Phụ lục: PHƯƠNG PHÁP KIỂM TRA VI KHUẨN TRONG THỊT	97

ỨNG DỤNG CÔNG NGHỆ TRONG CHĂN NUÔI GIA SÚC VÀ BẢO QUẢN SẢN PHẨM

NHÀ XUẤT BẢN LAO ĐỘNG - 175 GIẢNG VÕ - HÀ NỘI
ĐT: 7366522 - 8515380 - 8439543

Chịu trách nhiệm xuất bản:

PHAN ĐÀO NGUYỄN

Chịu trách nhiệm bản thảo:

TRẦN DŨNG

Biên tập:

LÊ THỊ NHƯỜNG

Vẽ bìa:

TRƯỜNG GIANG

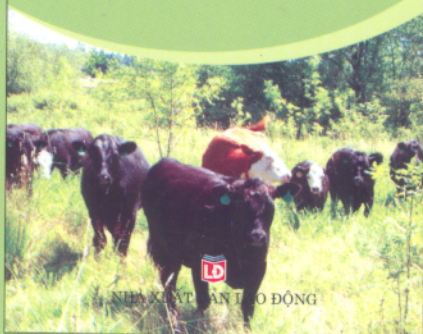
Sửa bản in:

NGỌC ANH

In 3000 cuốn, khổ 13 x 19 cm, tại Công ty Hữu Nghị.
Giấy phép xuất bản số: 70 - 2006/CXB/49 - 03/LĐ.
Cấp ngày 08 tháng 03 năm 2006.
In xong và nộp lưu chiểu Quý II năm 2006

TỦ SÁCH KHUYẾN NÔNG PHỤC VỤ NGƯỜI LAO ĐỘNG

Ứng dụng công nghệ trong chăn nuôi gia súc và bảo quản sản phẩm



NIÊN XIÁT AN T. O ĐỘNG

ứng dụng công nghệ trong



1

006042

000199

14.000 VNĐ

GIÁ: 14.000