

PGS.TS. NGUYỄN XUÂN THÀNH (Chủ biên)
NGUYỄN ĐƯỜNG - HOÀNG HẢI - VŨ THỊ HOÀN

Giáo trình **SINH HỌC** **ĐẤT**



NHÀ XUẤT BẢN GIÁO DỤC

PGS. TS. NGUYỄN XUÂN THÀNH (*Chủ biên*)
NGUYỄN ĐƯỜNG – HOÀNG HẢI – VŨ THỊ HOÀN

GIÁO TRÌNH **SINH HỌC ĐẤT**

(Dùng cho sinh viên Cao đẳng, Đại học chuyên ngành
Sinh học, Công nghệ Sinh học, Nông – Lâm – Ngư nghiệp)

NHÀ XUẤT BẢN GIÁO DỤC

Bản quyền thuộc HEVOBCO – Nhà xuất bản Giáo dục

17 – 2007/CXB/94 – 2217/GD

Mã số: 7K704M7 – DAI

LỜI NÓI ĐẦU

Sinh vật trong đất rất phong phú, đa dạng. Chúng có mối quan hệ mật thiết với nhau và có vai trò to lớn trong việc cải tạo đất trồng trọt. Nếu biết được hệ sinh vật đất có thể đánh giá được tính chất cơ bản của đất và quá trình sinh trưởng, phát triển của cây trồng.

Hoạt động của hệ sinh vật này đã làm cho đất thành một thể sống, việc nghiên cứu chúng có tác dụng rất quan trọng đối với sản xuất nông nghiệp.

Giáo trình Sinh học đất được biên soạn nhằm trang bị cho sinh viên Nông nghiệp nói chung, đặc biệt là sinh viên các ngành Cây trồng, Khoa học đất, Nông hoá thổ nhưỡng, Bảo vệ thực vật, Dâu tằm, Làm vườn, Thuỷ nông, Cải tạo đất, Canh tác, Lâm nghiệp, Nuôi trồng thuỷ hải sản,... có những kiến thức cần thiết về hoạt động sống của hệ sinh vật trong đất.

Trong quá trình biên soạn giáo trình này, chúng tôi đã cố gắng biên soạn ngắn gọn, tập trung giải quyết những vấn đề cơ bản nhất của môn học Sinh học đất, có những kết quả nghiên cứu khá công phu của các nhà khoa học để làm minh chứng, với hy vọng giúp cho công tác giảng dạy và nghiên cứu khoa học trong lĩnh vực chuyên ngành Nông – Lâm – Ngư được hiệu quả hơn.

Chúng tôi cũng đã nhận được sự giúp đỡ, góp ý của nhiều nhà khoa học ở các trường đại học, đặc biệt trong khối Nông – Lâm – Ngư. Đây là vấn đề mới và phức tạp, nên trong biên soạn chắc chắn không tránh khỏi thiếu sót. Chúng tôi mong tiếp tục nhận được nhiều ý kiến đóng góp của các nhà khoa học, các bạn đồng nghiệp và sinh viên để chất lượng giáo trình ngày càng tốt hơn.

Xin chân thành cảm ơn.

TẬP THỂ TÁC GIẢ

MỤC LỤC

Chương I

SINH HỌC ĐẤT VÀ CÁC NHÓM SINH VẬT CHÍNH THƯỜNG GẶP TRONG ĐẤT

I– Sinh học đất	11
1.1. Khái niệm	11
1.2. Nội dung của môn học	12
II– Các nhóm sinh vật chính thường gặp trong đất	13
2.1. Vi sinh vật đất	13
2.2. Động vật nguyên sinh (Nguyên sinh động vật đất)	29
2.3. Động vật đất	33

Chương II

SINH VẬT ĐẤT TRONG QUÁ TRÌNH HÌNH THÀNH MÙN VÀ KẾT CẤU ĐẤT

I– Quá trình hình thành mùn nhờ sinh vật đất	39
1.1. Thành phần hữu cơ trong đất	39
1.2. Quan điểm về quá trình hình thành mùn	40
II– Sự biến đổi của khu hệ sinh vật đất trong quá trình phân giải chất hữu cơ và hình thành chất mùn	42
2.1. Những nghiên cứu về mùn	42
2.2. Điều kiện tích lũy mùn trong đất	44
2.3. Sơ đồ hình thành mùn của Kononopva dưới tác dụng của sinh vật đất	45
III– Tác dụng của sinh vật đất trong quá trình cấu tạo mùn	45
3.1. Các giả thuyết về mùn	45
3.2. Vi sinh vật trong quá trình hình thành mùn	48
3.3. Xenlulo trong quá trình hình thành mùn	49
3.4. Hemixenlulo trong quá trình hình thành mùn	51

3.5. Lignhin trong quá trình hình thành mùn	52
IV- Tác dụng vi sinh vật trong kết cấu đất	55
V- Vi sinh vật trong quá trình phân giải chất mùn	56
VI- Động vật đất trong quá trình phân giải các chất và kết cấu đất	57
6.1. Các nhóm động vật đất và quá trình tạo đất	57
6.2. Quá trình phân huỷ xác hữu cơ do các nguyên sinh động vật và động vật đất	59
6.3. Động vật đất tham gia vào các quá trình khoáng hoá và mùn hoá ..	64
6.4. Động vật đất trong chu trình luân chuyển vật chất trong đất	66

Chương III

ENZYM TRONG ĐẤT VÀ SỰ SẢN SINH RA ENZYM TRONG ĐẤT

I- Enzym từ sinh vật đất	68
II- Enzym từ hệ cây trồng	71
III- Trạng thái enzym đất	72

Chương IV

VI SINH VẬT ĐẤT TRONG QUÁ TRÌNH PHÂN HUỖ, CHUYỂN HOÁ CÁC HỢP CHẤT CACBON TRONG ĐẤT

I- Vòng tuần hoàn cacbon trong tự nhiên	75
II- Quá trình phân huỷ chuyển hoá xenlulo	76
2.1. Khái niệm về xenlulo	76
2.2. Cơ chế của quá trình phân giải xenlulo	77
2.3. Vi sinh vật phân giải xenlulo trong đất	78
2.4. Điều kiện ngoại cảnh ảnh hưởng đến quá trình phân giải xenlulo ..	80
III- Quá trình phân huỷ chuyển hoá hemixenlulo	82
3.1. Chất hemixenlulo	82
3.2. Nhân tố ngoại cảnh ảnh hưởng đến quá trình phân giải hemixenlulo	84
IV- Quá trình phân huỷ chuyển hoá pectin	84
4.1. Chất pectin	84
4.2. Cơ chế phân giải	84
4.3. Vi sinh vật phân giải pectin	85
4.4. Điều kiện ngoại cảnh ảnh hưởng đến quá trình phân huỷ, chuyển hoá pectin	85
V- Quá trình phân giải tinh bột	86
5.1. Chất tinh bột	86

5.2. Enzym phân giải tinh bột	87
5.3. Vi sinh vật phân giải tinh bột	88
VI- Sự phân giải lignhin (LIGININE)	89
6.1. Công thức lignhin là $C_{18}H_{30}O_{15}$	89
6.2. Cơ chế phân giải lignhin.....	89
6.3. Vi sinh vật phân giải lignhin.....	91
VII- Quá trình lên men	91
7.1. Quá trình lên men Etylic (ethylique)	91
7.2. Lên men lactic	92
7.3. Lên men butyric.....	93
7.4. Lên men propionic.....	95
7.5. Lên men metan	95

Chương V

SINH VẬT ĐẤT TRONG QUÁ TRÌNH PHÂN HUỖ, CHUYỂN HOÁ CÁC HỢP CHẤT VÀ CÁC NGUYÊN TỐ TRONG ĐẤT

I- Tác dụng của sinh vật đất trong quá trình chuyển hoá nitơ	98
1.1. Vòng tuần hoàn nitơ trong tự nhiên	98
1.2. Quá trình cố định nitơ phân tử.....	99
1.3. Quá trình amôn hoá	115
1.4. Quá trình nitrat hoá	120
1.5. Quá trình phản nitrat hoá	122
II- Tác dụng của sinh vật đất trong quá trình chuyển hoá các nguyên tố khác trong đất	123
2.1. Tác dụng của sinh vật đất trong quá trình chuyển hoá lưu huỳnh ..	123
2.2. Quá trình chuyển hoá phospho.....	132
2.3. Quá trình chuyển hoá sắt	137
2.4. Quá trình chuyển hoá kali trong đất.....	139
2.5. Quá trình chuyển hoá mangan	141

Chương VI

ĐỘNG THÁI VÀ SỰ PHÂN BỐ CỦA VI SINH VẬT ĐẤT TRÊN MỘT SỐ LOẠI ĐẤT CHÍNH VIỆT NAM

I- Động thái của vi sinh vật.....	144
1.1. Động thái của vi sinh vật theo ngày, tháng, năm.....	144

1.2. Động thái của vi sinh vật theo nhiệt độ.....	146
1.3. Động thái của vi sinh vật theo mùa trong năm.....	147
1.4. Động thái của vi sinh vật theo độ ẩm.....	147
II- Sự phân bố của vi sinh vật trên các loại đất	148
2.1. Sự phân bố của vi sinh vật trong đất.....	148
2.2. Sự phân bố của vi sinh vật trên các loại đất.....	151

Chương VII

ẢNH HƯỞNG CỦA BIỆN PHÁP CANH TÁC ĐẾN SINH VẬT ĐẤT

I- Mối quan hệ hữu cơ giữa sinh vật đất - đất và cây trồng	166
1.1. Mối quan hệ hữu cơ giữa vi sinh vật đất và đất trồng trọt.....	166
1.2. Mối quan hệ hữu cơ giữa vi sinh vật đất và cây trồng.....	167
1.3. Mối quan hệ hữu cơ giữa đất và cây trồng (bài ca tình cây và đất) .	176
II- Ảnh hưởng của biện pháp canh tác đến sinh vật đất.....	176
2.1. Ảnh hưởng của phương thức làm đất đến vi sinh vật đất.....	179
2.2. Ảnh hưởng của luân canh đến vi sinh vật đất.....	182
2.3. Ảnh hưởng của tưới, tiêu đến hệ sinh vật đất	188
2.4. Ảnh hưởng của phân bón đến hệ sinh vật đất.....	191
2.5. Ảnh hưởng của bón thuốc trừ sâu, trừ cỏ đến vi sinh vật đất.....	195

PHẦN THỰC HÀNH

BÀI SỐ 1. Trang thiết bị cần thiết trong nghiên cứu vi sinh vật	201
I- Máy móc	201
1.1. Tủ nuôi cấy vi sinh vật (Incubator).....	201
1.2. Tủ sấy khô (Drying oven).....	203
1.3. Nồi hấp hơi nước cao áp (Autoclave).....	204
1.4. Tủ lạnh (Freezer).....	206
1.5. Máy ly tâm (Centrifugal machine).....	207
1.6. Những thiết bị cần thiết khác	207
II- Các dụng cụ và thiết bị phòng thí nghiệm.....	207
2.1. Thiết bị quang học	207
2.2. Thiết bị đo lường	208
2.3. Các loại dụng cụ khác	208

III– Kính hiển vi	209
3.1. Bộ phận cơ học.....	209
3.2. Bộ phận quang học.....	210
3.3. Cách sử dụng kính hiển vi.....	212
3.4. Cách bảo quản kính hiển vi.....	213
BÀI SỐ 2. Chuẩn bị dụng cụ và môi trường nuôi cấy vi sinh vật.....	214
I– Chuẩn bị dụng cụ	214
1.1. Các dụng cụ thường được sử dụng trong nghiên cứu vi sinh vật.....	214
1.2. Yêu cầu.....	214
1.3. Cách xử lý dụng cụ trước khi rửa.....	214
1.4. Cách rửa dụng cụ.....	215
1.5. Chuẩn bị dụng cụ để khử trùng.....	216
1.6. Khử trùng các dụng cụ thuỷ tinh.....	217
II– Chuẩn bị các môi trường để nuôi cấy vi sinh vật.....	217
2.1. Các yêu cầu về môi trường nuôi cấy	218
2.2. Cách gọi tên môi trường	218
2.3. Phân loại môi trường.....	218
2.4. Chuẩn bị môi trường.....	221
2.5. Khử trùng môi trường dinh dưỡng.....	223
BÀI SỐ 3. Nuôi cấy vi sinh vật	227
I– Kỹ thuật vô trùng	227
1.1. Vật liệu thí nghiệm	228
1.2. Tiến hành thí nghiệm	228
II– Kỹ phân lập vi sinh vật bằng pha loãng.....	230
2.1. Vật liệu.....	231
2.2. Tiến hành thí nghiệm	231
III– Môi trường chuyên tính	232
3.1. Vật liệu.....	233
3.2. Tiến hành thí nghiệm	233
BÀI SỐ 4. Phương pháp lấy mẫu phân tích vi sinh vật.....	234
I– Nguyên lý.....	234
II– Xác định số lượng mẫu và dụng cụ để lấy mẫu	234
2.1. Xác định số lượng mẫu cần lấy	234
1.2. Các vật liệu cần chuẩn bị để lấy mẫu.....	235
1.3. Mẫu đại diện.....	235

III- Phương pháp lấy mẫu và vận chuyển mẫu.....	235
3.1. Nguyên tắc lấy mẫu	235
3.2. Vận chuyển mẫu	236
3.3. Bảo quản mẫu.....	236
BÀI SỐ 5. Phương pháp phân tích vi sinh vật.....	237
I- Các bước phân tích.....	237
1.1. Dụng cụ phân tích	237
1.2. Chuẩn bị bình nước vô trùng làm dây pha loãng.....	237
1.3. Xác định độ ẩm mẫu cần phân tích.....	238
1.4. Chuẩn bị dây pha loãng.....	238
II- Nuôi cấy.....	239
III- Tính số lượng vi sinh vật.....	239
3.1. Phương pháp thạch bằng (trên môi trường thạch)	239
3.2. Tính số lượng vi sinh vật trong môi trường lỏng (phương pháp định tính)	240
BÀI SỐ 6. Quá trình chuyển hoá nitơ dưới tác dụng của VSV (amôn hoá, phản nitrat hoá, cố định N_2)	242
I- Nguyên lý.....	242
II- Quá trình amôn hoá.....	244
1.1. Vật liệu.....	244
1.2. Tiến hành thí nghiệm	244
III- Quá trình phản nitrat	244
3.1. Vật liệu.....	244
IV- Quá trình cố định nitơ phân tử.....	245
3.1. Vật liệu.....	245
3.2. Tiến hành thí nghiệm	245
BÀI SỐ 7. Chuyển hoá lưu huỳnh dưới tác dụng của vi sinh vật.....	246
I- Nguyên lý chung.....	246
II- Vật liệu.....	247
III- Dịch nuôi cấy	247
IV- Tiến hành thí nghiệm	247
BÀI SỐ 8. Vi sinh vật phân giải lân (phospho).....	249
I- Vi khuẩn phân giải lân hữu cơ	249
1.1. Môi trường phân lập.....	249
1.2. Dụng cụ nguyên liệu	249

1.3. Các bước thực hiện.....	250
1.4. Kiểm tra kết quả.....	250
II– Vi sinh vật phân giải lân vô cơ khó tan	251
2.1. Môi trường.....	251
2.2. Dụng cụ và nguyên liệu.....	251
2.3. Các bước.....	251
2.4. Đánh giá kết quả.....	251
BÀI SỐ 9. Xác định khối vi sinh vật đất.....	253
I– Nguyên lý chung.....	253
II– Xác định sinh khối cacbon của sinh vật đất.....	255
2.1. Nguyên tắc	255
2.1. Vật liệu, hoá chất và thuốc thử.....	255
2.3. Thủ tục tiến hành	256
III– Xác định sinh khối nitơ của sinh vật đất.....	261
3.1. Vật liệu, hoá chất và thuốc thử.....	261
3.2. Tiến hành thí nghiệm	261
3.3. Tính kết quả.....	262
BÀI SỐ 10. Tham quan kiến tập môn học.....	263
PHỤ LỤC	264
TÀI LIỆU THAM KHẢO.....	269

Chương I

SINH HỌC ĐẤT VÀ CÁC NHÓM SINH VẬT CHÍNH THƯỜNG GẶP TRONG ĐẤT

I- SINH HỌC ĐẤT

1.1. KHÁI NIỆM

Trên bề mặt của Trái Đất, phần lục địa được che phủ bởi lớp đất mỏng tơi xốp cùng với các thảm thực vật. Dưới lớp vỏ này là cả một hệ thống khoang, kẽ, hang động chi chít đan xen nhiều vô tận. Ở trong đó là thế giới của sự sống, thế giới đa dạng của sinh vật đất.

Vào Nguyên đại Thái cổ, 2700 – 1900 triệu năm trước đây đã xuất hiện những mầm mống của sự sống dạng siêu vi khuẩn và vi khuẩn, có khả năng oxy hoá các chất hữu cơ đơn giản đầu tiên. Đây cũng là thời điểm xuất hiện vi khuẩn và tảo ở đất. Các dấu tích hoá thạch tìm được đã cung cấp cơ sở để dự đoán rằng, nhóm thực vật hạt trần Psilophyta là nhóm đầu tiên sống ở đất.

Những thực vật và động vật hô hấp nhờ oxy tự do đã chuyển lên sống ở môi trường cạn vào Nguyên đại Cổ sinh, thời kỳ Silur, 420 – 400 triệu năm trước đây. Như vậy, các sinh vật sống trong đó đã có một quá trình lâu dài chiếm lĩnh môi trường sống trong đất.

Vậy sinh vật đất là gì?

– Sinh vật đất là những sinh vật sống trong đất, có thể là sống suốt đời trong đất, hoặc sống tạm thời trong thời gian nhất định trong đất.

– Sinh học đất là một môn khoa học nghiên cứu về những hoạt động sống của các sinh vật sống trong đất.

Những hiểu biết của chúng ta về sự sống trong đất còn hạn chế. Khoa học về Sinh thái đất nghiên cứu các nhóm sinh vật đất, cùng với những hoạt động sống của chúng trong mối quan hệ hữu cơ không tách rời nhau với môi trường sống trong đất đã được hình thành từ những năm đầu của thập kỷ 40 thế kỷ XX. Ngày nay khoa học Sinh thái đất đang phát triển mạnh mẽ.

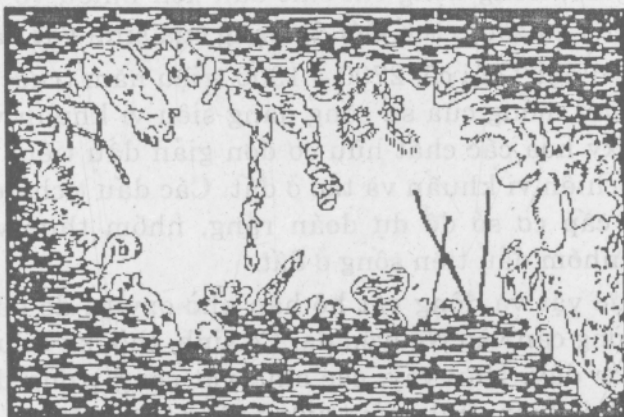
Thế giới sinh vật đất rất đa dạng và phong phú. Chúng gồm những nhóm sinh vật nhìn thấy được và không nhìn thấy được bằng mắt thường.

Nhóm sinh vật nhìn thấy được được xếp vào nhóm động vật đất, đó là giun đất, cuốn chiếu, rết, ấu trùng sâu bọ, nhện đất, ve, bét, sâu bọ bậc thấp không cánh, động vật thân mềm, giáp xác cạn, các lưỡng thể, bò sát, một số thú và động vật gặm nhấm nhỏ khác.

Trong các lớp đất và trong lớp nước ít ỏi giữa các hạt đất là cả một thế giới bí ẩn của trùng roi, trùng chân giả, trùng bào tử, trùng lông bơi. Người ta xếp sinh vật này vào nhóm động vật nguyên sinh (hay nguyên sinh động vật đất).

Ngoài 2 nhóm trên còn có cả một thế giới sôi động của các loài vi sinh vật đất, muốn quan sát được chúng cần phải có sự giúp đỡ của kính hiển vi. Nhóm này được gọi là vi sinh vật đất.

Vi sinh vật đất bao gồm nhiều nhóm khác nhau: Virus, vi khuẩn, xạ khuẩn, nấm, tảo và các nguyên sinh động vật.



Hình 1.1. Hang động, khoang, kẽ trong đất, trong đó là thế giới sinh vật đất.

(Ảnh của W.Duger, 1970. Phóng đại 2000 lần)

1.2. Nội dung của môn học

Chúng ta đã nghiên cứu kỹ về những đặc điểm cơ bản (hình thái, kích thước, sinh lý, sinh hoá, di truyền, cơ chế chuyển hoá), tìm hiểu những quy luật phát sinh, phát triển và tiến hoá của các nhóm vi sinh vật thường gặp trong tự nhiên và trong nông nghiệp trong Giáo trình Vi sinh vật đại cương. Với khuôn khổ của Giáo trình Sinh học đất chúng ta nghiên cứu một số nội dung chính sau:

– Nghiên cứu một số đặc tính cơ bản, cơ chế hoạt động của một số

sinh vật trong đất, tìm hiểu quá trình phát sinh, phát triển và tiến hoá của chúng.

– Nghiên cứu vai trò của các nhóm vi sinh vật chính trong đất (quá trình hình thành và cải tạo đất trồng trọt, quá trình phân huỷ và chuyển hoá các vật chất trong đất nhờ các loài sinh vật đất, nghiên cứu mối quan hệ hữu cơ giữa sinh vật đất, đất và cây trồng).

– Trên cơ sở của những nội dung trên, chúng ta có biện pháp khai thác đầy đủ theo hướng có lợi các loài sinh vật hữu ích và ngăn chặn những tác hại của các loài sinh vật có hại nhằm nâng cao độ phì của đất, tăng năng suất và chất lượng nông phẩm của các loại cây trồng.

II- CÁC NHÓM SINH VẬT CHÍNH THƯỜNG GẶP TRONG ĐẤT

2.1. VI SINH VẬT ĐẤT

2.1.1. Vi khuẩn

2.1.1.1. Đặc điểm

Là những vi sinh vật đơn hoặc đa bào, thuộc nhóm Procaryota (nhân giả), đa số sống hoại sinh, đa số không có tiên mao (flagelum). Kích thước $(0,1 - 1,2) \times (0,2 - 6) \mu m$. Vi khuẩn là một nhóm vi sinh vật có thành phần và số lượng đông nhất, nhiều nhất trong tất cả các nhóm vi sinh vật ở trong đất và cũng là nhóm có ý nghĩa lớn nhất trong quá trình hình thành và phân huỷ, chuyển hoá các chất trong đất.

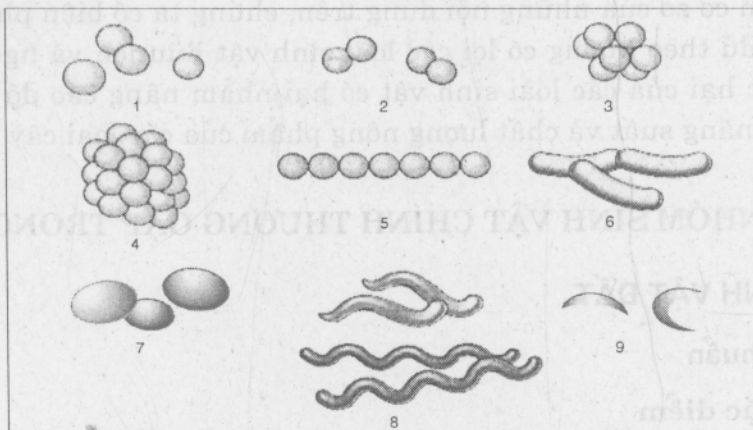
2.1.1.2. Hình thái của vi khuẩn (5 nhóm)

- Hình cầu (cầu khuẩn) – coccus:
 - + Đơn cầu: Đại diện là *Monococcus agilis*.
 - + Song cầu: Đại diện là *Diplococcus pneumonia*.
 - + Tứ cầu: Đại diện là *Tetracoccus homeri*.
 - + Tụ cầu: Đại diện là *Staphylococcus pyogenes*.
 - + Chuỗi cầu: Đại diện là *Streptococcus lactis*.
- Hình que (trực khuẩn) – bacillus:
 - + Trực khuẩn Gram âm không sinh nha bào. Đại diện là *Rhizobium japonicum*, *Bacterium*,...
 - + Trực khuẩn Gram dương không sinh nha bào. Đại diện là *Corynebacterium*,...
 - + Trực khuẩn Gram dương sinh nha bào. Đại diện là *Bacillus thurigensis*, *Clostridium pasteurianum*.

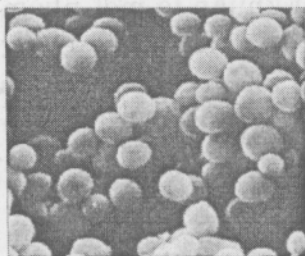
– Cầu trực khuẩn (hình trứng) – cocobacillus. Đại diện là *Pasteurella dentina*.

– Xoắn khuẩn – spirillum. Đại diện là *Treponema dentina*, *Spirillum rubrum*.

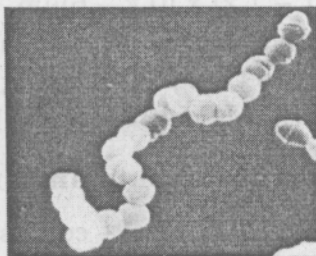
– Phẩy khuẩn – vibrio. Đại diện là *Cellvibrio desulfuricans*, *Vibrio denitrificans*.



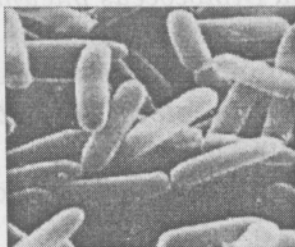
1. Đơn cầu; 2. Song cầu; 3. Bát cầu; 4. Tụ cầu; 5. Chuỗi cầu; 6. Trực khuẩn;
7. Cầu trực khuẩn; 8. Xoắn khuẩn; 9. Phẩy khuẩn.



Đơn cầu



Chuỗi cầu



Trực khuẩn

Hình 1.2. Hình thái vi khuẩn
(Ảnh của WCB.McGraw – Hill. 1998, phóng đại 4500 lần)

Trong Giáo trình *Vi sinh vật đại cương*, chúng ta đã có dịp nghiên cứu về vi khuẩn, cấu tạo tế bào, cơ chế hoạt động của chúng và các loại hình vi sinh vật khác, do đó ở đây chúng ta chỉ tóm tắt một số đặc điểm chính của vi khuẩn trong đất.

2.1.1.3. Những giống vi khuẩn quan trọng thường gặp trong đất

BẢNG 1.1. PHÂN LOẠI THEO HÌNH THÁI VÀ CƠ CHẾ HOẠT ĐỘNG

(Theo Y.Dommergue F.Mangenot – 1970)

Họ	Đặc điểm quan trọng	Giống vi khuẩn sống trong đất
<i>Thiorhodaceae</i>	Sống ở những nơi có H_2S , yếm khí.	<i>Chromatium</i>
<i>Athiorhodaceae</i>	Sống ở những nơi có nhiều chất hữu cơ, yếm khí và yếm khí tùy tiện, có thể quang hợp được.	<i>Rhodospirillum</i> <i>Rhodopseudomonas</i> <i>Rhodominobium</i>
<i>Nitrobacteriaceae</i>	Hình que, hoá năng dinh dưỡng: - Oxy hoá NH_4 thành NO_2^- . - Oxy hoá NO_2^- thành NO_3^- .	<i>Nitrosomonas</i> <i>Nitrobacter</i>
<i>Thiobacteriaceae</i>	Hình que, hoá năng dinh dưỡng, lấy năng lượng từ quá trình oxy hoá S hay hợp chất khử chứa S.	<i>Thiobacillus</i>
<i>Methanomodaceae</i>	Hình que, hoá năng dinh dưỡng, lấy năng lượng từ quá trình oxy hoá: - Hydrogene. - Oxyt cacbon. - Metan.	<i>Hydrogennomonas</i> <i>Carbonydomonas</i> <i>Methanomonas</i>
<i>Caulobacteriaceae</i>	Gram âm, hình que, ở nước, đính vào cơ chất nhờ phần phụ, nổi theo mặt nước (Phần phụ có chứa oxit sắt).	<i>Canlobacter</i> <i>Gallionella</i> <i>Siderocapsa</i>
<i>Siderocapsaceae</i>	Gram âm, hình que, cầu,... Đây là những vi khuẩn chuyển hoá sắt.	<i>Siderocapsa</i> <i>Siderosphaera</i> , <i>Ferribacterium</i> , <i>Ferrobacillus</i> , <i>Siderobacter</i> , <i>Siderococcus</i>
<i>Pseudomonadaceae</i>	Hình que, hảo khí, thường sản sinh các sắc tố tan trong nước hoặc không tan trong nước.	<i>Pseudomonas</i> , <i>Xanthomonas</i> <i>Acetobacter</i> , <i>Azotomonas</i>

<i>Spirillaceae</i>	Hình que xoắn, thường hình thành các dây xoắn: Hảo khí { Hình phẩy, que cong. Phân giải xenlulo. Yếm khí: Que cong, yếm khí, lấy năng lượng trong quá trình mồi oxy hoá một số hợp chất hữu cơ, H_2 với sự khử SO_4 thành H_2S. Tế bào xoắn.	<i>Vibrio</i> <i>Cellvibrio</i> <i>Desulfovibrio</i> <i>Spirillum</i>
<i>Azotobacteriaceae</i>	Gram âm, hảo khí, cố định N_2 .	<i>Azotobacter</i> <i>Beijerinck</i> <i>Derxia</i>
<i>Rhizobacteriaceae</i>	- Những chủng gram âm, hình que. - Cộng sinh (cây họ đậu). - Hoại sinh, yếm khí tùy tiện và sinh ra sắc tố màu tím. - Hoại sinh hay ký sinh, yếm khí tùy tiện, không sinh sắc tố.	<i>Rhizobium</i> <i>Chromobacterium</i> <i>Agrobacter</i>
<i>Achromobacteriaceae</i>	- Hình que, gram âm, lên men hydrat cacbon yếu. - Không sinh sắc tố. - Sản sinh sắc tố vàng hay vàng da cam.	<i>Achromobacter</i> <i>Flavobacterium</i>
<i>Enterobacteriaceae</i>	Hình que, gram âm, hảo khí hay yếm khí tùy tiện, lên men các hydrat cacbon.	<i>Escherichia</i>, <i>Proteus</i> <i>Aerobacter</i>, <i>Serrata</i>
<i>Micrococcaceae</i>	- Hình cầu, gram dương: - Tế bào hợp lại thành bó hình dạng khác nhau, đôi lúc sản sinh sắc tố vàng, vàng cam hay đỏ. - Tế bào hợp lại thành khối do phân bào theo 3 mặt phẳng.	<i>Micrococcus</i> <i>Sarcina</i>
<i>Brevibacteriaceae</i>	Hình que, gram dương, đôi lúc hình cầu hay sợi, thường có sắc tố, hảo khí hay yếm khí tùy tiện.	<i>Brevibacterium</i>
<i>Lactobacteriaceae</i>	- Gram dương, lên men lactic, vi yếm khí đến yếm khí. - Hình cầu thành chuỗi. - Hình que.	<i>Streptococcus</i> <i>Leuconostoc</i> <i>Lactobacillus</i>
<i>Corynebacteriaceae</i>	Gram dương, hình thái thay đổi. Tế bào dài thường sắp xếp thành hàng song song hay hình chữ V, hảo khí, lên men yếu.	<i>Corynebacterium</i> <i>Cellulomonas</i> <i>Arthrobacter</i>
<i>Bacillaceae</i>	- Đây là họ quan trọng hình thành nha bào, que, gram dương. - Hảo khí. - Yếm khí.	<i>Bacillus</i> <i>Chostridium</i>

BẢNG 1.2. PHÂN LOẠI VI KHUẨN THEO KIỂU DINH DƯỠNG QUANG NĂNG
(Theo Y.Dommergue F.Mangenot – 1970)

Năng lượng	Chất cho electron vô cơ Lithotrophes	Chất cho electron hữu cơ Organotrophes
Năng lượng ánh sáng Phototrophes	<i>Photolithotrophes</i> Cây xanh. Tảo. Vi khuẩn <i>Sulfureuses</i> nâu (<i>Thiorhodaceae</i>). Vi khuẩn <i>Sulfureuses</i> xanh (<i>Chlorobacteriaceae</i>). Ví dụ: Phản ứng quang hợp $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow [\text{CH}_2\text{O}] + \text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$ Chất cho electron là H_2O .	<i>Photoorganotrophes</i> . Vi khuẩn nâu không có S ở cơ thể (<i>Thiorhodaceae</i>).
Năng lượng hoá học Chimiotrophes	<i>Chimiolithotrophes</i> Vi khuẩn NO_3^- hoá. Vi khuẩn SO_4^{2-} hoá. Vi khuẩn sắt. Vi khuẩn oxy hoá hydrogen. Ví dụ: Phản ứng NO_3^- hoá. $\text{NH}_4^+ + 3/2\text{O}_2 \rightarrow \text{NO}_3^- + \text{H}_2\text{O} + 2\text{H}^+$ Chất cho electron là NH_4^+ . Chất nhận electron là O_2 .	<i>Chimioorganotrophes</i> Động vật. Thực vật không có chlorophyll. Vi khuẩn dị dưỡng. Phản ứng tổng quát. $\text{DH}_2 + \text{A} \rightarrow \text{D} + \text{AH}_2$. DH_2 và D là những trạng thái ban đầu và sau cùng của chất cho electron hữu cơ. A và AH_2 đều là dạng oxy hoá và khử chất nhận electron.

BẢNG 1.3. VI KHUẨN DINH DƯỠNG HOÁ NĂNG
(Theo Y.Dommergue F.Mangenot – 1970)

Vi khuẩn	Chất cho electron	Chất nhận electron	Phản ứng	Sản phẩm cuối cùng	
				Từ chất cho electron	Từ chất nhận electron
<i>Nitrosomonas</i> sp	NH_4^+	O_2	$\text{NH}_4^+ + 3/2\text{O}_2 \rightarrow \text{NO}_2 + \text{H}_2\text{O} + 2\text{H}^+$	NO_2^-	H_2O
<i>Nitrobacter</i> sp	NO_2^-	O_2	$\text{NO}_2^- + 1/2 \text{O}_2 \rightarrow \text{NO}_3^-$	NO_3^-	H_2O
<i>Thiobacillus thiooxidans</i>	S	O_2	$\text{S} + 3/2 \text{O}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{H}_2\text{SO}_4$	SO_4^{2-}	H_2O
<i>Thiobacillus denitrificans</i>	$\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$	NO_3^-	$5\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 + 8\text{KNO}_3 + 2\text{NaHCO}_3 \rightarrow 6\text{Na}_2\text{SO}_4 + 4\text{K}_2\text{SO}_4 + 4\text{N}_2 + 2\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$	SO_4^{2-}	H_2O
<i>Thiobacillus ferrooxidans</i>	$\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ hoặc Fe^{2+}	O_2	$\text{Fe}^{2+} \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{e}$	SO_4^{2-} hoặc Fe^{3+}	H_2O
<i>Hydrogenomonas</i> sp	H_2	O_2	$\text{H}_2 + 1/2\text{O}_2 \rightarrow \text{H}_2\text{O}$	H_2O	H_2O
<i>Desulfovibrio</i>	H_2	SO_4^{2-}	$\text{SO}_4^{2-} + 4\text{H}_2 \rightarrow \text{S}^0 + 4\text{H}_2\text{O}$	H_2O	H_2S
<i>Denitrificans</i>					

2.1.1.4. Vai trò của vi khuẩn

– Vi khuẩn tham gia hình thành và cải tạo đất trồng trọt, phân huỷ, chuyển hoá các hợp chất khó tan trong đất thành các chất dễ tiêu cung cấp dinh dưỡng cho cây trồng.

– Vi khuẩn có tác dụng rất lớn trong quá trình chuyển hoá các vật chất để khép kín vòng tuần hoàn các chất trong đất và trong tự nhiên. Một số có khả năng đồng hoá nitơ trong không khí để làm giàu nitơ cho đất cung cấp dinh dưỡng nitơ cho cây trồng. Vi khuẩn còn có khả năng tiết ra các enzym, các chất kích thích sinh trưởng, các axit hữu cơ trong đất,...

– Vi khuẩn gây lên nhiều căn bệnh cho người, động vật, thực vật, chúng phá hoại mùa màng và nông sản phẩm trong quá trình bảo quản, chế biến lương thực, thực phẩm.

2.1.2. Xạ khuẩn

2.1.2.1. Đặc điểm của xạ khuẩn

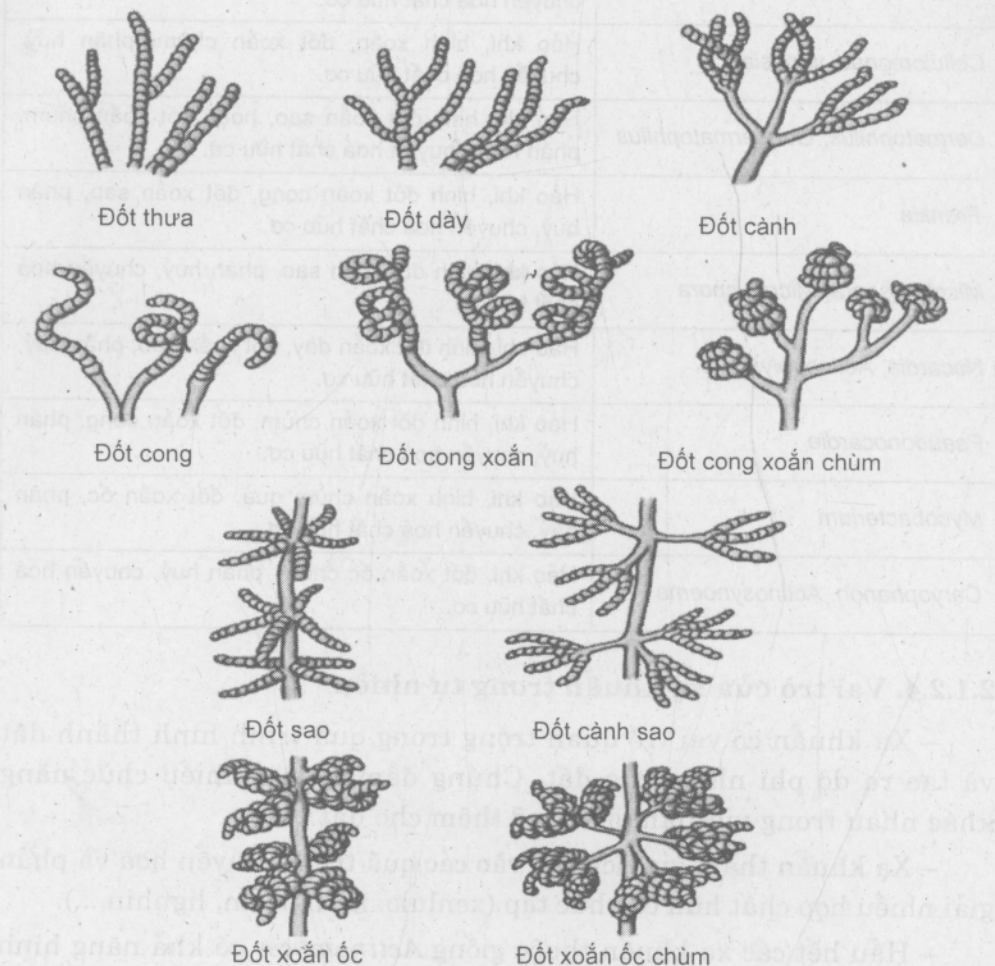
Xạ khuẩn (*Actinomycetes*) là những vi sinh vật đơn bào thuộc nhóm Procaryota (nhân giả), cơ thể hình sợi, người ta còn gọi xạ khuẩn là vi khuẩn – nấm. Chúng phân bố rộng rãi trong đất, trong nước và trong các cơ chất hữu cơ. Kích thước của xạ khuẩn trong khoảng $(0,2 - 0,5) \times (0,4 - 100)\mu\text{m}$.

Xạ khuẩn có vai trò rất lớn trong quá trình phân huỷ, chuyển hoá các chất trong đất và xử lý ô nhiễm môi trường.

Theo bảng phân loại của Bectây. 1984, thì xạ khuẩn gồm 11 họ:

- | | |
|----------------------|----------------------|
| + Actinomycetaceae | + Micromonosporaceae |
| + Caryophanaceae | + Streptomyetaceae |
| + Nocardiaceae | + Celluomonadaceae |
| + Pseudonocardiaceae | + Dermatophilaceae |
| + Mycobacteriaceae | + Frankiaceae |
| + Actinophanaceae | |

2.1.2.2. Hình thái của xạ khuẩn (10 loại hình)



Hình 1.3. Hình thái xạ khuẩn,
(Ảnh của WCB.McGraw – Hill. 1998, phóng đại 3800 lần)

2.1.2.3. Một số giống xạ khuẩn quan trọng trong đất

BẢNG 1.4. GIỐNG XẠ KHUẨN QUAN TRỌNG THƯỜNG GẶP TRONG ĐẤT

Tên giống xạ khuẩn	Những đặc điểm quan trọng
<i>Actinomyces, Bacterionema</i>	Hào khí, hình đốt xoắn cành, phân huỷ, chuyển hoá chất hữu cơ.
<i>Actinoplanes, Amorphosporangium</i>	Hào khí, hình đốt xoắn cành hoặc đốt xoắn cong, phân huỷ chất hữu cơ.

<i>Streptosporangium, Streptomyces</i>	Hảo khí, hình xoắn thưa, xoắn cong, phân huỷ, chuyển hoá chất hữu cơ.
<i>Cellulomonas, Jonesia</i>	Hảo khí, hình xoắn, đốt xoắn chùm, phân huỷ, chuyển hoá chất hữu cơ.
<i>Dermatophilus, Geodermatophilus</i>	Hảo khí, hình đốt xoắn sao, hoặc đốt xoắn chùm, phân huỷ, chuyển hoá chất hữu cơ.
<i>Frankia</i>	Hảo khí, hình đốt xoắn cong, đốt xoắn sao, phân huỷ, chuyển hoá chất hữu cơ.
<i>Micromospora, Microbispora</i>	Hảo khí, hình đốt xoắn sao, phân huỷ, chuyển hoá chất hữu cơ.
<i>Nocardia, Actinopolyspora.</i>	Hảo khí, hình đốt xoắn dày, đốt xoắn sao, phân huỷ, chuyển hoá chất hữu cơ.
<i>Pseudonocardia</i>	Hảo khí, hình đốt xoắn chùm, đốt xoắn cong, phân huỷ, chuyển hoá chất hữu cơ.
<i>Mycobacterium</i>	Hảo khí, hình xoắn chùm quả, đốt xoắn ốc, phân huỷ, chuyển hoá chất hữu cơ.
<i>Caryophanon, Actinosynoema</i>	Hảo khí, đốt xoắn ốc chùm, phân huỷ, chuyển hoá chất hữu cơ.

2.1.2.4. Vai trò của xạ khuẩn trong tự nhiên

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

– Xạ khuẩn tham gia tích cực vào các quá trình chuyển hoá và phân giải nhiều hợp chất hữu cơ phức tạp (xenlulo, mùn, kitin, lignin,...).

– Hầu hết các xạ khuẩn thuộc giống *Actinomyces* có khả năng hình thành chất kháng sinh. Đây là đặc điểm quan trọng nhất của xạ khuẩn.

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

– Một số xạ khuẩn có khả năng sinh ra nhiều loại enzym như: proteaza, amilaza, kitinaza, xenluloza... Tuy nhiên, bên cạnh những xạ khuẩn có ích, có một số xạ khuẩn lại sinh ra các chất độc kìm hãm sự sinh trưởng của thực vật.

Một số khác lại là nguyên nhân gây ra một số bệnh khó chữa ở người và gia súc. Các bệnh này được gọi tên chung là *Actinomycose*.

2.1.3. Nấm

2.1.3.1. Đặc điểm

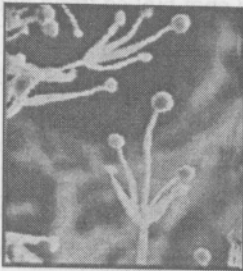
– Nấm là những vi sinh vật đơn hoặc đa bào, cơ thể hình sợi thuộc nhóm Eucaryota (nhân thật), cơ thể hình sợi, kích thước trong khoảng $0,5 - 3,5 \times 0,9 - 100 \mu\text{m}$.

– Nấm được chia thành 2 nhóm lớn, đó là: *nấm mốc* và *nấm men*. Nấm mốc (molds, moulds) là tên chung để chỉ tất cả các nhóm nấm, không phải là nấm men mà cũng không phải là các nấm lớn có mũ như nấm rơm, nấm hương, nấm truffle, nấm sò,...

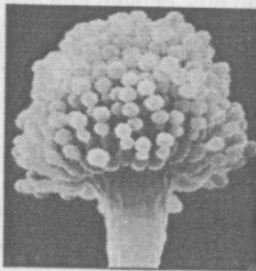
2.1.3.2. Hình thái của nấm

– Nấm mốc lại được chia thành 2 nhóm, đó là: *nấm mốc bậc thấp* (không có vách ngăn) và *nấm mốc bậc cao* (có vách ngăn).

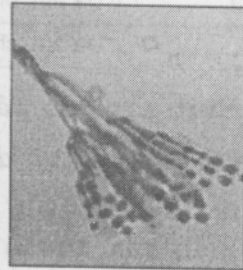
– Nấm men có nhiều dạng hình khác nhau: Elip, hình trứng, hình ống, hình cầu,...



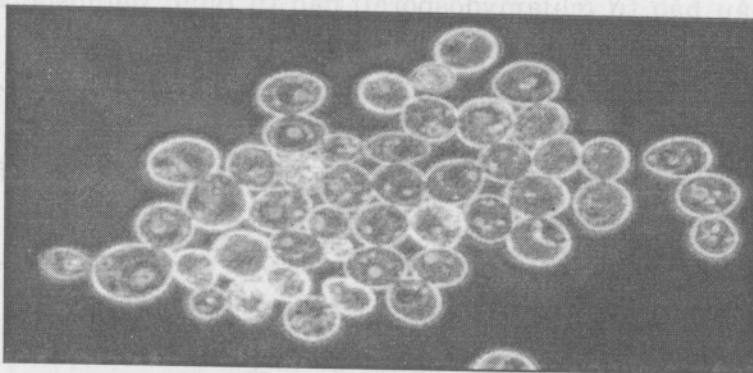
Nấm mốc bậc thấp
Mucor mucedo



Nấm mốc bậc cao
Aspergillus niger



Nấm mốc bậc cao
Penicillium



Nấm men – *Saccharomyces cerevisia*.

Hình 1.4. Hình một số loại nấm
(Ảnh của WCB.McGraw – Hill. 1998, phóng đại 2800 lần)

2.1.3.3. Một số giống nấm chính ở trong đất và cơ chế hoạt động

BẢNG 1.5. GIỐNG NẤM QUAN TRỌNG THƯỜNG GẶP TRONG ĐẤT

Tên giống Nấm	Những đặc điểm quan trọng
<i>Zygomycetes</i>	Sống hoại sinh, ưa ẩm, giàu hữu cơ, lên men tinh bột.
<i>Rhizopus</i>	Ưa ẩm, giàu hữu cơ, phân huỷ cơ chất mạnh, chịu nhiệt độ cao.
<i>Ascomyces</i>	Ưa ẩm, phân huỷ mạnh cơ chất, chịu được nhiệt độ cao.
<i>Basidiomycetes</i>	Nấm bất toàn, ký sinh trên cây, phân huỷ mạnh xenlulo, lignin.
<i>Penicilium</i>	Bậc cao, ưa ẩm, phân huỷ mạnh hợp chất hữu cơ.
<i>Asymmetrica</i>	Phân bố rất rộng, phân huỷ, chuyển hoá mạnh hợp hữu cơ.
<i>Aspergillus</i>	Bậc cao, ưa ẩm, phân huỷ mạnh chất hữu cơ chứa tamin, gây ngộ độc.
<i>Fusarium</i>	Sống ký sinh hoặc biểu sinh, phân huỷ mạnh xenlulo.
<i>Trichoderma</i>	Phát triển nhanh, phân huỷ mạnh xenlulo, lignin, hoại sinh.
<i>Cladosporium</i>	Sống hoại sinh hoặc ký sinh yếu trên tàn dư thực vật.
<i>Alternaria</i>	Ưa ẩm, phân huỷ, chuyển hoá mạnh chất hữu cơ trong đất.
<i>Mucor</i>	Ưa ẩm, chịu nhiệt độ cao, phát triển nhanh, phân huỷ chất hữu cơ.

2.1.3.4. Sinh sản của nấm

a) Sinh sản dinh dưỡng

Từ một đoạn khuẩn ty (sợi nấm) riêng rẽ rơi vào môi trường thích hợp và điều kiện thuận lợi, chúng sẽ nhanh chóng phát triển thành một nấm mốc mới.

Một số loài nấm mốc có khả năng hình thành bào tử màng dày, gọi là hậu bào tử (chlamyospore), bào tử phấn (oidiospore), bào tử chồi (blastospore) trực tiếp trên khuẩn ty của mình.

b) Sinh sản vô tính

Đây là phương thức sinh sản chủ yếu và phổ biến của tuyệt đại đa số các loại nấm. Sinh sản vô tính cho những bào tử, và tùy loại nấm sẽ cho các loại bào tử khác nhau.

Bào tử kín (Sporangiospore): Đó là các bào tử được hình thành trong các bọc chứa đặc biệt gọi là **bào tử nang** (sporangium). Khi nang vỡ các bào tử được giải phóng ra ngoài và nếu gặp điều kiện thuận lợi mỗi tế bào sẽ phát triển thành sợi nấm mới.

Bào tử nang được hình thành trên một khuẩn ty đặc biệt gọi là **cuống nang** (sporangiophore). Cuống nang thường lớn hơn các sợi

thường. Có loại phân nhánh, có loại không. Đặc điểm này là một tiêu chuẩn để định tên các loài nấm mốc trong bộ *Mucorales*.

Bào tử đỉnh hay *bào tử trần* (conidium). Đa số các bào tử đỉnh là bào tử ngoại sinh. Nhiều loại nấm mốc có hình thức sinh sản này, nghĩa là được sinh ra bên ngoài các tế bào sinh bào tử. Một số khác sinh ra bên trong của các tế bào sinh bào tử (nội sinh). Các bào tử mới sinh ra sẽ đẩy các bào tử đỉnh cũ ra ngoài.

- Các tế bào sinh ra bào tử đỉnh được sinh ra trực tiếp trên khuẩn ty đặc biệt gọi là cuống bào tử đỉnh (conidiophore).

- Bào tử đỉnh có hình dạng và màu sắc khác nhau tùy theo loài nấm mốc, có thể là hình cầu, hình trứng, hình bầu dục, hình kim. Có thể không màu hoặc nhiều màu khác nhau.

- Bào tử đỉnh có thể là đơn bào hoặc đa bào. Chúng có thể đứng riêng từng cái hoặc xếp thành từng chuỗi, từng khối.

- Các bào tử đỉnh của các loại nấm mốc khác nhau còn được phân biệt bởi các kiểu khác nhau. Có 3 kiểu phát triển:

+ Bào tử đỉnh được tạo thành do sự cắt đoạn của khuẩn ty (Arthroconidium).

+ Bào tử đỉnh được sinh ra từ các khuẩn ty bằng cách nảy chồi và bản thân các bào tử đỉnh thuộc kiểu này cũng có khả năng nảy chồi để sinh ra các bào tử đỉnh tiếp theo để tạo thành các chuỗi gốc già (nghĩa là các chuỗi bào tử đỉnh càng gần gốc càng già). Kiểu phát sinh này được gọi là Blastoconidium.

+ Bào tử đỉnh sinh ra từ tế bào sinh bào tử đỉnh, hoặc từ cuống bào tử đỉnh bằng cách ngăn vách với tế bào sinh bào tử đỉnh ngay khi bào tử đỉnh mới được hình thành và hoàn toàn không có khả năng sinh ra các bào tử nối tiếp. Trong trường hợp tạo thành chuỗi, tất cả các bào tử đỉnh của một chuỗi đều do tế bào sinh bào tử đỉnh sinh ra. Do đó chuỗi bào tử đỉnh được tạo thành là chuỗi gốc non (nghĩa là bào tử đỉnh càng gần miệng càng non). Kiểu phát sinh này được gọi là euconidium.

c) Sinh sản hữu tính

Nấm mốc cũng có quá trình sinh sản hữu tính, bao gồm các hiện tượng chất giao, nhân giao và phân bào giảm nhiễm như ở các sinh vật bậc cao. Căn cứ vào các hình thức sinh sản mà chia ra:

– Bào tử noãn (*Oospore*): Các noãn khí được sinh ra trên đỉnh các khuẩn ty phân nhánh. Khi noãn khí chín, phần lớn nguyên sinh chất chứa trong đó đã được bao bọc quanh nhân và tạo thành một hay nhiều noãn cầu. Hùng khí được sinh ra ở gần noãn khí. Cùng một lúc có thể có nhiều hùng khí tiến đến noãn khí. Khi tiếp xúc với noãn khí, hùng khí sẽ tạo thành một ống hoặc vài ống xuyên (chứa một nhân và một ít nguyên sinh chất). Các ống xuyên này đâm qua màng noãn khí và tìm đến noãn cầu để thụ tinh và tạo thành noãn bào tử. Noãn bào tử được bao bọc bởi một lớp màng dày, sau một thời gian sẽ phân chia giảm nhiễm và phát triển thành khuẩn ty mới.

– Bào tử tiếp hợp (*zygospores*): Khi hai khuẩn ty khác giống nhau (quy ước là khuẩn ty dương và khuẩn ty âm) tiếp giáp với nhau, chúng mọc ra hai mấu lồi gọi là nguyên phối nang (*progametangia*). Các mấu lồi này tiến dần lại và gặp nhau. Mỗi mấu sẽ xuất hiện một vách ngăn phân cách phần đầu ra thành một tế bào nhiều nhân, tương tự như một tiểu giao tử (*gametangia*). Hai tế bào này sẽ tiếp hợp với nhau và tạo thành một hợp tử đa nhân và có màng dày bao bọc gọi là bào tử tiếp hợp. Phần mấu lồi còn lại về sau phát triển thành 2 cuống treo giữ bào tử tiếp hợp, được gọi là cuống bào tử tiếp hợp (*zygospores*).

Sau một thời gian sống tiềm tàng, bào tử tiếp hợp sẽ nảy mầm phá vỡ màng và mọc ra một ống mầm. Ống mầm này sẽ phát triển thành một nang vô tính chứa nhiều bào tử kín. Khi đó ống mầm sẽ trở thành cuống nang. Phần cuống nang đâm sâu vào trong nang được gọi là nang trụ hay lõi.

– Bào tử túi (*Ascospores*): Bào tử sinh trong túi. Đa số loài nấm túi có chứa từ 4 – 8 bào tử ở mỗi túi.

Trên khuẩn ty đơn bội sinh ra những cơ quan sinh sản đực và cái. Túi giao tử đực nhỏ hình ống được gọi là *hùng khí* (*antheridium*). Túi giao tử cái là một tế bào hơi phình to ở đầu một nhánh khuẩn ty gọi là *thể sinh túi* (*ascogonium*). Thể sinh túi có hình cầu hoặc hình viên trụ, đầu kéo dài ra thành một ống gọi là *sợi thụ tinh* (*trichogyne*).

Hùng khí và thể sinh túi sinh ra ở cùng một vị trí trên khuẩn ty. Khi hùng khí tiếp xúc với sợi thụ tinh thì khối nguyên sinh chất chứa

nhiều nhân của hừng khí sẽ chui qua sợi thụ tinh để đi vào thể sinh túi. Sau đó xảy ra quá trình phối chất (chưa có quá trình phối nhân). Các nhân sẽ xếp thành từng đôi (nhân kép) gồm các nhân đực và một nhân cái. Trên thể sinh túi sẽ mọc ra nhiều sợi sinh túi. Các nhân kép được chuyển vào trong các sợi sinh túi. Sau đó từng nhân phân chia nhiều lần. Đồng thời xuất hiện các vách ngăn và phân chia sợi sinh túi thành nhiều tế bào lưỡng bội chứa nhân kép.

Tế bào ở cuối sợi uốn cong lại. Nhân kép chứa trong tế bào này phân chia một lần tạo thành 4 nhân. Sau đó tế bào này tách ra thành 3 tế bào. Tế bào ở chỗ uốn cong chứa 2 nhân (một nhân đực và một nhân cái). Tế bào ngọn và tế bào gốc, mỗi tế bào chứa một nhân.

Tế bào ở chỗ uốn cong chính là tế bào mẹ của túi. Nó sẽ phát triển thành túi bào tử. Tế bào ngọn về sau tiếp hợp với tế bào gốc để tạo thành một tế bào 2 nhân. Tế bào này sẽ tiếp tục phát triển thành một túi mới.

Khi hình thành túi bào tử, tế bào mẹ của túi dài ra. Hai nhân của nó kết hợp lại tạo ra một nhân lưỡng bội. Nhân này sau đó phân chia liên tiếp 3 lần (lần đầu giảm nhiễm) để tạo thành 8 nhân con đơn bội. Mỗi nhân con này về sau sẽ được một lớp nguyên sinh chất và một lớp màng bao bọc lại để trở thành bào tử túi. Tùy từng loại nấm mốc mà số lượng, hình dạng, màu sắc, kích thước của túi bào tử khác nhau. Túi bào tử khi chín sẽ thoát ra ngoài và nếu gặp điều kiện thuận lợi sẽ nảy mầm, phát triển thành nấm mới.

- Bào tử đảm (*Basidiospore*): Bào tử đảm là bào tử ngoại sinh. Khi hai khuẩn ty đơn bội (khuẩn ty sơ cấp) khác dấu nhau tiếp giáp với nhau thì một tế bào trên khuẩn ty này sẽ sinh ra một ống nối sang khuẩn ty kia. Nhân và nguyên sinh chất sẽ chui sang và phối hợp với tế bào ở khuẩn ty kia để tạo thành khuẩn ty thứ cấp. Khuẩn ty sơ cấp thường có đời sống rất ngắn. Chúng được thay thế bằng hệ khuẩn ty thứ cấp rất phát triển.

Đảm bào tử được sinh ra ở đầu những khuẩn ty thứ cấp. Tế bào ở khuẩn ty thứ cấp chứa 2 nhân. Khi tế bào ở đầu khuẩn ty này chuẩn bị phân cắt thì ở đoạn giữa hai nhân xuất hiện một ống nhỏ. Ống này mọc hướng về phía chỗi gốc của tế bào. Một nhân sẽ chui vào trong ống. Sau đó từng nhân sẽ tiến hành phân chia tạo ra trong tế bào 4 nhân con. Một nhân con trong ống. Một nhân con ở phía gốc sẽ

chuyển về phía đỉnh của tế bào. Tiếp đó xuất hiện 2 vách ngăn và tạo ra 3 tế bào. Một tế bào 2 nhân ở đỉnh. Một tế bào một nhân ở gốc và một tế bào một nhân ở bên cạnh. Tế bào 2 nhân sẽ phát triển thành đảm. Còn hai tế bào kia về sau sẽ tiếp hợp với nhau để tạo thành tế bào hai nhân khác.

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

Đảm có thể sinh ra trực tiếp trên đảm khuẩn ty hoặc cũng có thể sinh ra trên những cơ quan đặc biệt gọi là *quả đảm* (basidiocarps). Khi đó bên cạnh các đảm, người ta sẽ còn gặp các *sợi bên* (paraphyses) và đôi khi cả một số các tế bào phình to, không có vai trò sinh sản gọi là *thể hình nang* (cystidis).

2.1.3.5. Vai trò của nấm

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

- Sản xuất các chế phẩm enzym như: amilaza, proteaza, áp dụng trong quy trình công nghệ sản xuất rượu, bia, etanol,...

- Nấm mốc có khả năng tiết chất kháng sinh có giá trị như: penixilin, xephalosporum, fuzidin, fumagilin, tripaxidin. Nấm mốc cũng là nguyên nhân gây ra nhiều tổn thất to lớn cho việc bảo vệ mùa màng, lương thực, thực phẩm, hàng hoá, vải vóc, khí tài, dụng cụ quang học, phim ảnh, sách vở,...

- Nhiều loại nấm mốc gây nên những bệnh khá phổ biến và khó điều trị ở người, gia súc và cây trồng. Các bệnh nấm hay gặp ở người như hắc bào, nấm vẩy rồng, nấm kẽ chân, nấm phổi, nấm tóc ảnh hưởng lớn đến sức khoẻ của con người.

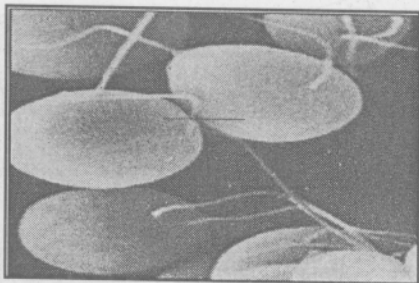
- Các bệnh ở gia súc, gia cầm hay gặp như nấm da, nấm phổi, nấm mào gà. Đặc biệt những loại nấm mốc tiết độc tố gây ngộ độc thức ăn như *Aspergillus* gây tổn thất lớn trong chăn nuôi.

2.1.4. Vi khuẩn lam và tảo

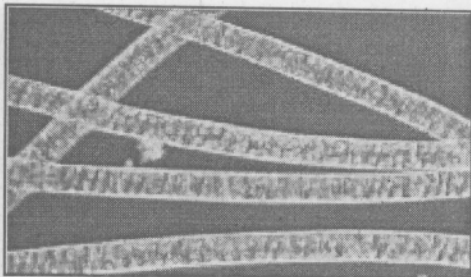
2.1.4.1. Đặc điểm của vi khuẩn lam, tảo

Vi khuẩn lam là những cơ thể không có nhân phân hoá (nhân thật) có khả năng tự dưỡng nhờ quá trình quang hợp, ngoài ra còn có một số vi tảo chưa có nhân phân hoá (*Cyanophyta*). Kích thước giao động rất lớn từ (0,5 – 4,0 x 2,0) đến vài trăm μm .

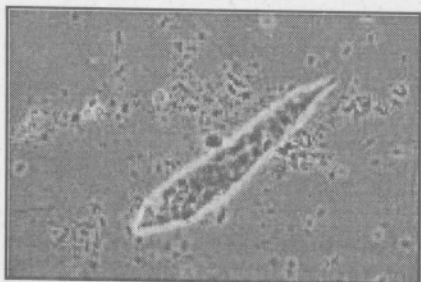
2.1.4.2. Hình thái một số loại tảo



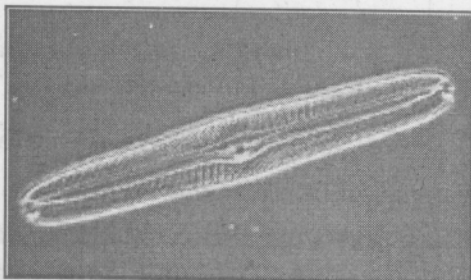
Tảo - *Chlamydomonas*



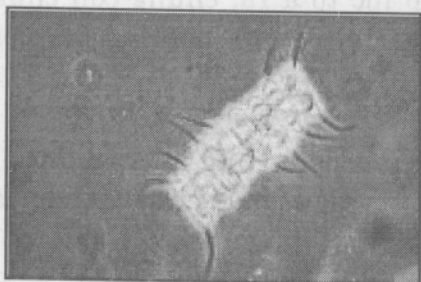
Tảo - *Spirogyra*



Tảo - *Euglena*



Tảo - *Pinnularia*

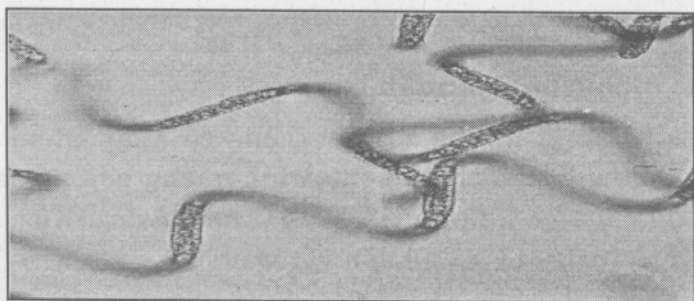


Tảo - *Scenedesmus*

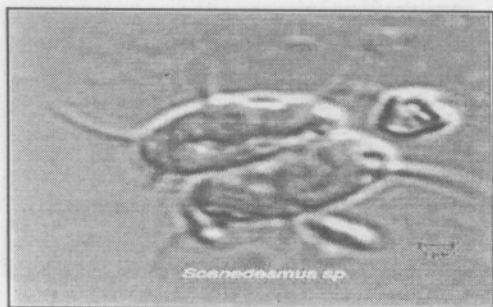


Tảo - *Volvox*

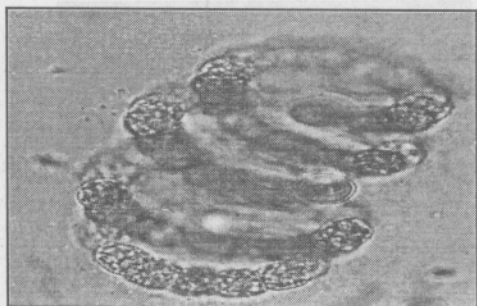
Hình 1.5. Hình một số loại tảo
(Ảnh của Dương Đức Tiến. Phóng đại 2000 lần)



Tảo độc - *Scenedesmus* sp



Tảo độc - *Anabaena spiroides*



Tảo độc - *Spirulina*. sp

Hình 1.6. Hình một số loại tảo độc ở hồ Hoàn Kiếm, Hà Nội
(Ảnh của Dương Đức Tiến. Phóng đại 2000 lần)

2.1.4.3. Phân loại tảo và đặc điểm hoạt động

– Tảo lam (*Cyanophyta*)

Sống cộng sinh ở bèo hoa dâu. Chúng chứa diệp lục tố a; chất dinh dưỡng dự trữ quan trọng nhất là glicogen.

– Tảo lục (*Chlorophyta*)

Là loại đơn hoặc đa bào. Ngoài diệp lục tố a ra, chúng còn chứa các loại sắc tố a, b. Sản phẩm của quá trình quang hợp là tinh bột (*Crucigenia rectangularis*).

– Tảo vàng (*Xanthophyta*)

Loại này còn có tên gọi là tảo roi lệch, sống ở vùng nước lợ, ngoài diệp lục tố a ra, còn chứa các sắc tố a, e. Sản phẩm quang hợp là leucosin và dầu.

– Tảo cát (*Bacillariophyta*)

Loại này còn có tên gọi là tảo silic. Ngoài diệp lục tố a ra, còn chứa sắc tố b, diatomin màu vàng nâu. Sản phẩm quang hợp là leucosin và dầu. Sống ở biển.

– Tảo nâu (*Phacophyta*)

Sống ở biển, cơ thể chứa chất keo dính (algin). Ngoài diệp lục tố a, còn chứa sắc tố b và c, màu nâu đỏ pyrophin. Sản phẩm quang hợp là tinh bột.

– Tảo mắt (*Euglenophyta*)

Ngoài diệp lục tố a ra còn chứa nhiều sắc tố khác. Chất dự trữ và cũng là sản phẩm quang hợp đều là paramylon.

– Tảo ánh vàng (*Chrysophyta*)

Sống thành tập đoàn. Ngoài diệp lục tố a ra, còn chứa sắc tố phycogrysin. Sản phẩm quang hợp là leucosin.

– Tảo giáp (*Pyrrophyta*)

Thể đơn hoặc đa bào, hình sợi. Ngoài diệp lục tố a, còn chứa sắc tố màu nâu pyrophin. Sản phẩm quang hợp là tinh bột.

– Tảo vòm (*Charophyta*)

Hình dáng giống như bụi cây phân đốt. Ngoài diệp lục tố a, còn chứa các sắc tố khác. Sản phẩm quang hợp là tinh bột.

2.1.5. Vi sinh vật khác

Ngoài 4 nhóm vi sinh vật chính được trình bày trên còn có một số nhóm khác, nhưng vai trò của chúng ở trong đất không lớn, như: Virus, Niêm vi khuẩn, Xoắn thể, Ricketxi, Mycoplasma,...

2.2. ĐỘNG VẬT NGUYÊN SINH (NGUYÊN SINH ĐỘNG VẬT ĐẤT)

2.2.1. Đặc điểm chung

– Nguyên sinh động vật là những động vật đơn bào. Tế bào lớn khoảng từ một vài micromet đến một vài centimet. Ở trong đất, kích thước tế bào thường có xu hướng nhỏ hơn so với ở nước. Sở dĩ như vậy vì nguyên sinh động vật trong đất di động nhờ một lớp nước rất mỏng vừa đủ tràn kín khí khổng của đất.

– Trong thời gian dài, nguyên sinh động vật được xếp vào giới động vật vì chúng có thể di động và không có cơ quan quang hợp. Cũng có một số nguyên sinh động vật có thể tự dưỡng vì vừa có diệp lục, vừa dị dưỡng như trùng roi. Nó là dạng trung gian giữa động vật đơn bào và thực vật.

– Vòng đời của nguyên sinh động vật gồm 2 pha:

Pha hoạt động. Trong pha này chúng có thể di chuyển, sinh trưởng, phát triển.

Pha ngủ nghỉ (pha hình thành nang xác): Trong giai đoạn này chúng bất động. Nang xác được hình thành theo quá trình sau: tế bào hình thành nên một vỏ bọc dày. Vỏ bọc bảo vệ tế bào, chống lại những điều kiện bất lợi bên ngoài như nhiệt độ, sự khô cạn, độ chua, kiềm, hoạt động của men,...

Đa số những động vật nguyên sinh sống tự do tưởng như là sống ở nước, nhưng thực tế đa số chúng phát triển hoàn toàn trong đất ướt và ngay cả trong đất khô. Và do đó chúng thể hiện giống như một thành viên của hệ vi sinh vật đất bên cạnh các vi khuẩn, xạ khuẩn, tảo, nấm. Đại đa số nguyên sinh động vật có thể sống ở các loại đất khác nhau trên Trái Đất. Vì vậy có người gọi chúng là *Nguyên sinh động vật của bốn phương* (Pochon và Barjae, 1956; Sing, 1963).

2.2.2. Phân loại nguyên sinh động vật đất

2.2.2.1. Phân loại theo hình thái: 4 lớp chính

a) Lớp *Sarcodina* hay *Rhizopodes* (trùng chân giả) amíp và động vật có vỏ (Testaci).

Nhóm này gồm những nguyên sinh động vật có khả năng hình thành chân giả ở giai đoạn trưởng thành.

b) Lớp *Mastigophora* hay *Flaglles* (trùng có roi) di động nhờ roi, nhưng ở một số loài di động theo kiểu amíp.

c) Lớp *Sporozoa* hay *Sporozoaires* (trùng bào tử) chỉ ký sinh, không có nhiều ý nghĩa đối với sinh học đất.

d) Lớp *Ciliophora* hay *Cilies* (trùng đế giày hay trùng tiêm mao). Nhóm này rất đặc biệt, di động bằng tiêm mao. Đặc biệt nhóm này có 2 loại nhân tế bào (nhân to và nhân bé).

2.2.2.2. Phân loại theo dinh dưỡng: 3 nhóm chính

a) Nguyên sinh động vật quang hợp

Những nguyên sinh động vật này có sắc tố quang hợp khuếch tán hay định vị. Vai trò trong thực tế của nhóm này rất hạn chế. Giống thường gặp là *Euglena*.

b) Nguyên sinh động vật dị dưỡng

Chúng sống nhờ những hợp chất hữu cơ tan trong nguyên sinh chất. Nhóm này gồm hầu hết các loại có lông và một số có tiên mao.

c) Nguyên sinh động vật dinh dưỡng theo kiểu động vật (holozoiques)

Loại nguyên sinh động vật này chiếm phần lớn trong nguyên sinh động vật đất. Chúng đồng hoá những hạt nhỏ, cứng và các loại vi sinh vật mà chủ yếu là vi khuẩn, nấm men, tảo và một số nguyên sinh động vật khác. Nhóm này thường gặp là những nguyên sinh động vật có tiên mao.

Số lượng vi khuẩn bị động vật nguyên sinh đồng hoá rất khác nhau. Một số vi khuẩn có thể sản sinh một số chất độc chống lại protozoaires (Singh, 1963; Stout và Hest; Veldkamp, 1968). Những chất độc đó có thể là những hợp chất đa đường do vi khuẩn tổng hợp và tiết ra trong môi trường. Ngoài vi khuẩn, nấm men, xạ khuẩn và cả nấm mốc nữa ở mức độ nhất định cũng có thể dùng làm thức ăn cho nguyên sinh động vật.

2.2.2.3. Về khía cạnh hô hấp, nguyên sinh động vật được chia thành 2 nhóm

a) Nhóm Geohydrobionte

Là những nguyên sinh động vật sống trong các khối nước và màng nước trong đất. Chúng là những sinh vật thuỷ sinh sống trong nước của đất. Chúng hô hấp bằng oxy hoà tan trong nước. Đại diện cho nhóm hô hấp kiểu này là Trùng bánh xe *Habrotrochapusilla mimetica*.

b) Nhóm Geatmobionte

Là những nguyên sinh động vật đất hô hấp nhờ oxy tự do có trong các khe đất. Đại diện cho nhóm hô hấp này là giun tròn *Nematoda*.

2.2.3. Vai trò của nguyên sinh động vật

– Nguồn thức ăn chính của nguyên sinh động vật là vi khuẩn. Do đó sự phân bố của nguyên sinh động vật phần nào phụ thuộc vào sự phân bố của vi khuẩn. Thường ở tầng mặt và tầng canh tác, số lượng nguyên sinh động vật nhiều hơn tầng sâu. Ở vùng rẫy, nguyên sinh động vật tập trung nhiều hơn ở vùng xa rẫy. Nơi ẩm ướt, có độ ẩm thích hợp, số lượng chúng nhiều hơn nơi đất khô.

– Về mật độ và sinh khối: Amíp và nguyên sinh động vật có lông roi thường từ $10^3 - 10^5$ tế bào/g đất. Nguyên sinh động vật có tiên mao thường

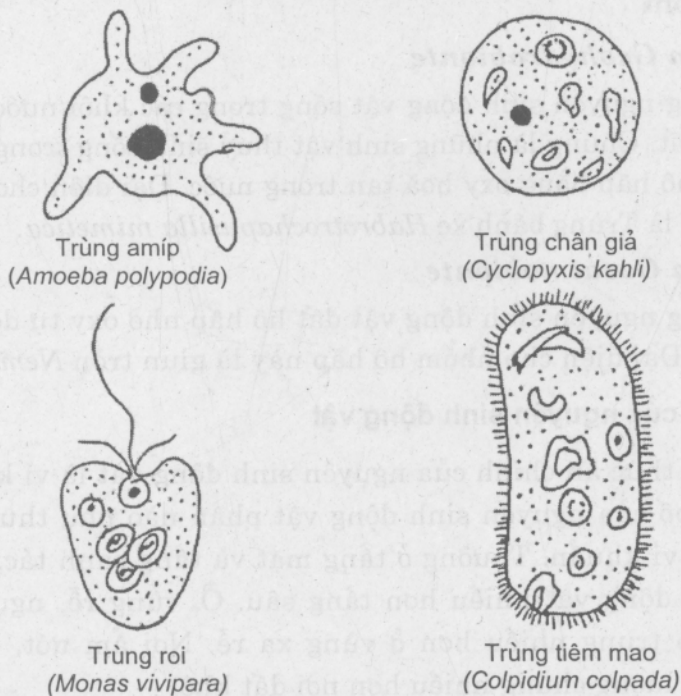
khoảng 103 tế bào/g đất. Số lượng không lớn nên sinh khối không nhiều. Với amíp thường khoảng 100kg/ha, còn số lượng bọ chân giả có vỏ (*Rhizopodes testaces*) khoảng mấy chục kg/ha (Ghilarow, 1995, Stout và Heal, 1967).

– Trước kia người ta cho rằng nguyên sinh động vật ức chế quá trình hoạt động của vi khuẩn, do đó ảnh hưởng không tốt đến độ phì đất.

Ngày nay quan niệm trên bị bác bỏ và một số thí nghiệm đã chứng minh cho thấy, dưới tác dụng của một số nguyên sinh động vật, một số hoạt tính sinh học của vi khuẩn được tăng cường. Meiklejohn (1932), Stont và Heal (1967) đã chứng minh quá trình amôn hoá và cố định N_2 được tăng lên. Nguyên nhân của sự tăng cường vẫn chưa được làm sáng tỏ. Có giả định có thể do nguyên sinh động vật đã làm "trẻ lại" quần thể vi sinh vật, hoặc đã sản sinh những chất kích thích cho hoạt động của vi sinh vật.

– Nguyên sinh động vật có vai trò quan trọng trong việc cân bằng sinh học trong đất và tham gia ở mức độ nhất định trong quá trình phân giải và tổng hợp chất hữu cơ.

2.2.4. Một số hình ảnh của động vật nguyên sinh



Hình 1.7. Hình ảnh một số loại Nguyên sinh động vật đất
(Ảnh của Ghilarov.M, 1976. Phóng đại 2000 lần)

2.3. ĐỘNG VẬT ĐẤT

2.3.1. Định nghĩa

Động vật đất là nhóm sinh vật đất có kích thước lớn, mắt thường nhìn thấy mà còn có thể cầm nắm được chúng một cách dễ dàng.

Để tồn tại được, từ những cơ thể mềm mại của chúng dần dần được hình thành lớp vỏ bọc ngoài, nhằm bảo vệ cơ thể và chống mất nước. Động vật đất có tính đặc thù là khả năng di cư tích cực, thích nghi chuyển vận trong môi trường đất, chúng lợi dụng các khe, kẽ, khoang nứt ở trong đất để di chuyển cơ thể.

Có hai nhóm động vật đất di chuyển theo kiểu khác nhau: Nhóm tự đào để di động; hoặc theo phương thức thụ động, tức là biến hình thái của mình cơ giản sao cho hợp lý với kích cỡ khe hở của đất. Ở động vật đất còn có nhiều hướng thích nghi với môi trường sống qua các hoạt động di cư ngày đêm, di cư theo mùa, di cư theo độ sâu và theo bề mặt đất. Chúng có khả năng tìm và chọn nơi sống có điều kiện thích hợp, hoặc có khả năng thay đổi các khả năng hoạt động và tập tính sống để thích ứng với môi trường mới. Ngoài ra, nhóm động vật đất còn sống tập đoàn, có kỷ luật rất cao như kiến, ong, mối,...

Động vật đất hấp thụ các chất dinh dưỡng trong đất. Ngoài ra, chúng còn ăn thức ăn mọng nước và xác các vi sinh vật.

2.3.2. Phân loại động vật đất

2.3.2.1. Phân theo kích thước

Theo E.Rapoport và M. Tschapek (1967) đã xếp động vật đất thành 4 nhóm như sau:

a) **Nannofauna:** Là những động vật đất có kích thước nhỏ hơn 0,2mm, gồm hầu hết các sinh vật đơn bào, nhiều nhóm động vật không xương sống và sâu bọ bậc thấp.

b) **Microfauna:** Là những động vật đất hiển vi, có kích thước khoảng 0,1 – 0,2mm cho đến 2 – 4mm. Đó là các động vật chân khớp bé, như: ve, bét, bọ nhảy, sâu bọ bậc thấp, rết tơ (*Symphyla*).

c) **Mesofauna:** Là những động vật đất có kích thước trong khoảng 2,0 – 25,0mm. Loại này có thể quan sát bằng mắt thường và thu nhặt bằng tay được, là những ấu trùng sâu bọ, các nhóm chân khớp nhiều chân như rết, cuốn chiếu, giun đất, thân mềm cạn.

d) Macrofauna: Là những động vật đất có kích thước lớn hơn 20mm, chúng là đại diện của động vật có xương sống sống trong đất, như các nhóm lưỡng thê, bò sát, động vật gặm nhấm, giun đất cỡ lớn.

2.3.2.2. Phân theo dinh dưỡng: thành 4 nhóm sau

a) Động vật đất hoại sinh: Gồm những động vật đất ăn xác vụn hữu cơ nguồn gốc động vật hoặc thực vật. Nhóm ăn xác vụn hữu cơ thực vật (Saprophaga) có giun đất, sâu bọ, chân khớp bé. Nhóm ăn xác động vật (Nematoda) có sâu bọ cánh cứng, sâu bọ hai cánh, một số ve giáp.

b) Động vật đất hút dịch và ăn mô thực vật sống: Giun tròn ký sinh trong đất, giun trắng, nhóm ve bét, sâu bọ.

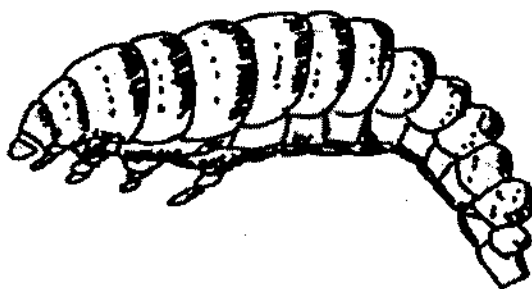
c) Động vật đất ăn thịt một số nhóm sinh vật khác: Giun tròn, ve bét, nhện, rết, sâu bọ khác.

d) Động vật đất sống ký sinh: Là những động vật đất sống nhờ vào cơ thể sống của động vật khác và thực vật trong đất. Loại động vật này lợi dụng cơ thể sống khác làm nguồn dinh dưỡng cho bản thân.

2.3.3. Một số động vật chính sống trong đất

2.3.3.1. Ấu trùng sâu bọ cánh cứng

Ngoài được phủ lớp vỏ cứng để bảo vệ cơ thể và chống mất nước, sống không lâu dài trong đất.



Hình 1.8. Ấu trùng sống trong đất

2.3.3.2. Rết ăn thịt

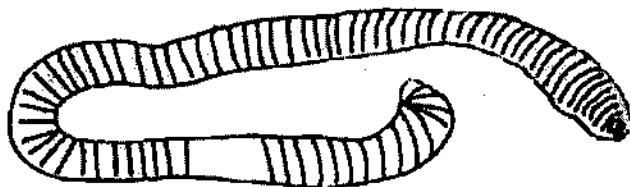
Chúng di chuyển theo kiểu thụ động, cơ thể nhỏ. Thân hình uốn khúc, có thể trườn theo các khe, khoang hở của đất.



Hình 1.9. Rết đất

2.3.3.3. Giun đất

– Giun đất di chuyển theo kiểu chủ động đào hang bằng cách nuốt đất vào bụng, sau đó thải ra phía sau. Vỏ cơ thể giun luôn luôn có dịch nhờn để dễ chuyển động, đồng thời giun còn có khả năng co thắt cơ thể để ép đất chặt lại và mở đường đi.



Hình 1.10. Giun đất

– Giun sống nhờ vào các rễ, lá cây bị chết. Giun lớn một ngày có thể đồng hoá được một lượng thức ăn nặng gấp nhiều lần cơ thể chúng và đương nhiên lượng thức ăn trong đất ấy có rất nhiều vi sinh vật (Gerad, 1963). Đại đa số chúng có thể đồng hoá phân hữu cơ, rác phần nào đã được phân giải trong đất.

– Trong cuộc sống của mình, giun có thể tích lũy lá cây chết, các chất hữu cơ ở trong hang tổ của mình. Những chất này sẽ được dần dần phân giải do vi sinh vật. Những chất hữu cơ được vùi như vậy sẽ được phân giải nhanh hơn khi chúng ở trên lớp đất mặt.

– Như vậy, giun có *vai trò quan trọng ban đầu* để sơ chế các chất xơ sợi trong đất và phân giải chất hữu cơ trong đất.

– Giun đã nuốt vào cơ thể những chất hữu cơ đã được phân giải và một phần đất. Trong cơ thể giun, các chất hữu cơ và đất quyện vào nhau thành dạng viên rất mịn. Những hạt mịn này sau khi giun bài

tiết ra ngoài sẽ tạo điều kiện tốt cho việc cải tạo kết cấu đất và hoạt động của vi sinh vật. Đây là *tác dụng thứ hai của giun*, tác dụng này rất quan trọng.

— Ở hệ tiêu hoá của giun, thức ăn được phân giải một phần, một số khác như xenlulo, kitin còn chưa được phân giải thì sẽ được tiếp tục phân giải nhờ hệ vi sinh vật sống trong hệ tiêu hoá của giun. Những chất bài tiết của giun gồm một phần là những chất hữu cơ có nguồn gốc từ thực vật đã được phân chia nhỏ, dễ biến đổi, một phần khác là những hợp chất hữu cơ chứa N từ cơ thể giun và vi sinh vật như mucoprotein, ure, axit uric (do các tuyến dưới da của giun). Ngoài ra, trong chất bài tiết còn có CaCO_3 được luyện từ các tuyến đặc biệt của giun. Nó giúp cho quá trình giữ độ pH ở mức thuận lợi. Chất bài tiết của giun có cấu trúc bền vững, có sức giữ nước cao hơn đất bình thường. Tất cả những điều kiện trên tạo cho đất tốt hơn.

Những chất bài tiết của giun còn tạo một môi trường mới, làm tăng lượng N, P, K trao đổi, tạo điều kiện cho vi sinh vật cũng như cây trồng phát triển thuận lợi.

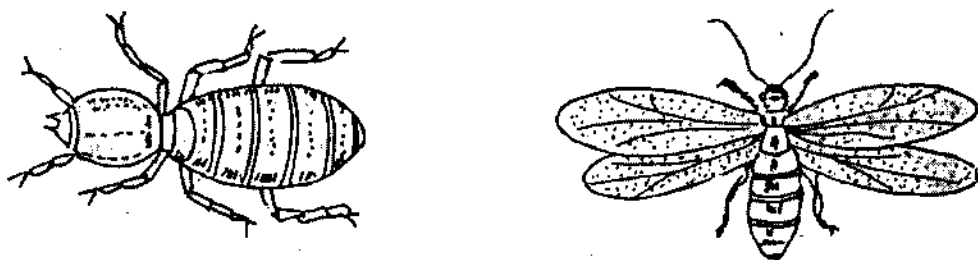
Nhiều phân tích cho thấy đất có phân giun thì số lượng vi khuẩn, xạ khuẩn cao hơn đất không có phân giun 10 lần; còn tảo, nấm men, nấm mốc giảm một ít. Các loại vi sinh vật khác nhau có ảnh hưởng không giống nhau: *Azotobacter* giảm, vi khuẩn nitrat hoá tăng, sự phân giải xenlulo của vi khuẩn tăng, còn quá trình phân giải xenlulo của nấm mốc giảm. Những vi khuẩn có nha bào như *Bacillus cereus*, *Bacillus var.*, *Mycoides* khi tăng lên 20 – 30 lần, khi thì giảm. Sự tăng giảm này tùy từng loại giun.

Lumbricus rebellus có thể ăn thức ăn tàn dư thực vật còn tươi và trong hệ thống tiêu hoá của nó những vi khuẩn huỷ hoại quang *Bacteries fluorescens* phát triển mạnh trong giai đoạn đầu của quá trình phân giải chất hữu cơ. *Octolasion lacteum* lại thích ăn những thức ăn phần nào đã bị biến chất và trong ruột có vô số vi khuẩn có nha bào, xạ khuẩn. Do đó các thức ăn vào cơ thể được phân giải mạnh hơn.

Hoạt động của giun còn phụ thuộc vào thời tiết, khí hậu. Nhiệt độ trung bình (20 – 25°C), độ ẩm (30 – 60%) thì giun hoạt động tốt. Nói chung giun có tác dụng tốt trong quá trình phân giải và mùn hoá chất hữu cơ. Giun đã làm cho đất có cấu tượng tốt, tích lũy được chất dinh dưỡng như N, P, K cho cây trồng.

2.3.3.4. Mối và kiến đất

– Chúng có cánh sống tập trung thành bầy, có tổ chức khá cao trong quần thể. Chúng dùng đầu và những đôi chân để cào đất.



Hình 1.11. Mối đất và kiến đất

Mối là loại côn trùng 2 cánh thường gặp nhiều ở vùng á nhiệt đới và nhiệt đới. Nó tham gia quá trình phân giải các chất hữu cơ phức tạp, như: gỗ, rơm, rạ, rác,... làm biến đổi chất, tăng độ màu mỡ của đất.

– Dựa về khía cạnh dinh dưỡng, mối đất được chia thành 4 loại:

+ Mối phá gỗ khô.

+ Mối phá gỗ ướt.

+ Mối nấm (*Termiter champignonniste*).

+ Các loại mối khác

Mối gỗ khô: Chúng làm tổ trong gỗ cứng và ít có liên quan tới đất. Loại này phân giải những phần có lignin, xenlulo để lấy glucit nuôi cơ thể.

Mối gỗ ướt: Chúng cũng dùng những nguyên liệu như loại trên nhưng có quan hệ với đất. Chúng sống trong gốc, rễ, nhánh cây vùi vào đất. Vai trò của nó giống nhóm mối gỗ khô nhưng cũng thích những vật liệu đã bị vi sinh vật tác động.

Mối nấm: Chúng sống dựa trên những gỗ hoặc gỗ hư hỏng, rơm rạ, vỏ cây và phân của những động vật lớn. Chúng đưa những vật liệu này vào tổ, khi những vật liệu này biến đổi mới phân giải, đồng hoá chúng. Quá trình đồng hoá ấy mới tạo thành những viên tảo nhỏ, ướt đắp lên thành đồng, thành luống. Trong luống hoặc đồng ấy chứa đầy các loại nấm mốc.

Một số mối khác sinh trưởng bằng những tàn dư khác nhau. Rơm rạ độn chuồng, nhánh và thân cây trong rừng, rơm rạ và một số cây trồng khác. Một số được gọi là mối mùn (*Termite humivore*) chúng sử

dụng những chất hữu cơ của tầng đất mặt và trong tổ chúng, lượng cacbon hữu cơ luôn luôn nhỏ hơn lượng cacbon hữu cơ ban đầu.

Mối mùn là những sinh vật đầu tiên làm tiêu nhanh những hợp chất hữu cơ mà thực vật rơi xuống. Trong hệ tiêu hoá của chúng có một quần thể vi sinh vật có khả năng phân giải xenlulo. Người ta có thể cho rằng đó là một phần quan trọng của vi sinh vật dị dưỡng sống theo kiểu cộng sinh với mối và hoạt động chủ yếu trong ruột mối.

Mối ăn gỗ khô (*Termites xylophages* – *Calotermides*, *Termopsides*, *Rhinotermides*) trong ruột chúng có nhiều vi khuẩn có khả năng phân giải xenlulo, hemixenlulo, cung cấp lượng glucit để đồng hoá cho mối. Số lượng vi sinh vật này rất nhiều, đôi khi có thể chiếm 1/6–1/3 khối lượng mối. Chính vì vậy mà loại mối này phá hại gỗ rất mạnh.

Mối phá hoại gỗ ẩm ướt (*Termitides*) trong ruột chỉ chứa những vi khuẩn giống vi khuẩn ở dạ cỏ các động vật ăn cỏ. Những mối này thích những vật liệu đã bị nấm mốc tác động trước.

Từ lâu người ta cho rằng, mối nấm dùng nấm mốc nằm trong luống đất viên của mình làm thức ăn. Nhưng những nghiên cứu của Grasse và Noiroll (1958) chứng tỏ rằng mối nấm có thể sử dụng tàn dư thực vật và biến chúng thành những sản phẩm dễ đồng hoá hơn. Sự phân giải xenlulo nhờ hệ vi sinh vật sống trong ruột mối.

Nhìn chung, nhờ hệ vi sinh vật phong phú sống phối hợp ở trong ruột, mối có khả năng phân giải và khoáng hoá nhanh các hợp chất hữu cơ có nguồn gốc thực vật. Về khía cạnh này, tác động của mối hơn hẳn các sinh vật khác. Ở mức độ nhất định, mối có khả năng làm thay đổi một số tính trạng lý, hoá học của đất có lợi cho cây trồng. Bên cạnh mặt lợi ấy, trong thực tế đời sống và sản xuất, mối đã gây nhiều tác hại, nhất là phá hoại tre, gỗ, nứa, lá và đê điều.

2.3.3.5. Ve, giáp, bọ hung

Ngoài được phủ lớp vỏ rất cứng, đầu nhọn, bẹt để xúc đất và đào bới đất.



Hình 1.12. Ve, bét và bọ hung

Chương II

SINH VẬT ĐẤT TRONG QUÁ TRÌNH HÌNH THÀNH MÙN VÀ KẾT CẤU ĐẤT

I- QUÁ TRÌNH HÌNH THÀNH MÙN NHỜ SINH VẬT ĐẤT

1.1. THÀNH PHẦN HỮU CƠ TRONG ĐẤT

- Các chất hữu cơ giữ vai trò rất quan trọng trong quá trình hình thành và thay đổi độ phì đất. Nhờ hoạt động của sinh vật đất, chất hữu cơ được phân giải tạo điều kiện cho cây trồng sinh trưởng và phát triển. Sự chuyển hoá chất hữu cơ được tiến hành theo 2 hướng chủ yếu:

+ Vô cơ hoá.

+ Mùn hoá.

Quá trình vô cơ hoá mạnh và thích đáng sẽ đảm bảo cung cấp đầy đủ và kịp thời thức ăn cho cây trồng. Nhưng nếu phân giải quá mạnh, cây trồng đồng hoá không hết, chất dinh dưỡng, hoặc bị rửa trôi, hoặc tăng nồng độ không có lợi cho cây. Bên cạnh quá trình vô cơ hoá, trong phân giải còn xảy ra quá trình mùn hoá. Quá trình này làm cho hàm lượng mùn cao, là một điều kiện rất quan trọng để tăng độ phì đất. Vô cơ hoá và mùn hoá xác hữu cơ trong đất đều do các sinh vật đất tiến hành. Nghiên cứu quy luật tác động của sinh vật đất, tạo điều kiện để chúng hoạt động tốt có ý nghĩa lớn trong sản xuất nông nghiệp. Thành phần và tính chất hoá học của chất hữu cơ khác nhau nên sinh vật đất phân giải, chuyển hoá chúng cũng khác nhau.

- Thường chất hữu cơ trong đất gồm: Xác động vật, thực vật, sinh vật đất và những sản phẩm phân giải, tổng hợp được của các loại sinh vật đất.

Về thành phần xác sinh vật gồm:

+ Hydratcarbon: Các pentozơ ($C_5H_{10}O_5$), các hexozơ ($C_6H_{12}O_6$).

+ Xenlulo ($C_6H_{12}O_5$)_n.

+ Hemixenlulo.

+ Lignhin.

+ Nhựa, sáp, dầu mỡ. Các chất này không hoà tan trong nước nhưng có thể hoà tan trong rượu, axeton, benzen. Nhìn chung các chất này thành phần phức tạp và khó phân giải.

+ Tanin: Chất này ít gặp trong xác thực vật hạ đẳng, các loại cỏ và xác động vật. Tanin có nhiều trong vỏ và lá cây lá kim. Tác dụng dinh dưỡng cho cây trồng và tầm quan trọng của tanin trong sự hình thành các axit mùn chưa được xác định rõ ràng.

+ Tro gồm có Ca, Mg, K, Si, S, Fe,... Tro các loại cây có thành phần không giống nhau. Tro các loại cây họ hoà thảo có nhiều Ca, Mg, K hơn các loại thân gỗ, cây lá kim. Các nguyên tố Ca, Mg, Na, Si, S, Fe của tro có tác dụng đến hoạt động của vi sinh vật.

Như vậy chất hữu cơ trong đất rất phong phú. Có loại dễ phân giải. Có loại cấu tạo mạch thẳng. Có loại cấu tạo mạch vòng, có loại nhiều N, có loại không có N.

1.2. QUAN ĐIỂM VỀ QUÁ TRÌNH HÌNH THÀNH MÙN

Mùn là một thể hữu cơ phức tạp được nghiên cứu ở nhiều nước trên thế giới từ cuối thế kỷ thứ XIX. Mùn là một bộ phận rất quan trọng trong đất. Quá trình hình thành mùn gắn liền với quá trình phát sinh của mùn. Mùn là chỉ tiêu quan trọng để đánh giá độ phì nhiêu của đất. Trên thế giới đã có hai quan điểm về sự hình thành mùn.

1.2.1. Quan điểm hoá học

Những người theo quan điểm này cho rằng, mùn là chất hữu cơ chưa hoàn toàn phân giải của xác động, thực vật. Nghiên cứu chất mùn bắt đầu từ Xotso (1804) và Xirangen (1828). Bấy giờ người ta đã tách được axit humic từ trong chất mùn và xác định được axit apocrenic tan trong môi trường kiềm. Qua đây người ta cho rằng một số hợp chất trong mùn do chất hữu cơ bị oxy hoá theo phương pháp đơn thuần hoá học. Năm 1920, Xryno và Xoro dùng phương pháp hoá học hữu cơ thông thường đã rút từ mùn được 40 loại hợp chất hữu cơ có chứa nitơ và phospho. Nhà bác học Đức Fitte, Xirangen cho rằng, lignhin biến thành axit humic là do kết quả của một số phần tử tự oxy hoá. Quan điểm hoá học về sự hình thành mùn biểu hiện rõ nhất trong nghiên

cứu của Oatxman. Ông cho rằng trong đất, xác thực vật bị phân giải. Phần dễ phân giải được vô cơ hoá tương đối nhanh. Phần này không phải là nguyên liệu hình thành mùn, mà nguyên liệu cơ bản là lignin. Nói cách khác, theo Oatxman, về bản chất thì mùn là vật dư thừa sau quá trình phân giải từ xác động, thực vật. Oatxman cho rằng: "Muốn hiểu rõ sự biến hoá và hình thành mùn trong đất, không cần thiết phải thừa nhận tính cấu tạo chân thực của axit humic. Các phương pháp xác định quá trình mùn hoá để phân biệt quá trình phân giải đều vô ích. Thành phần đặc biệt của mùn trong đất là phức chất có tính chất đề kháng mạnh. Quá trình hình thành mùn chỉ là quá trình phân giải hoá học của xác thực vật có từ ban đầu.

Nhìn chung, những người theo quan điểm hoá học cho rằng mùn trong đất được hình thành chủ yếu là do tác dụng của quá trình hoá học.

1.2.2. Quan điểm sinh học

- Dakutraep, Uyliam, Tiurin, Kononopva,... đã có nhiều cống hiến trong việc nghiên cứu toàn diện về mùn. Docusaep và Cotusep đã nghiên cứu sự tích lũy mùn trong đất đen (Secnozern), họ cho rằng trong quá trình hình thành đất, nhân tố sinh vật học có vai trò đặc biệt quan trọng. Docusaep cho rằng, khi bị phân giải, xác thực vật một phần biến thành chất hữu cơ đơn giản, đồng thời một phần khác có thể hình thành các chất phức tạp. Trong cả hai quá trình ấy, vai trò của sinh vật trong đất rất quan trọng.

- Uyliam - Người kế tục và quán triệt tư tưởng Docusaep và Cotusep đã đứng trên quan điểm sinh vật học để nghiên cứu mùn. Phê phán quan điểm hoá học của Oatxman cho rằng, mùn là chất dư thừa của quá trình phân giải xác thực vật. Uyliam viết: "Mùn không phải là chất trung gian", nguyên nhân rất đơn giản như sau:

+ Nếu là chất trung gian thì không tích lũy mà phải chuyển hoá đến sản phẩm cuối cùng. Trái lại trong tự nhiên mùn luôn được tích lũy.

+ Bất kỳ một chất trung gian nào đều có thành phần hoá học đơn giản hơn chất ban đầu được vùi vào đất.

Mùn có thành phần rất phức tạp, nếu đem so sánh với các thành phần phức tạp nhất như cấu tạo cơ thể động vật, thực vật thì mùn không thua kém.

+ Nếu mùn là chất trung gian thì nó không thể bao hàm tất cả

các nguyên tố của chất ban đầu, hoặc nếu có bao hàm tất cả các nguyên tố của chất ban đầu thì về hàm lượng phải ít hơn. Nhưng thực tế lượng đạm trong mùn lại thường nhiều hơn hàm lượng đạm trong một số xác thực vật ban đầu được vùi vào đất.

Vậy mùn là gì? Qua nhiều năm nghiên cứu, Uyliam đã kết luận: “Mùn là một loại sản phẩm tổng hợp được hình thành nhờ quá trình hoạt động sống của sinh vật ở trong đất”.

Uyliam cho rằng: tính chất của mùn và tính chất của các chất phân giải từ xác thực vật không có quan hệ trực tiếp. Các chất phân giải từ xác thực vật khác nhau sẽ cho ra các axit mùn khác nhau. Axit fulvic thường có ở quá trình phân giải của nấm, axit umic thường có ở quá trình phân giải của vi sinh vật kỵ khí. Axit humic thường có trong quá trình phân giải của vi khuẩn hiếu khí.

II- SỰ BIẾN ĐỔI CỦA KHU HỆ SINH VẬT ĐẤT TRONG QUÁ TRÌNH PHÂN GIẢI CHẤT HỮU CƠ VÀ HÌNH THÀNH MÙN

2.1. NHỮNG NGHIÊN CỨU VỀ MÙN

– Nhà bác học nữ, người Nga Kononopva sau nhiều năm nghiên cứu đã chỉ rõ số lượng và các loại hình sinh vật đất luôn luôn thay đổi theo quy luật. Đặc biệt là vi sinh vật đất, theo bà thì chúng được chia thành hai nhóm: *nhóm sinh vật lên men* và *nhóm sinh vật sinh tính đất*.

– Xác động vật, thực vật ngay sau khi vùi vào đất bị một số vi sinh vật phân giải mạnh. Kononopva gọi chung là khu hệ vi sinh vật lên men. Sau đó số lượng vi sinh vật lên men giảm dần và thay thế vào đó là các loại vi sinh vật sinh tính đất. Vi sinh vật lên men chủ yếu gồm các loại có khả năng phân giải tinh bột, các loại đường, phân giải protein và một số loại phân giải xenlulo, hemixenlulo.

+ Các loại vi sinh vật sinh tính đất thường gặp là những loại có khả năng phân giải các chất khó phân giải như lignin, sáp, kitin, xenlulo, hemixenlulo, các chất mùn của quá trình mùn hoá.

Kononopva đưa ra khái niệm thay thế tuần hoàn của khu hệ vi sinh vật đất. Bà cho rằng: “Điều kiện ngoại cảnh biến đổi sẽ dẫn đến sự biến đổi của khu hệ vi sinh vật. Hơn nữa quá trình hoạt động của bản thân vi sinh vật cũng là một trong những nguyên nhân quan trọng trong việc biến đổi ấy”.

- Nghiên cứu sự phân giải cỏ ba lá (1946), Kononopva và Bensicova nhận thấy: sau 3 - 5 ngày toàn bộ mặt lá bị một lớp nấm bao phủ. Đến 7 - 10 ngày thì tế bào lá cỏ đầy vi khuẩn và nguyên sinh động vật. Trong thời gian này có nhiều loại sinh vật đất, như: *Mucor*, *Rhizopus*, *Ruminococcus*, *Cytophaza*, các loại ấu trùng,...

- Cũng trong khoảng thời gian ấy, Kraxinhicôp và N.Kitina nghiên cứu quá trình phân giải rễ cây mục tíc và rễ hoà thảo. Đầu tiên Kraxinhicôp và N.Kitina nhận thấy các loại nấm phát triển nhanh và vi khuẩn không nha bào chiếm ưu thế. Qua một thời gian, các loại vi khuẩn giảm, xạ khuẩn dần dần xuất hiện và tăng lên dần.

- Nghiên cứu sự phân giải các xác thực vật đất bỏ hoang và đất kiềm mặn, Dubana và Koninenco cũng đạt được những kết quả giống như các tác giả trên. Dem trộn hai xác thực vật của hai loại đất trên và quan sát quá trình phân giải của vi sinh vật thì tác giả nhận thấy:

+ Những ngày đầu nấm và vi khuẩn phát triển rất nhanh. Trong 2-3 tuần sau thì vi khuẩn chiếm ưu thế. Trong thời gian đầu (mấy ngày đầu) vi khuẩn không nha bào phát triển mạnh, sau đó giảm xuống và giảm nhanh. Lúc này các khuẩn giao đoàn hình thành và phát triển nhanh. Trong các khuẩn giao đoàn này, các loại vi khuẩn có giáp mạc chiếm đa số. Ngoài ra còn có niêm vi khuẩn. Vi khuẩn có nha bào chiếm số lượng rất lớn và trong suốt thời gian này biến đổi không nhiều. Nếu so với số lượng vi khuẩn không nha bào thì lúc đầu ít hơn, nhưng càng về sau càng cao hơn.

+ Về nấm men *Saccaromyces* thì trong khoảng 10 ngày đầu có xuất hiện. Sau đấy không thấy xuất hiện nữa.

+ Sau 15 - 30 ngày, thấy nhiều nguyên sinh động vật đất, đặc biệt là biến trùng, chúng dùng vi khuẩn làm thức ăn. Sau đó biến trùng giảm dần và thay thế vào đó là các loại vi khuẩn có nha bào, vi sinh vật phân giải các chất hữu cơ bền vững như xenlulo, lignhin, kitin. Ngoài ra còn thấy số lượng xạ khuẩn tăng lên.

+ Sau 6 tháng thì xạ khuẩn và vi khuẩn có nha bào chiếm ưu thế, ngoài ra còn thấy các loại động vật đất như: giun, kiến, mối nấm, bọ hung,...

+ Đối với nấm thì trong suốt thời kỳ đầu nhiều hơn thời kỳ sau

và có biến đổi về loại hình. Garet (1956) chia nấm làm hai loại hình lớn trong quá trình phân giải này: nấm thông thường và nấm lignhin. Nấm thông thường bao gồm các loại có khả năng sử dụng đường và tinh bột cao, sinh trưởng và phát triển mạnh. Nấm lignhin bao gồm các loại hình chỉ có thể phát triển trên môi trường có ít đường và tinh bột. Do đó trong thực tế chúng phát triển chậm, không thể tranh chấp được với loại nấm thông thường. Thông thường lúc đầu nó chiếm địa vị thứ yếu, nhưng về sau khi đường và tinh bột trong môi trường giảm, nấm thông thường giảm thì nấm lignhin sẽ thay thế và chiếm ưu thế. Nấm lignhin thường là *Ascomycetes* và *Basidiomycetes*. Ngoài ra còn có các nấm phân giải xenlulo như *Aspergillus*, *Penicillium*.

2.2. ĐIỀU KIỆN TÍCH LŨY MÙN TRONG ĐẤT

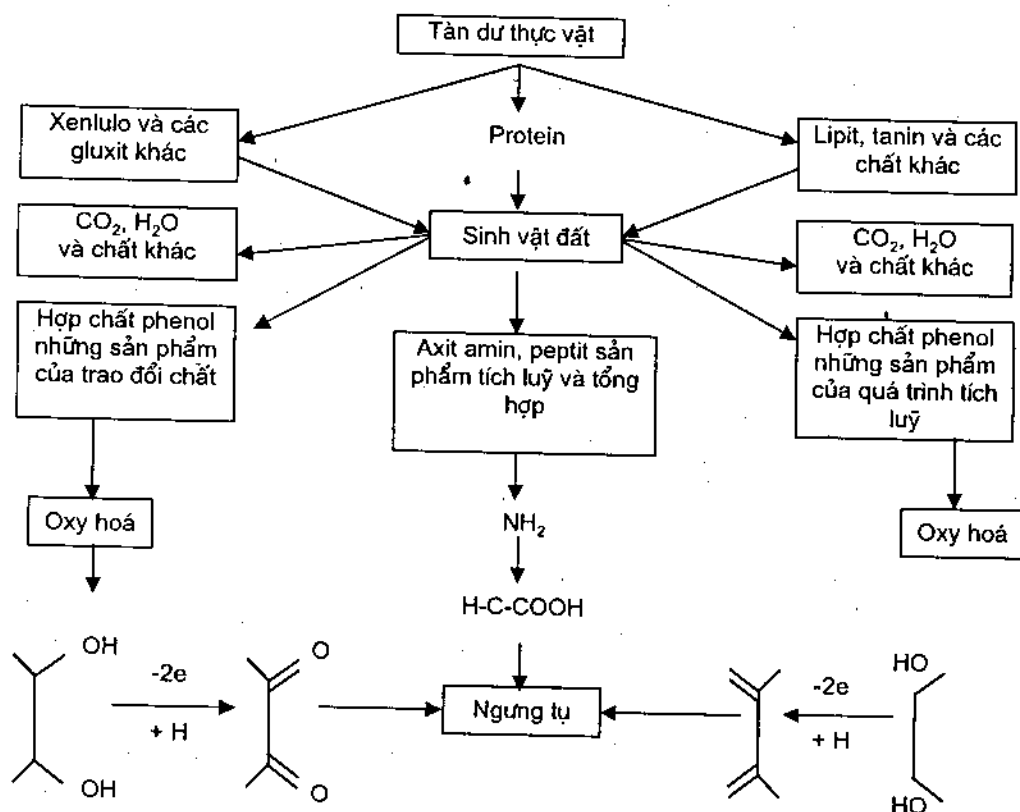
– Đầu tiên phải kể đến thành phần chất hữu cơ được vùi vào đất. Nếu xác thực vật còn non, nhiều đạm, vách tế bào mỏng, mức độ hoá gỗ thấp thì sự phân giải nhanh, hình thành mùn và mùn được tích lũy nhanh. Ngược lại, cây già, vách tế bào dày, hoá gỗ cao thì sự phân giải nhanh, sinh ra nhiều CO_2 và NH_3 . Nếu tỷ lệ $\text{C/N} > 25$ thì lúc đầu của quá trình phân giải chỉ sản sinh CO_2 , không tích lũy N vô cơ.

– Thành phần tổ chức tế bào động vật không có lignhin và xenlulo, hàm lượng N lại cao, do đó so với thực vật dễ bị phân giải hơn.

– Thành phần cây trồng sai khác nhau nhiều, quá trình vô cơ hoá hay mùn hoá của chúng nhanh hay chậm cũng khác nhau nhiều.

– Ngoài ra cùng một loại cây trồng, nhưng trong những điều kiện thời tiết khí hậu khác nhau thì các quá trình trên cũng khác nhau. Trong các yếu tố ngoại cảnh, thì nhiệt độ và độ ẩm ảnh hưởng rõ rệt nhất. Theo Mohr (Hà Lan), ở vùng nhiệt đới, sự hình thành mùn lớn hơn mùn bị phân giải. Ở vùng nhiệt độ và độ ẩm cao quá trình hình thành mùn cao, nhưng đồng thời quá trình phân giải cũng cao, kết quả là mùn ít được tích lũy. Ngược lại ở nơi úng thủy, mùn bị phân giải chậm hơn so với nơi không ngập nước, thoáng khí. Trong điều kiện úng thủy thì cả hai quá trình phân giải và tổng hợp mùn đều không thuận lợi. Thường thì độ ẩm trong đất khoảng 50 – 60% là tốt nhất.

2.3. SƠ ĐỒ HÌNH THÀNH MÙN CỦA KONONOPVA DƯỚI TÁC DỤNG CỦA SINH VẬT ĐẤT



Hình 2.1. Sơ đồ hình thành mùn của Kononopva

Qua sơ đồ cho thấy sản phẩm phân giải của tàn dư thực vật cho rất nhiều chất khác nhau, có chất giàu đạm như axit amin, có chất cấu trúc mạch thẳng, có chất có cấu trúc vòng thơm như quinon, hydroquinon và có cả chất ở thể khí.

III- TÁC DỤNG CỦA SINH VẬT ĐẤT TRONG QUÁ TRÌNH CẤU TẠO MÙN

3.1. CÁC GIẢ THUYẾT VỀ MÙN

Dưới tác dụng của vi sinh vật nói riêng và sinh vật đất nói chung, các chất hữu cơ vùi vào đất được phân giải và hình thành mùn. Bản

chất và thành phần mùn hiện nay vẫn là đề tài đang được tiếp tục nghiên cứu trên thế giới.

Những hợp chất mùn giàu cacbon (45 – 65%), oxy (30 – 40%). Cacbon và oxy một phần nằm trong các nhóm định chức OCH_3 , OH của phenol và $-\text{COOH}$. Trong mùn cũng có một ít N (2 – 6%) và một lượng nhỏ P, S và tro. Thuỷ phân axit các hợp chất mùn cho ta axit amin và thường còn cho chúng ta các dạng đường, đường amin (aminosucrose). Phần còn lại không thuỷ phân được một ít là lignin. Lignin được xem như là sườn hay là nhân. Nó quy định tính chất của hợp chất mùn. Phần khó thuỷ phân có thể được phân giải nhờ những biện pháp mạnh hơn; hoá phân (pyrolyse), thuỷ phân hay nung chảy bằng kiềm, hoặc bằng tác động của những chất khử (Na-amalgam), hay bằng những chất oxy hoá (KMnO_4 , H_2O_2 , HNO_3). Nếu trong quá trình thuỷ phân, oxy hoá hay khử trên mà giữ gìn cẩn thận thì người ta cũng thấy được một số sản phẩm dạng thơm (Durach và cộng tác viên, 1963) và cũng thấy có sự hiện diện của các nhân benzen.

Do đó người ta thừa nhận giả thuyết sau của Kasatochkin và cộng sự (1964): Những hợp chất mùn thường có nhân làm sườn mang tính chất của những chất thơm và (mang theo nó) những nhánh bên.

Từ những hợp chất khác nhau về mùn, chúng ta có thể thừa nhận giả thuyết trên về các mặt sau:

- Tính chất quan trọng của nhân, bản chất các đơn vị cấu tạo nhân, vị trí và cách liên kết giữa chúng.

- Sự cấu thành các nhánh bên và các gốc định chức. Tiurin dùng NaOH 0,1N tách các axit mùn thành hai nhóm (axit humic và axit fulvic). Ngoài 2 nhóm axit mùn kể trên. Tiurin còn xác định trong mùn có chất màu đen không tan trong dung dịch kiềm loãng, liên kết chặt với các chất khoáng trong đất, ông gọi là nhóm humin.

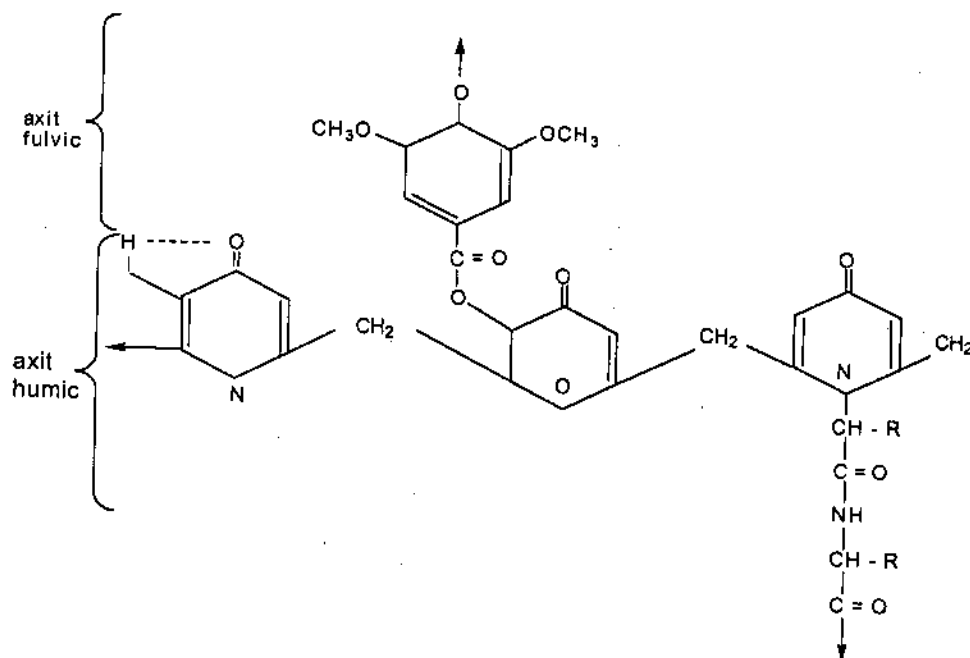
Giả thuyết của Felbeck (1965) về bản chất của axit fulvic và axit humic:

+ Nhóm axit humic:

Hình thành ở môi trường trung tính hay hơi kiềm, có màu đen hoặc xám đen. Khối lượng phân tử trung bình từ 800 – 1.500, có kết cấu vòng thơm. Ví dụ, khi oxy hoá axit humic bằng HNO_3 , KMnO_4 ,... người ta thấy những dẫn xuất của phenol và quinon, axit bezoic và

axit cacbonic cũng như các axit hữu cơ khác. Ngoài ra trong axit humic còn có đạm. Hàm lượng các nguyên tố trung bình vào khoảng: C (52 – 58%), H (3,3 – 3,8%), O (31,4 – 39%), N (3,6 – 4%).

Giả thuyết của Felbeck (1965) về cấu trúc của axit fulvic và axit humic:



Hình 2.2. Cấu trúc của axit humic

+ Nhóm axit fulvic:

Hình thành nhiều ở môi trường chua, màu vàng hay vàng nhạt. Hàm lượng các nguyên tố trong thành phần của axit fulvic trong các loại đất trung bình là: C (45 – 48%), H (5 – 6%), O (43 – 38,5%), N (1,3 – 5%).

+ Nhóm humin:

Nhóm này có phân tử lượng lớn nhất, có thể là những axit mùn tác động với phần khoáng của đất, mất nước và trùng hợp lại. Humin hình thành một màng lưới kết chặt với keo sắt và axit humic, có thể gọi là phức chất vô cơ – hữu cơ, có tác dụng trong việc hình thành kết cấu đất. Nhóm humin chỉ thấy xuất hiện nhiều trong các loại đất trung tính và trong quần thể sinh vật có nhiều *Cytophaga*.

Dragunop cho rằng phân tử axit humic trong đất đá đen Secnozem có 4 nhóm COOH, 3 nhóm OH.

3.2. VI SINH VẬT TRONG QUÁ TRÌNH HÌNH THÀNH MÙN

Vacne (1914) đã nghiên cứu nhiều loại vi sinh vật có khả năng sử dụng phenol và những dẫn xuất của phenol. Vactecman (1915) đã xác nhận *Penicillium glaucum* sử dụng phenol làm nguồn năng lượng. Ngoài ra loại vi sinh vật này có khả năng sử dụng pirocatein, hydroquinon, các axit protocatein, axit galic, axit oxybenzoic.

Butkevis đã nêu: Nấm mốc *Aspergillus* và *Cytomyces* có thể đồng hoá được nhiều loại vi khuẩn. Những loại vi khuẩn này thuộc họ Coccaeae, Myxobacteriaceae, Bacillaceae, Spirillaceae,... Chúng có thể phân giải crezon, naphthalin, floroglyxin, metaoethoparafenol, rezocxin và toluen.

Temin (1930) nhận thấy đồng thời với quá trình oxy hoá cataxin phenol, crezon bởi nhũ tương của vi sinh vật có quá trình tạo ra oethobenzen, quinon.

Những công trình của Tâyxon (1927, 1928, 1929, 1932) cho thấy một số vi sinh vật phân lập lấy từ đất dầu lửa có khả năng oxy hoá các cacbua thơm đơn giản và phức tạp có 2 - 3 vòng phenol.

Năm 1927, Tâyxon đã phân lập được loài vi khuẩn *Bacterium naphthalinicus* có thể phân giải naphthalin. Năm 1928, ông lại phân lập được vi khuẩn *Bacterium fenapthalinicus*, *Phenapthalicus*. Những loại vi khuẩn này có khả năng phân giải các hợp chất có 3 vòng thơm.

Tâyxon (1932) đã tìm ra được cơ chế phân giải các hợp chất có vòng thơm dẫn đến sự hình thành những dẫn xuất của benzen. Ví dụ phenantren khi phân giải sẽ cho xaligonin, oethooxibenzenandehyt, axit xalixilic, pirocatexin.

Thí nghiệm của Kononopva thấy rằng khi nuôi cấy nấm mốc *Aspergillus niger* và *Penicillium* trong môi trường chỉ có đường là nguồn cacbon duy nhất thì sau một thời gian cũng tạo ra chất màu đen giống mùn. Ngoài ra còn thấy protein, axit amin, những hợp chất thơm như pirocatexin, axit protocatexit. Những chất màu đen được vi sinh vật tạo ra trong trường hợp này được gọi là những dạng đầu tiên của axit humic.

Jayasankar và Bhat (1966) cho thấy: Những hợp chất có gốc phenol đều là những hợp chất không bền vững, có thể bị nhiều loại vi sinh vật phân giải và chúng cũng có thể bị oxy hoá để cho quinon hay

những gốc tự do. Cả hai quá trình oxy hóa khí và phân giải có thể do cùng một loại vi sinh vật tiến hành.

Oxy hóa những phenol tương đối dễ dàng và nhanh tùy theo bản chất của hợp chất nghiên cứu. Thường nó được tiến hành trong môi trường kiềm và tùy tình hình có thể bắt đầu từ pH = 7 và có thể xúc tác bởi Fe^{2+} , Cu^{2+} . Quá trình cũng có thể tiến hành trong điều kiện axit hay trung tính do các enzym phenolaza và oxydaza ít chuyên tính. Enzym oxydaza có khả năng dùng phenol có rất nhiều ở các loại vi sinh vật trong đất.

Nhìn chung, dưới tác dụng của nhiều loại vi sinh vật, các hợp chất có vòng thơm phức tạp trong đất có thể bị phân giải để hình thành các dạng quinon. Những quinon này kết hợp với axit amin, polypeptit tạo ra những sản phẩm đầu tiên của axit humic.

3.3. XENLULO TRONG QUÁ TRÌNH HÌNH THÀNH MÙN

Xenlulo bị phân giải và tham gia vào quá trình hình thành mùn là vấn đề rất quan trọng được nhiều nhà nghiên cứu chú ý đến. Về vấn đề này có hai quan điểm:

- Một số người cho rằng xenlulo là nguồn hình thành mùn chủ yếu.
- Một số người cho rằng xenlulo không phải là nguồn hình thành mùn.

Quan điểm 1: Xenlulo là nguồn hình thành mùn chủ yếu

Vinogradski đã dày công nghiên cứu, theo ông thì xenlulo hoàn toàn bị phân giải thành những hợp chất hữu cơ phân tử lượng nhỏ CO_2 và H_2O là hoàn toàn không chính xác. Một số bộ phận xenlulo bị phân giải thành CO_2 và H_2O . Một số bộ phận không nhỏ khác biến thành chất dẻo có phân tử lượng lớn. Năm 1929, Vinogradski nghiên cứu tỉ mỉ xenlulo bị phân giải trong điều kiện có oxy. Ông cho rằng *Cytophaga hutchisonii* có thể chuyển hóa đại bộ phận xenlulo thành năng lượng. Trong khi phân giải có một số chất hoàn toàn tan trong kiềm và khi cho axit vô cơ thì kết tủa. Trong quá trình phân giải xenlulo thấy xuất hiện chất dẻo. Dem chất dẻo quan sát dưới kính hiển vi thấy có nhiều tế bào vi khuẩn. Tế bào này tự dung giải. Dạng của tế bào vi khuẩn được giải phóng sẽ kết hợp với chất dẻo dạng keo thành dạng protein. Sản phẩm này tương đối phức tạp và có tính đề kháng lớn đối với tác dụng của vi sinh vật. Ông gọi phức chất ấy là mùn vô sắc hay mùn trắng. Mùn trắng có tác dụng rất lớn trong quá

trình hình thành mùn. Vinogradski không phân biệt giữa mùn thô và mùn nhuyễn, ông mới chỉ nêu lên tác dụng của vi sinh vật phân giải xenlulo và sau đó là chất mùn trắng.

Để tìm hiểu sâu vấn đề này, Ximola nuôi cấy vi sinh vật phân giải xenlulo như *Cellbizio*, *Cellfacicula*, *Cytophaga* đều tìm được chất có thể tan trong kiềm và nếu tác dụng với axit vô cơ thì kết tủa như ở công trình của Vinogradski. Ximola còn nghiên cứu vi sinh vật có khả năng phân giải xenlulo trong điều kiện có oxy thấy hình thành những chất màu vàng có tính axit và không bay hơi. Chất này khó tan trong este, có thể khử đối với dung dịch phenol. Ximola chú ý đến sự khác và giống nhau giữa chất có màu vàng trên. Ông cho rằng đây có thể là những gốc metoxin.

Vacne cũng nghiên cứu vấn đề phân giải xenlulo. Ông đồng ý với quan điểm của Vinogradski. Trên giấy lọc, trong quá trình bị phân giải có hình thành chất dẻo, có thể đó là chất dung giải của tế bào vi khuẩn. Chất này kết hợp với chất được hình thành trong khi phân giải xenlulo kết hợp thành dạng protein. Như vậy chất dẻo được hình thành dưới tác dụng của vi sinh vật. Nhưng còn hai vấn đề chưa được sáng tỏ, đó là sản phẩm của quá trình phân giải và cấu tạo hoá học của chất dẻo.

Imxenhixki đã thí nghiệm với 0,172g xenlulo dưới tác dụng của *Cytophaga* đã cho 0,093mg CO₂, và 0,078g chất dẻo màu vàng. Như thế có nghĩa là, khi phân giải xenlulo thì đại đa số biến thành keo dẻo. Chất này có tác dụng rất lớn trong quá trình hình thành mùn, còn trong quá trình phân giải, một phần xenlulo đã biến thành CO₂.

Kononopva làm thí nghiệm phân giải tàn dư thực vật. Bà nhận thấy vi sinh vật có thể hình thành keo dẻo sát tổ chức của tế bào xenlulo. Sau đó trong niêm dịch của vi khuẩn phát hiện có mùn (1943). Như vậy trong quá trình xenlulo bị phân giải thì đã có quá trình hình thành mùn. Chất mùn này có thành phần gần giống axit humic:

C = 54 – 57%; H = 3,5 – 6,0%

O = 30 – 34%; N = 4 – 5%

Về cấu tạo mùn, Kononopva nhận thấy có các gốc COOH, OH. Qua xử lý kiềm thấy có nhân thơm. Bà cũng đã chứng minh mùn được hình thành từ các loại thực vật khác nhau về cấu tạo và thành phần đều giống nhau. Điều này nói lên quá trình hình thành mùn không

phải là ngẫu nhiên mà có quy luật. Theo bà, nguồn gốc của mùn là các hợp chất hữu cơ có đạm và các axit có vòng thơm như axit tannic,... kết hợp lại mà thành. Các chất hữu cơ có đạm thường là thành phần tế bào chất của niêm vi khuẩn. Xenlulo là nguồn nguyên liệu cần thiết để niêm vi khuẩn phát triển. Khi xenlulo trong hệ thống tổ chức thực vật phân giải thì sản phẩm phân giải xenlulo và sản phẩm dung giải của tế bào vi khuẩn sẽ phát sinh phản ứng tái hợp thành sản phẩm khác. Sự tái tổ hợp này tiến hành trong điều kiện bình thường.

Hiện nay nhiều tài liệu đã chứng minh xenlulo có tác dụng trong sự hình thành mùn. Xenlulo là nguồn năng lượng để vi sinh vật sinh trưởng, phát triển. Trên cơ sở tác dụng của những chất dung giải từ tế bào các loại vi sinh vật với các chất được phân giải từ xenlulo mà tiến hành quá trình hình thành mùn.

Quan điểm 2: Xenlulo không phải là nguồn chủ yếu hình thành mùn

Theo quan điểm này thì xenlulo trong đất bị rất nhiều loại vi sinh vật phân giải thành những hợp chất hữu cơ có phân tử lượng nhỏ. Những phân tử này không thể hình thành mùn vì mùn có phân tử lượng rất lớn.

3.4. HEMIXENLULO TRONG QUÁ TRÌNH HÌNH THÀNH MÙN

Trong đất, hemixenlulo bị rất nhiều loại vi sinh vật phân giải. Các loại vi khuẩn như: *Bacillus mesentericus*, *Bacillus subtilis*, *Clostridium pasteurianum*, *Mucor stolonifer*,... có hệ thống enzym đặc biệt biến hemixenlulo thành những hợp chất hữu cơ đơn giản. Ví dụ, quá trình phân giải pectin, propectin do các poligalacturonic kết hợp mà thành. Poligalacturonic có thể bị các loại vi sinh vật có men pectinaza thủy giải thành axit galacturonic, arabinozơ, xilozơ, axit axetic, rượu metylic, axit pectinic,...

Các chất này lại tiếp tục bị phân giải thành các chất đơn giản. Vậy trong quá trình hình thành mùn, hemixenlulo tham gia như thế nào và tác dụng ra sao?

Để tìm hiểu vấn đề này, Rudacop đã chú ý đến các axit galacturonic. Ông thấy chúng có tính ổn định lớn đối với vi sinh vật. Chúng dễ bị cố định trong các loại mùn. Trong mùn chúng chiếm khoảng 12 – 13%. Sở dĩ chúng dễ bị cố định vì dễ có phản ứng với

protein để thành thể phức tạp khó tan. Rudacop cho rằng axit humic có thể do protein của vi sinh vật bị phân giải rồi phản ứng với axit galacturonic. Sản phẩm của phản ứng này là một chất keo dẻo và có tác dụng tốt cho kết cấu đoàn lạp của đất.

Rudacop cũng thấy rằng, vi khuẩn nốt sần rễ cây họ đậu không những có thể sống gần lông hút mà còn tập trung gần bề mặt của rễ cây, và đi vào rễ cây là nhờ một số vi sinh vật khác có khả năng phân giải pectin giữa tế bào rễ. Pectin được phân giải một phần làm thức ăn cho vi sinh vật nốt sần (lúc mới xâm nhập) và các loại vi khuẩn khác, một phần sẽ phản ứng với protein của cơ thể vi sinh vật để tạo thành nguyên liệu hình thành mùn.

Rudacop nhận thấy một số vi khuẩn như *Bacillus macerans*, *Bacillus mesentericus*,... đều có enzym pectinaza. Nhờ enzym này, pectin không tan trong nước trở thành tan trong nước.

Giả thuyết của Rudacop còn có một số điểm chưa được nghiên cứu kỹ:

1) Chưa xác định trong điều kiện bình thường của đất, những loại axit galacturonic và protein hình thành thể phức hợp như thế nào?

2) Nếu trong thực tế có sự hình thành thể phức hợp ấy thì ở đây cũng chưa chứng minh được chất ấy và mùn có những điểm gì giống nhau. Dù sao đi nữa giữa mùn và thể phức hợp protein – galacturonic có những điểm khác nhau. Ở mùn, phần không phải protein có dẫn xuất của benzen còn ở thể phức hợp không có dẫn xuất ấy.

3) Sản phẩm của chất dung giải tế bào vi khuẩn và axit galacturonic có tính dẻo. Nhưng tính dẻo này không thể là mùn.

Dù rằng quan điểm của Rudacop còn nhiều chỗ chưa được chứng minh nhưng có ý nghĩa lớn đối với sự giải thích hemixenlulo trong quá trình hình thành mùn và bước đầu chứng minh được: để tham gia quá trình hình thành mùn, hemixenlulo phải qua tác động của vi sinh vật. Nó cũng nổi lên được trong đất đồng thời với quá trình phân giải hợp chất hữu cơ có quá trình tổng hợp và mùn là sản phẩm của quá trình tổng hợp ấy.

3.5. LIGNIN TRONG QUÁ TRÌNH HÌNH THÀNH MÙN

– Lignin chiếm khoảng 30% trong cây lấy gỗ và 10 – 20% trong cỏ, là chất hữu cơ rất phức tạp. Đơn vị cấu trúc của nó là dẫn xuất phenin propan. Thực vật khác nhau thì bản chất của những cấu trúc

nguyên tố lignhin cũng khác nhau. Ví dụ, nhờ có sự oxy hoá hoặc bằng nitrobenzen, người ta thấy trong lignhin của cây thông có hợp chất kiểu vanilin. Lignhin của một số cây khác có vanilin, có anhydrit xirenin, ở một số cây hàng năm còn có cả paraxybenzonhehit.

- Kết quả của nhiều nghiên cứu cho thấy rằng: Lignhin có cấu trúc nhất định, là chất trùng hợp có cấu trúc phức tạp, đa dạng. Điều này được giải thích bằng sự khác nhau của đơn vị cấu trúc trùng hợp (monome) và các kiểu liên kết khác nhau giữa các cacbon với nhau và cacbon với các yếu tố khác (C-C, C-O). Trong lignhin có chứa nhiều nhóm định chức khác nhau như metoxin, phenol, rượu.

- Sự tạo thành lignhin là quá trình sinh hoá học và xảy ra theo nhiều con đường khác nhau. Mamkei (1952) khi nghiên cứu quá trình oxy hoá trong gỗ đã đi đến kết luận là: sự tạo thành lignhin nhất thiết phải là quá trình oxy hoá, men hoá những hợp chất monome thơm ở dạng tự do như glucosit, coniferin và những dẫn xuất của nó.

Khi hoá gỗ, những sản phẩm oxy hoá này sẽ tự chặt lại thành lignhin.

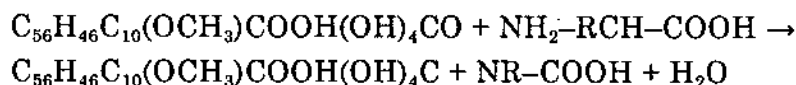
Trên đây đã trình bày tóm tắt một số nghiên cứu về chất lignhin.

- Truxop đã làm thí nghiệm quan sát quá trình mùn hoá lignhin. Ông đã dùng hai chậu đựng mùn cưa, hai chậu đựng lòng trắng trứng, để ở nhiệt độ 37°C và các xử lý khác đều giống nhau. Sau một thời gian, ông nhận thấy ở các công thức khác nhau, quá trình mùn hoá cũng khác nhau. Trong công thức có lòng trắng trứng, quá trình mùn hoá nhanh hơn một ít và chất được hình thành có màu đen. Các công thức khác, quá trình mùn hoá chậm và chất hình thành có màu nâu. Chậu chỉ có lòng trắng trứng, sự biến hoá có khác các chậu kia nhưng cũng có màu nâu. Từ đấy Truxop cho rằng: Mùn hoá trong tự nhiên do sự kết hợp chặt chẽ giữa những sản phẩm phân giải của protein và lignhin.

- Tiếp tục phát triển luận điểm này, Oatxman cho rằng: "Chất mùn trong đất là thể phức tạp lignhin - protein". Theo lý luận này thì mùn trong đất là một thể phức hợp chưa có tên rõ ràng. Để dễ hiểu, người ta đặt tên thể phức hợp này là nhân mùn. Để giải thích vấn đề này, những người theo luận điểm trên đã nhận định: Lignhin là thành phần rất ổn định của xác thực vật, vì sinh vật không thể phân giải được. Phân tử lignhin bao gồm các nhân phenol furan và

các gốc metoxin gần giống như axit humic. Nhân mùn lignhin – protein có đặc tính của axit humic dễ bị tan trong kiềm và kết tủa trong axit, có 2 – 3% N. Đối với vi sinh vật, chất mùn có tính chất kích thích.

Từ những nhận định trên Oatxman đưa ra phản ứng giữa lignhin – protein như sau:



– Trong nhiều nghiên cứu, Kononopva đã chú ý đến nguồn gốc các chất khác nhau trong tổ chức thực vật. Bà nhận thấy không chỉ có lignhin và những hợp chất có vòng thơm mới có gốc phenol mà các chất khác cũng có. Chúng có thể tham gia hình thành mùn.

Rất nhiều bộ phận của thực vật có axit tannic, có protein. Những bộ phận này cũng có thể tham gia quá trình hình thành mùn. Như vậy lignhin là chất đặc biệt để mùn hoá như của quan niệm Oatxman là không đúng. Hơn nữa Oatxman và những người cùng quan điểm cho rằng lignhin tan trong kiềm. Dung dịch này bị oxy hoá biến thành màu sẫm là hoàn toàn chưa được chứng minh rõ ràng.

– Từ lâu người ta đã chứng minh rằng, dung dịch kiềm của mùn trong không khí dần dần biến thành màu nâu sẫm. Quá trình biến màu này rất giống sự biến màu của dung dịch kiềm của các dẫn xuất benzen. Vậy sự biến thành màu sẫm của mùn không phản ánh sự có mặt tất nhiên của lignhin.

– Về vấn đề phức hợp protein – lignhin, nhiều nhà nghiên cứu thừa nhận rằng, phức hợp này có nhiều tính chất hoá học giống axit humic tự nhiên. Nhưng tính chất này tan trong kiềm và kết tủa trong axit không đủ để chứng minh chúng gần giống nhau, vì trong thực tế có rất nhiều chất khác nhau có tính chất trên.

– Vi sinh vật phân giải lignhin hiện nay gồm một số nấm như *Merilus lacrymans*, *Polysporus annosus*, *Mucor clamydosporus*, *racemosus*, *tramelespini*, *Agracicus mebaluris*,...

Kết quả phân giải của chúng một phần bị oxy hoá, một phần khoáng hoá và một phần đi vào sự chuyển hoá mới. Các sản phẩm phân giải này sẽ cùng với protein của tế bào vi sinh vật và những sản phẩm có đạm khác do vi sinh vật tổng hợp được phản ứng với nhau và kết quả các phản ứng ấy có thể là nguyên liệu hình thành mùn trong đất.

IV- TÁC DỤNG VI SINH VẬT TRONG KẾT CẤU ĐẤT

– Bên cạnh việc tích lũy các chất dinh dưỡng, mùn còn giữ một chức năng rất quan trọng khác, đó là tác động đến sự bền vững kết cấu của đất.

Khả năng này được Uylam nghiên cứu nhiều. Ông là người đầu tiên đã đề ra lý thuyết về kết cấu đất, nêu bật ý nghĩa của vi sinh vật đất trong kết cấu đất.

Theo ông thì kết cấu nhỏ mịn của đất được tạo thành trước hết là nhờ axit humic, axit này được sản sinh ra do kết quả hoạt động của vi sinh vật hiếu khí. Các muối của axit humic tác dụng với ion Ca^{2+} làm trương lên và gắn các hạt đất dính lại với nhau. Những lập luận cơ bản này của Uylam về sau được hàng loạt các công trình nghiên cứu ủng hộ. Trên nguyên tắc, các nhà nghiên cứu đều ủng hộ quan điểm của Uylam, nhưng về nội dung cụ thể thì sự giải thích của các tác giả không thống nhất.

Genxe cho rằng trong quá trình phân giải xác hữu cơ, thì đầu tiên đó là nấm mốc, chúng phát triển thành một lượng sợi nấm lớn. Sau đó bị vi khuẩn phân giải thành chất dẻo tạo nên kết cấu đoàn lap. Chất keo dẻo này chính là mùn hoạt tính mà Uylam đã nêu.

Ở trường hợp khác cho thấy, trong quá trình sinh trưởng, phát triển của vi khuẩn *Pseudomonas* tiết ra niêm dịch. Niêm dịch này Genxe cũng gọi là mùn hoạt tính.

Rõ ràng niêm dịch và mùn hoạt tính của Uylam nêu ra không giống nhau. Chất keo dẻo để kết gắn trong kết cấu đất là một chất hữu cơ đặc biệt do quá trình tái tổng hợp sinh ra, không phải là niêm dịch tiết ra trong quá trình sống của vi sinh vật.

Genxe cho rằng khi bón vào đất, các chất hữu cơ dễ phân giải (xenlulo, protein) thì kết cấu đoàn lap của đất được cải thiện. Bón 5% (tính theo cacbon) những chất này thì đoàn lap ở đất Secnozem từ 17,5% tăng lên 41%. Theo Genxe, trong quá trình cải thiện kết cấu của đất, vai trò quan trọng nhất thuộc về vi sinh vật. Quá trình đó xảy ra như sau: Khi phân giải các hữu cơ có nguồn gốc động vật hay thực vật, vi khuẩn tăng cường phát triển và tổng hợp các hợp chất khác nhau ở trong thành phần cơ thể của chúng. Những chất này tự biến đổi trong quá trình tự tiêu tự giải và làm thành chất mùn hoạt tính, gắn chặt các hạt đất.

Trong khi phân giải những hợp chất hữu cơ bón vào đất, vi sinh vật tiết ra chất dẻo. Những chất này cải thiện kết cấu đất. Thí nghiệm trong điều kiện vô trùng chứng tỏ rằng có thể cả vi khuẩn và nấm đều tham gia vào kết cấu đoàn lạp. *Cytophaga*, vi khuẩn nốt rỗ, *Azotobacter*, *Aspergillus*, *Trichoderma*,... đều có thể tham gia quá trình này.

Rudacop đã làm thí nghiệm với dung dịch cỏ ba lá và vi khuẩn *Clostridium polmyxa*, vi khuẩn này có enzym protopectinaza. Dưới tác dụng của enzym protopectinaza, propectin được phân giải thành axit galacturonic. Axit này gặp sản phẩm tự dung giải của vi sinh vật là protein, kết hợp với nhau thành mùn hoạt tính. Mùn hoạt tính có tác dụng rõ trong kết cấu đoàn lạp của đất.

Nhìn chung vai trò của vi sinh vật có tác dụng rất quan trọng trong việc tạo thành kết cấu đất. Mỗi loại vi sinh vật với đặc tính riêng của mình và trong quá trình sinh trưởng, phát triển nó đã góp phần tích cực vào sự tạo thành kết cấu đất.

V- VI SINH VẬT TRONG QUÁ TRÌNH PHÂN GIẢI CHẤT MÙN

Vinogradski đã nghiên cứu sự phân giải các hợp chất của mùn dưới tác dụng của vi sinh vật tại chỗ. Tepper (1962) đã xác nhận số liệu của Vinogradski và thấy rằng không có một tập đoàn vi sinh vật chuyên tính của quá trình phân giải mùn.

Kester (1950), I.V.Aleksandrova (1953), Schonevalder (1958), Tepper (1962), Szegi (1967),... nhận thấy xạ khuẩn có vai trò quan trọng trong quá trình phân giải chất mùn. Ví dụ: *Proactinomyces*, *Nocardia*, *Mycobacteries*, *Streptomyces*.

Ngoài xạ khuẩn phân giải chất mùn, người ta còn kể đến vi khuẩn: *Pseudomonas fluorescens*, *Achromobacter*, *Serratia*, *Bacillus cereus*, *Arthrobacter* vi khuẩn hình cầu (Mishustin và Nikitin, 1961; Volkoca, 1961; Mathur và Paul, 1967).

Ngoài vi khuẩn và xạ khuẩn phân huỷ chuyển hoá chất mùn, còn có nấm *Penicillin*, *Aspergillus* (Drozdowicz và Horszczaruck, 1966; Mishustin và Nikitin, 1961), *Spicaria*, *Cephalosporum* (Aleksandrova, 1953) và *Basidiomycetes*, *Polystinus*, *Nematoloma*, *Polysporus* (Burges và Latter, 1960).

Aleksandrova (1953) cho rằng trong tự nhiên, sự phân giải các axit mùn là do rất nhiều loại sinh vật đất khác nhau, nhất là những vi sinh vật có khả năng phân giải các hợp chất có vòng thơm.

Theo giả thuyết của Sway và Ladd (1962), tập đoàn vi sinh vật nhiều loại hình có thể sản sinh ra đủ tất cả các loại enzym cần thiết để cắt đứt các dây liên kết có trong axit humic. Ông cho rằng, có thể vi khuẩn tác động lên những cấu trúc vòng ngoài, còn xạ khuẩn thì phân giải nhân mùn với sự khử màu môi trường.

Nhìn chung không có một tập đoàn vi sinh vật đặc biệt trong quá trình phân giải các axit mùn.

Quá trình phân giải axit mùn là một hiện tượng oxy hoá, được thực hiện nhờ những sinh vật đất sản sinh ra các enzym có thể chuyển hoá các chất thơm (phenolase, peroxydase) và một số enzym có thể chuyển hoá các gốc COOH của các axit hydroxybenzoic ở nhánh bên.

VI- ĐỘNG VẬT ĐẤT TRONG QUÁ TRÌNH PHÂN GIẢI CÁC CHẤT VÀ KẾT CẤU ĐẤT

6.1. CÁC NHÓM ĐỘNG VẬT ĐẤT VÀ QUÁ TRÌNH TẠO ĐẤT

– Một trong những giai đoạn đầu tiên của quá trình hình thành đất là sự phân huỷ xác vụn hữu cơ thực vật. Xác thực vật bị phân huỷ tạo nên các hợp chất hữu cơ, các thành phần khoáng chất khác nhau. Sự tạo nên các hợp chất hữu cơ và các thành phần khoáng của đất xảy ra nhờ hai quá trình đã nói ở phần trên là sự mùn hoá và sự khoáng hoá. Một phần những chất phân rã này bị khoáng hoá, một phần khác được chuyển sang một dạng chất hữu cơ đặc biệt của đất gọi là mùn. Các nhóm vi sinh vật và động vật không xương sống đất đóng vai trò quan trọng trong các quá trình phân huỷ này.

– Động vật không xương sống trong đất hoại sinh gồm nhiều nhóm phân loại khác nhau. Chúng rất khác biệt và đa dạng trong phổ thức ăn, trong đặc điểm sinh lý, hình thái của ống tiêu hoá, vì thế đặc điểm và khả năng phân huỷ xác vụn hữu cơ của chúng cũng khác nhau. Chúng có vai trò và chức năng khác nhau trong quá trình phân huỷ cơ học và hoá sinh học xác vụn hữu cơ, trong quá trình mùn hoá và khoáng hoá vật chất. Ngoài ra, chúng còn góp phần đáng kể trong

việc di chuyển và phát tán lượng mùn này vào sâu trong các lớp đất và rải rác theo bề ngang trên bề mặt đất, tạo điều kiện cho nhiều nhóm vi sinh vật có phạm vi hoạt động rộng hơn cả về rộng và sâu của đất.

– Các kết quả điều tra của Lee K. và Pankhurst (1992) cho thấy, sinh lượng tươi của ba nhóm động vật chính, sống ở vùng nhiệt đới và ôn đới như sau:

+ *Microfauna* (Động vật nguyên sinh và giun tròn): Bao gồm những động vật có cơ thể nhỏ hơn 2mm: tương ứng đạt 0,5 và 50kg khối lượng tươi tính trên 1 ha.

+ *Mesofauna* (Chân khớp bé và giun trắng): Bao gồm những động vật có cơ thể trong khoảng 2 – 10mm: cả hai nhóm chân khớp bé và giun trắng tương ứng đạt 20 và 200kg khối lượng tươi tính trên 1 ha.

+ *Macrofauna* (Giun đất): Bao gồm những động vật có cơ thể lớn hơn 10mm: ở vùng nhiệt đới và ôn đới, tương ứng đạt 300 và 900kg khối lượng tươi tính trên 1ha.

– Tuy vào đặc điểm và khả năng tham gia vào các quá trình phân huỷ xác hữu cơ và tạo đất, người ta có thể phân biệt 5 nhóm động vật đất phân huỷ xác vụn hữu cơ như sau:

+ Nhóm động vật giúp xé nhỏ và nghiền xác vụn thực vật theo phương thức cơ học, qua đó làm tăng bề mặt tiếp xúc của xác vụn hữu cơ với hệ vi sinh vật, chất khoáng, nước và mưa gió.

+ Nhóm động vật có khả năng tiết enzym riêng nhờ cộng sinh được với hệ vi sinh vật, nên có thể phân huỷ các thành phần tế bào có chứa chất xenlulo, để giải phóng lignin dưới dạng hợp chất mô xenlulo.

+ Nhóm động vật tạo sản phẩm trao đổi đạm là amoniac, mà trong ruột của chúng có thêm thành phần lignin, nên chúng có ý nghĩa quan trọng trong quá trình mùn hoá, tạo chất thải là phân hữu cơ.

+ Nhóm động vật tham gia vào quá trình phân huỷ, mà trong ống ruột của chúng xác vụn thực vật đã được khoáng hoá hoặc mùn hoá một phần.

+ Nhóm động vật có khả năng di cư tích cực theo chiều thẳng đứng và theo bề mặt đất, nên góp phần luân chuyển xác vụn hữu cơ và khoáng chất, làm tăng độ tơi xốp cho đất, kích thích các quá trình phân huỷ xác thực vật ưa khí.

6.2. QUÁ TRÌNH PHÂN HUỶ XÁC HỮU CƠ DO CÁC NGUYÊN SINH ĐỘNG VẬT VÀ ĐỘNG VẬT ĐẤT

6.2.1. Nguyên sinh động vật đất (Protozoa)

Trong cấu trúc quần xã động vật nguyên sinh, về sinh lượng thì nhóm trùng chân giả (*Sarcodina*) luôn chiếm phần chủ yếu; còn nhóm trùng roi (*Flagellata*) lại có số lượng lớn nhất. Nguyên sinh động vật đất có vai trò quyết định nhiều hoạt tính sinh học của đất, bằng cơ chế điều chỉnh và khống chế số lượng các nhóm *Bacteria*.

Các nghiên cứu cho thấy, có mối tương quan nghịch về số lượng giữa hai nhóm động vật nguyên sinh và *Bacteria*. Chính sự biến động số lượng của động vật nguyên sinh đã gây nên sự biến động số lượng theo mùa và trong ngày của nhóm vi khuẩn thực vật (Bacteriofore). Trong phổ thức ăn của mình, động vật nguyên sinh có biểu hiện ưa thích khác nhau. Chúng còn ăn theo thứ tự ưa thích, từ vi khuẩn, nấm men, nấm mốc, một số nhóm tảo, xạ khuẩn và cuối cùng là phần lớn nấm và tảo. Ngoài ra, chúng còn ăn một số vụn hữu cơ, là sản phẩm của các nhóm động vật nguyên sinh và vi sinh vật đất khác. Nhờ khả năng sống cộng sinh với một số nhóm vi khuẩn nên chúng có thể tiêu hoá được một số mô tế bào xenlulo. Ở sinh cảnh rừng, nguyên sinh động vật thường ăn thân nấm; ở vùng sa mạc và vùng cực Bắc, Nam chúng chọn vi khuẩn làm thức ăn; còn ở những nơi khác chúng lại tìm tảo hoặc vụn hữu cơ.

Động vật nguyên sinh có ảnh hưởng đối với sự luân chuyển của các nguyên tố dinh dưỡng của thực vật, tham gia trực tiếp vào quá trình giải phóng nitơ qua sự phân huỷ thân giả của nấm. Sản phẩm bài tiết cuối cùng của quá trình trao đổi đạm của chúng là amoniac. Hoạt động tiêu hoá của động vật nguyên sinh đồng thời kích thích sự giải phóng phosphat.

6.2.2. Giun tròn thực vật (Nematoda)

Đặc điểm phân bố và mật độ của quần xã giun tròn trong đất phụ thuộc vào các yếu tố vô sinh, mà đặc biệt là vào lượng xác vụn hữu cơ và lượng thực vật sống cùng bộ rễ với chúng. Giun tròn thường hay tập trung ở những nơi có nhiều xác vụn hữu cơ thối rữa, với số lượng nhiều hay ít phụ thuộc vào mức độ giải phóng axit cacbonic. Đây là nhóm động vật đất nằm ở giữa hai nhóm động vật kích thước khác nhau, nhóm siêu nhỏ (Nannofauna) và nhóm nhỏ (Microfauna).

Các nhà nghiên cứu thường chia giun tròn thực vật thành các nhóm khác nhau, tùy vào đặc điểm dinh dưỡng của chúng. Giun tròn thực vật có thể ăn vi thực vật (Microflore) hoại sinh, tảo và những sản phẩm phân huỷ của thực vật bậc cao. Còn có thể gặp giun tròn ký sinh, ăn thịt, ăn động vật nguyên sinh hoặc ăn một số giun tròn cỡ nhỏ khác. Ngoài ra còn có một số giun tròn chuyên hoá ăn nấm, ăn dịch thực vật. Khả năng tiêu hoá thức ăn và phát triển cơ thể của giun tròn rất mạnh. Ví dụ: Một đại diện loài giun tròn *Rhabditis* sp. mỗi ngày có thể tiêu thụ lượng thức ăn vi khuẩn lớn gấp 10 khối lượng cơ thể của nó (khoảng 15mg) và càng ăn nhiều, giun tròn cái càng có khả năng sinh sản mạnh (Twin, 1974).

Hơn một phần ba tổng số lượng giun tròn là những nhóm ăn hệ vi thực vật. Chúng còn tham gia trực tiếp phá huỷ cơ học các mô thực vật, tiết dịch tiêu huỷ màng tế bào, mở đường cho các nhóm động vật không xương sống khác thâm nhập vào cơ thể cây xanh (Banuge, 1963). Trong nhiều trường hợp, nếu không tham gia trực tiếp vào quá trình phân huỷ xác vụn thực vật, giun tròn có vai trò điều chỉnh thành phần và qua đó là hoạt tính của hệ vi thực vật.

6.2.3. Ve giáp (Oribatei) và ve bét (Mesostigmata và Astigmata)

– Ve giáp cùng với nhóm sâu bọ bậc thấp bậc nhậy là những thành phần tích cực nhất của hệ động vật đất nhỏ, tham gia vào quá trình phân huỷ xác vụn thực vật, ăn nấm và các thành phần của cây xanh. Do có mật độ quần xã lớn, thông thường đạt hàng chục nghìn cá thể trên một mét vuông mặt đất, lại cộng thêm khả năng di cư tích cực theo chiều thẳng đứng và di cư bề mặt, nên chúng có vai trò quan trọng trong sự phân huỷ rễ cây xanh.

– Các nghiên cứu của P. Lerbun (1971), M. Luxton (1972), J. Wallwork (1970) cho thấy, ở nhóm ve giáp có sự chuyên hoá về đặc điểm dinh dưỡng. Ve giáp có thể phân thành nhóm hoại sinh, nhóm ăn nấm, nhóm ăn tảo, ăn thịt, ăn xác chết hay nhóm tạp dưỡng. Nghiên cứu của Elgelmann (1961) và Berthet (1963) cho biết, mỗi ngày ve giáp sử dụng một lượng thức ăn bằng một phần mười cơ thể của chúng. Trong đó, khoảng 96% của tổng năng lượng được dùng cho việc hô hấp của cơ thể.

– Một số nhóm ve bét khác như Mesostigmata, Astigmata (*Tiroglyphoidae*, *Tarsonemoidae*) và Gamasoidae bao gồm chủ yếu những nhóm ăn

thịt, ăn xác chết. Trong thành phần thức ăn của các nhóm ve bét này còn có bọ nhảy, bọ đuôi nguyên thủy, giun tròn, giun trắng,... Nhóm ve bét có vai trò đặc biệt quan trọng trong chu trình phân huỷ và chuỗi dinh dưỡng ở các lớp thảm lá rừng. Chúng còn đóng vai trò quan trọng trong quá trình phân huỷ xác vụn và phân hữu cơ thực vật ở hệ sinh thái đồng ruộng, góp phần kích thích diễn thế của hệ vi sinh vật ở đây.

6.2.4. Bọ nhảy (Collembola)

Đây là nhóm côn trùng bậc thấp (Insecta: Apterygota) sống chủ yếu ở tầng thảm và lớp đất mặt của hệ sinh thái đất. Chúng ít di cư xuống các lớp đất sâu. Thức ăn của bọ nhảy gồm hạt phấn cây họ thông, mô lá cây đã bị phân huỷ, vụn hữu cơ, xác động vật hoặc một số nhóm vi sinh vật khác.

Tuỳ đặc điểm nơi sống theo tầng thẳng đứng trong đất, tuỳ theo loại thức ăn mà các nhà nghiên cứu phân biệt bọ nhảy thành hai nhóm sinh thái khác nhau. Đó là nhóm sống ở bề mặt trên của lớp thảm lá rụng, ăn xác vụn thực vật và thể sợi nấm; và nhóm sống ở tầng dưới lớp thảm lá, chỉ ăn hệ vi thực vật. Các kết quả nghiên cứu cho thấy có mối liên hệ dinh dưỡng của nhiều loài bọ nhảy với hệ vi sinh vật phân huỷ xenlulo, và bằng cách này bọ nhảy có ảnh hưởng gián tiếp lên quá trình phân giải mô thực vật trong đất.

6.2.5. Giun trắng (Enchytraeidae)

Giun trắng là nhóm động vật đất có kích thước cơ thể chiếm vị trí trung gian giữa hệ động vật nhỏ Microfauna và hệ động vật trung bình Mesofauna. Thông thường, người ta xếp chúng vào nhóm động vật Mesofauna. Chúng có thể sống ở những nơi có nhiệt độ thấp và độ chua cao như ở đất than bùn, nơi mà nhiều nhóm động vật thông thường khác không sống được. Giun trắng là nhóm động vật ưu thế ở các vùng sa mạc, vùng lãnh nguyên hay vùng rừng lá nhọn. Trong điều kiện vùng ven biển, giun trắng hay gặp ở vùng nước triều, bám thành từng đám với những lớp tảo và vụn thực vật thối rữa, trôi nổi bấp bênh theo sóng.

Trong đất, giun trắng ăn vụn thực vật quanh vùng rễ cây, ăn giun tròn thực vật. Trong thành phần thức ăn của giun trắng còn có vụn khoáng, mô thực vật, vụn hữu cơ và nấm.

6.2.6. Giun đất (Oligochaeta)

Giun đất là nhóm động vật đất hoại sinh, ăn xác vụn hữu cơ, giữ vai trò đặc biệt quan trọng trong nhiều quá trình phân huỷ xác vụn thực vật và chuyển hoá vật chất hữu cơ trong đất. Để sống được trong đất, giun có cách di chuyển tích cực nhờ hoạt động chủ động đào hang và rãnh, để tìm kiếm thức ăn, nhận biết đồng loại, ghép đôi sinh sản và phát triển. Gặp môi trường sống là nền đất cứng, khi đào đất giun không thể nén hết đất vào thành hang, mà chúng phải nuốt đất vào bụng, rồi sau đó chuyển lên mặt đất. Nhờ hệ thống hang rãnh đất đào được trong vòng đời của mình, nhóm giun đất góp phần làm tăng đáng kể độ tơi xốp và thoáng khí của đất, cải thiện khả năng dẫn nước và giữ độ ẩm cho môi trường này. Giun đất còn tham gia trực tiếp vào các quá trình phân huỷ cơ học xác vụn thực vật và vật chất hữu cơ, khoáng chất khác. Tùy theo đặc điểm dinh dưỡng và độ sâu đất, giun đất được xếp thành ba nhóm sinh thái khác nhau:

- + Thứ nhất là nhóm giun ở tầng thảm mặt đất, chỉ sống ở bề mặt và ăn thảm vụn thực vật.

- + Thứ hai là nhóm ở đất đặc trưng, sống sâu trong lòng đất, ăn vụn hữu cơ.

- + Cuối cùng là nhóm giun trung gian của hai nhóm nêu trên, có thể sống trên mặt đất hoặc sống trong đất.

- Trong ống tiêu hoá của cơ thể giun, xác vụn thực vật và hữu cơ trước hết được nghiền cơ học, sau đó lại được tiếp tục phân giải hoá học nhờ nhiều loại dịch và men tiêu hoá. Đáng chú ý là phân giun, đây là những hạt xốp, nhỏ hơn 1mm, có nguồn gốc hữu cơ, là một môi trường thích hợp cho nhiều nhóm vi sinh vật có ích sinh sống và phát triển. Các tính toán khoa học cho thấy, nếu trung bình cứ một mét vuông mặt đất có được 150 con giun, thì hằng năm, 1 ha đất loại này sẽ được lượng giun sống trong đó cung cấp cho 120 tấn phân giun, mà trong đó có 20 tấn được đùn lên trên mặt. Giun đất có vai trò cực kỳ quan trọng trong quá trình phân huỷ xác hữu cơ, tạo mùn, tăng độ phì và cải tạo đất. Vai trò của giun đất thật vô cùng quan trọng, góp phần cải tạo độ phì nhiêu của đất, đúng như cách gọi rất hình tượng và chính xác của Darwin từ cuối thế kỷ XIX, là “lưỡi cày muôn thừa cày đất”.

6.2.7. Cuốn chiếu (Diplopoda)

Trong nhóm động vật đất hoại sinh Mesofauna và Macrofauna, cuốn chiếu chân kép giữ vai trò đáng kể ở giai đoạn phân huỷ bước đầu và trong quy trình khoáng hoá xác vụn thực vật ngay trong giai đoạn đầu. Mặt khác, nhiều thành phần các chất khoáng của quy trình phân huỷ này cuối cùng sẽ được tích lũy trong cơ thể và trên lớp vỏ bao quanh cơ thể của chúng.

Cuốn chiếu là nhóm động vật ưu thế của quần xã động vật tầng thảm lá rừng nhiệt đới và cận nhiệt đới. Nhóm này gặp nhiều ở các loại rừng nhiệt đới, trên núi đá vôi của Việt Nam. Chúng hay sống ở những nơi nóng và khô, sống dưới tán cây bụi và gỗ của vùng sa mạc và bán sa mạc. Đây là nhóm sống trong tầng thảm lá đặc trưng, không xuống sâu trong đất. Thức ăn chủ yếu của cuốn chiếu là mùn thực vật. Khả năng phân huỷ xenlulo trong ruột của chúng lớn do chúng có khả năng cộng sinh với một số nhóm vi sinh vật khác.

6.2.8. Mọt ấm (Oniscoidea) và ấu trùng sâu bọ hai cánh (Diptera)

– Mọt ấm là nhóm động vật đất đóng vai trò quan trọng trong quá trình phân huỷ bước đầu thảm lá rụng và chất gỗ của vùng rừng lá rộng. Phần lớn chúng là nhóm hoại sinh, sống ở thảm lá, ăn lá rụng và cây gỗ.

– Mọt ấm có nhiều đặc điểm dinh dưỡng và sinh thái giống với cuốn chiếu, nhưng khả năng hấp thụ xác vụn thực vật lớn hơn nhiều so với chân kép, đạt đến 30 – 70%. Mọt ấm cũng góp phần quan trọng vào quá trình phân huỷ xác vụn thực vật như ở giun đất. Nhưng khác với giun đất, chúng phân huỷ ngay trên bề mặt đất, không kéo sâu vào trong các lớp đất.

– Rất nhiều nhóm sâu bọ hai cánh tuy không gắn bó suốt vòng đời trong đất, nhưng ở giai đoạn ấu trùng lại sống và đóng vai trò rất quan trọng trong môi trường này. Đó là các họ ruồi và muỗi như Tipulidae, Bibionidae, Lycoriidae,... Chúng khác nhau về đặc điểm dinh dưỡng, có thể là nhóm ăn thực vật, ăn thân gỗ, ăn phân, hoại sinh hay ăn thịt. Sâu bọ hai cánh tham gia tích cực vào quá trình hình thành lớp mùn, ảnh hưởng đến thành phần hoá học của chất hữu cơ trong đất. Gần đây, các nhà khoa học Mỹ và một số nước trên thế giới đã dùng ruồi lính đen hay còn gọi là ruồi tò vò (*Hermetia illucens*) gây nuôi nhân tạo góp phần phân huỷ rác thải và phân hữu

cơ. Đây là loài ruồi có kích thước lớn đến 1,5 – 2,0cm, có khả năng sinh sản mạnh và không sống gần con người. Ấu trùng của chúng có khả năng phân huỷ và ăn phân hữu cơ rất mạnh. Theo tiến sĩ Lưu Tham Muu (2001), thì ở Việt Nam cũng đã phát hiện được loài ruồi gân gũ (*Hermetia sp.*) và có tác dụng tương tự với loài ruồi này.

6.2.9. Mối (Isoptera)

Mối là nhóm động vật đất sống tập đoàn với hàng nghìn, hàng vạn và có thể đến hàng triệu cá thể trong mỗi tổ. Vì thế các hoạt động sống của các tập đoàn mối có vai trò đặc biệt quan trọng đối với quá trình phân huỷ xác hữu cơ và các đặc tính sinh học của môi trường đất. Các hoạt động dinh dưỡng của mối tập đoàn mối gây nên những ảnh hưởng đáng kể lên môi trường đất và nhu cầu thức ăn hữu cơ cho tổ cũng là những khối lượng đáng kể. Nhờ có loại men tiêu hoá được chất xenlulo và nhờ hệ vi sinh vật sống cộng sinh trong ống ruột, nên hệ số tiêu hoá xác thực vật ở mối đạt 60 – 80%. Mối có thể tiêu hoá được cả chất lignin.

Phân tích đất của tổ mối ở châu Phi, các nhà nghiên cứu cho thấy thành phần các chất nitơ, phospho, canxi và kali tăng hơn hẳn. Đất của thành tổ mối *Macrotermes sp* ở miền Nam Việt Nam có các tính chất cơ lý học, khác hẳn với đất tự nhiên xung quanh. Thành phần hạt đất tổ mịn hơn, lực kết dính cao hơn, hệ số thấm thấp hơn so với đất xung quanh.

6.3. ĐỘNG VẬT ĐẤT THAM GIA VÀO CÁC QUÁ TRÌNH KHOÁNG HOÁ VÀ MÙN HOÁ

– Nhóm sinh vật hoại sinh, ăn xác thực vật thường hấp thụ được 30 – 40% lượng thức ăn. Trong ống tiêu hoá của nhóm sinh vật hoại sinh này xảy ra quá trình phân huỷ hoá học cấu trúc tế bào thực vật và khoáng hoá một phần vật chất hữu cơ. Tuy đặc điểm chuyển hoá chất hữu cơ trong ống tiêu hoá của chúng, mà động vật đất hoại sinh cũng được chia thành hai nhóm chính:

+ Nhóm động vật khoáng hoá (Carboliberantes).

+ Nhóm động vật mùn hoá (Nitroliberantes).

– Nhóm động vật giữ vai trò khoáng hoá xác vụn thực vật có thể kể đến cuốn chiếu, một ẩm, mối, nhóm ve bét họ Phthiracaridae, thân

mềm cặn,... Nhóm động vật này có khả năng phân huỷ mô xenlulo, là thành phần cấu trúc của 15 – 50% mô thực vật như lá, thân, gỗ và rễ cây. Nhu cầu về lượng và khả năng hấp thụ thức ăn ở nhóm động vật này tỷ lệ thuận với hoạt tính phân huỷ chất xenlulo trong ống tiêu hoá của chúng. Trong quá trình tiêu hoá ở ruột, có đến 30 – 80% màng thực vật chứa xenlulo được phân huỷ. Màng xenlulo bị tiêu hoá, để hình thành những hợp chất khoáng đơn giản, mà cây xanh dễ dàng hấp thụ được. Kết quả của quá trình khoáng hoá đã tạo nên sản phẩm là lượng chất thải của động vật đất, là những hợp chất dễ hấp thụ và có ích cho cây xanh. Trong quá trình này có sự tham gia tích cực của hệ vi thực vật đất. Như vậy nhờ nhóm động vật đất hoại sinh mà xác thực vật được phân rã nhanh chóng, các thành phần cấu trúc của chúng được giải phóng, quay lại chu trình tuần hoàn vật chất, trở lại đất và được cây xanh hấp thụ lại.

– Trong nhóm động vật mùn hoá xác vụn thực vật này, phải kể đến giun đất, ấu trùng sâu bọ hai cánh,... là nhóm hoại sinh quan trọng, ăn lá rụng và phần gỗ cây xanh. Chúng cũng có khả năng phân huỷ màng xenlulo nhưng ở mức độ thấp hơn. Thức ăn chính của nhóm động vật hoại sinh mùn hoá này là những thành phần chứa nitơ của mô thực vật. Trong cơ thể của nhóm động vật này, các quá trình khoáng hoá vật chất hữu cơ bị hạn chế, còn đối với các thành phần mùn thì ngược lại, chúng khá ổn định trong các dạng phức hợp hữu cơ khoáng cùng với các hạt đất. Đặc điểm phân biệt của nhóm này là, ngay trong ruột của chúng, những hợp chất mùn đã được tạo thành từ xác vụn thực vật. Ví dụ: trong ruột ấu trùng sâu bọ hai cánh đã sớm hình thành những hợp chất phân tử thấp hay những thành phần “tiền mùn”, hoặc một số axit gốc, còn trong ruột giun đất, các axit mùn đặc trưng cho quá trình mùn hoá xác thực vật đã được hình thành. Những hợp chất mùn được tạo thành tồn tại khá bền vững trước tác động của hệ men đất. Chúng sẽ tiếp tục bị khoáng hoá, sau khi sự kết hợp giữa các phân tử mùn và các thành phần khoáng bị phá huỷ.

Trong quá trình mùn hoá và khoáng hoá vật chất hữu cơ, sự kết hợp và cùng hoạt động của hệ động vật đất đối với vi sinh vật được thực hiện rất chặt chẽ, không thể tách rời và đôi khi khó có thể tách biệt giới hạn rõ ràng. Không thể đánh giá nhóm động vật đất chỉ như những thành phần phân huỷ cơ học xác thực vật và ăn vi sinh vật,

cũng như không thể xem xét vai trò của vi sinh vật là thành phần duy nhất thực hiện sự biến đổi khoáng hoá và mùn hoá cơ chất hữu cơ. Trong ống ruột của động vật đất, xác thực vật chịu những sự biến đổi sâu sắc. Trong điều kiện này, nhiều nhóm vi thực vật có khả năng phát triển mạnh mẽ. Chúng sẽ phát triển mạnh mẽ và phân huỷ tiếp lượng chất thải hữu cơ này khi chúng được thải ra ngoài cơ thể động vật. Trong cơ chế phân huỷ sinh thái này, động vật đất có vai trò như nhóm tiêu thụ, còn vi sinh vật được xem là nhóm khử.

6.4. ĐỘNG VẬT ĐẤT TRONG CHU TRÌNH LUÂN CHUYỂN VẬT CHẤT TRONG ĐẤT

– Các số liệu phân tích cho thấy, khối lượng và hàm lượng của các chất cacbon, nitơ, phospho, canxi ở dạng di động, chiếm thành phần đáng kể trong lá cây rụng. Mặt khác trong hoạt động dinh dưỡng của mình, hệ vi thực vật đất có khả năng tích lũy trong cơ thể một lượng khá cao các chất cacbon, nitơ, phospho và kali. Và tất nhiên, khi động vật đất hoại sinh ăn lá rụng thực vật, vi sinh vật thì đến lượt mình, những chất này lại được tích tụ lại trong cơ thể động vật. Trong các hoạt động sống của mình, động vật đất có khả năng chuyển hoá hầu hết lượng các nguyên tố hoá học có trong lượng lá rụng, trở lại chu trình luân chuyển vật chất tự nhiên của hệ sinh thái.

– Vai trò to lớn của những hoạt động sống của động vật đất là, trong cơ thể của chúng, thành phần phân tử của các nguyên tố dinh dưỡng được thay đổi, làm cho cây xanh dễ hấp thụ hơn. Trong mô thực vật, 60% nitơ nằm trong hợp chất men và cấu trúc protein. Trong cơ thể động vật phần lớn nitơ lại nằm trong thành phần đạm động vật, lớp vỏ kitin hay axit uric. Trong cơ thể động vật đất, canxi của xác thực vật được phân huỷ trong ống ruột, còn pectat canxi tập hợp ở dạng cacbonat và oxalat nằm ở vỏ cuticula của cuốn chiếu, một ẩm hay vỏ ốc cạn. Như vậy, mức độ tích lũy hay giải phóng các nguyên tố dinh dưỡng của cây xanh ở trong đất phụ thuộc vào cường độ hoạt động của hệ động vật và vi sinh vật có ở môi trường này. Bằng cách đó các hoạt động dinh dưỡng của hệ động vật đất góp phần quyết định tốc độ luân chuyển của vật chất trong các chu trình chuyển hoá vật chất tự nhiên.

– Các tính toán về sinh lượng và cường độ hoạt động của các nhóm động vật không xương sống trong các hệ sinh thái khác nhau

cho thấy, vai trò và sự tham gia của chúng rất khác nhau. Nghiên cứu Macfadyen (1963) ở hệ sinh thái đồng cỏ của vùng ôn đới cho thấy, đến 85% tổng năng lượng trong xác thực vật được giải phóng là nhờ vào các hoạt động của hệ vi sinh vật, và chỉ có khoảng 15% năng lượng còn lại là nhờ vào hoạt động của các nhóm động vật không xương sống ở trong đất. Tuy nhiên, tính toán trên chưa tính đến biến động số lượng và hoạt động theo mùa của hệ động vật đất, đến khả năng sinh sản và phát triển thế hệ rất nhanh của chúng, đặc biệt là ở những hệ sinh thái rừng của vùng nhiệt đới.

Một thí nghiệm khác của Ghilarov và cộng sự (1974) khảo sát quá trình phân huỷ phân động vật ăn cỏ làm rõ rằng, trong 1 giờ cường độ trao đổi khí của phân hoai là 1611,5ml oxy, thì có 782ml (chiếm 48,2%) là thuộc phần của nhóm động vật đất chân khớp bé và giun tròn. Trong trường hợp này, động vật đất da bào không xương sống sử dụng đến gần một nửa phần năng lượng được giải phóng từ xác thực vật phân huỷ, mặc dù cường độ hoạt động của nhóm vi sinh vật cũng xảy ra rất mạnh.

Chương III

ENZYM TRONG ĐẤT VÀ SỰ SẢN SINH RA ENZYM TRONG ĐẤT

Sự chuyển hoá các chất hữu cơ trong đất không phải chỉ do tác động của những sinh vật đang sống, mà còn do các loại enzym khác nhau tham gia. Những enzym này hoạt động độc lập, không phụ thuộc hệ sinh vật đất. Vậy nguồn gốc các enzym này là ở đâu và chúng hoạt động như thế nào, có những loại enzym gì?

Đại đa số enzym trong đất có nguồn gốc từ thực vật: rễ, thân, lá cây rơi vào trong đất sẽ bị các hệ sinh vật đất phân giải. Enzym ngoại bào và enzym nội bào của thực vật vào đất, tồn tại và tiếp tục hoạt động. Động vật và vi sinh vật cũng vậy, khi động vật và vi sinh vật bị chết đi, các tế bào động vật và vi sinh vật bị phá huỷ. Các hệ enzym của động vật và vi sinh vật vào đất và tiếp tục hoạt động.

I- ENZYM TỪ SINH VẬT ĐẤT

- Tỷ lệ tương đối về enzym có nguồn gốc sinh vật đất và enzym có nguồn gốc thực vật thay đổi theo loại hình đất và hệ cây trồng. Tỷ lệ này là bao nhiêu rất khó đánh giá. Người ta làm thí nghiệm như sau: cho một cơ chất vào đất, thì thấy trong đất có sự tăng hoạt động của enzym liên quan đến cơ chất đó và có sự tăng trưởng quần thể sinh vật đất. Cho đường saccharo vào đất đã làm tăng enzym saccharaza (bảng 3.1). Một số thí nghiệm khác cho đường gluco vào đất than bùn đã làm tăng hoạt động của enzym ureaza (Vaslenko, 1963); cho xenlulo vào đất feralit đã làm tăng hàm lượng enzym asparaginaza,...

Điều này được giải thích như sau:

+ Cho một cơ chất vào đất, cơ chất này không chỉ kích thích cho vi sinh vật liên quan đến cơ chất ấy, mà còn kích thích hệ sinh vật đất nói chung.

+ Cơ chất cho vào đất và vi sinh vật không những tác động đến cơ chất mới đưa vào mà còn tác động cả các chất có sẵn trong đất.

+ Sự phân giải cơ chất cho vào đất ở dạng trung gian để tạo điều kiện hình thành những cơ chất mới, mà cơ chất mới này tạo điều kiện cho các loại hình sinh vật đất kế tiếp nhau sinh trưởng, phát triển tốt.

BẢNG 3.1. HÀM LƯỢNG SACCHARO VÀ SỐ LƯỢNG VI KHUẨN TRONG HAI PHẪU DIỆN ĐẤT

Phẫu diện	Độ sâu (cm)	Vi khuẩn, 10^6 (tế bào/g đất khô)	Hàm lượng saccharo (%)
1	0-10	7,3	6,6
	10-20	7,1	6,2
	20-40	4,1	4,2
2	0-10	7,6	6,4
	10-20	6,2	6,2
	20-40	3,2	3,8

Càng gần bề mặt bao nhiêu chất dinh dưỡng càng nhiều, vi khuẩn càng phát triển tốt hơn. Càng xuống sâu số lượng vi khuẩn tổng số và tỷ lệ enzym saccharaza càng giảm, hay enzym và số lượng vi khuẩn trong đất tỷ lệ thuận với nhau. Từ đây chúng ta thấy sự phân bố các enzym phụ thuộc cơ chất cung cấp chất dinh dưỡng và năng lượng trong đất.

BẢNG 3.2. ẢNH HƯỞNG CỦA CÁC CHẤT VUI VÀO ĐẤT ĐẾN HÀM LƯỢNG SACCHARAZA (KISS-1957)

Cơ chất	Đất 1	Đất 2
	Hàm lượng tương đối (%)	Hàm lượng tương đối (%)
Đối chứng	100	100
Saccharo 0,5%	152,3	119
Saccharo 1,0%	164,6	162,8
Glucose 0,5%	111,5	94,2
Glucose 1%	118,4	104,7
Pepton 0,5%	105,3	100
Pepton 1%	105,3	100

Số liệu ở bảng 3.2. cho thấy hàm lượng enzym saccharaza ở trong đất phụ thuộc vào số lượng và chất lượng chất hữu cơ được vùi vào đất.

Ngoài ra còn phụ thuộc vào tùy từng loại đất khác nhau có điều kiện chuyển hoá khác nhau, mà có hàm lượng enzym khác nhau. Hàm lượng saccharaza ở mẫu đất số 1 có phần cao hơn ở mẫu đất số 2.

– Như trên đã trình bày, vi sinh vật và nguyên sinh động vật đất, khi chết đi tế bào bị phân giải và các hệ enzym từ tế bào của chúng sẽ vào đất và tiếp tục hoạt động.

Hệ vi sinh vật và vi động vật đất luôn thay đổi hàm lượng enzym của mình. Nơi nào vi sinh vật hay vi động vật hoạt động mạnh thì nơi đó hệ enzym tích lũy cao. Kiss (1973) đã tìm thấy trong hang giun, hàm lượng enzym saccharaza cao gấp 2 – 4 lần so với đất ngoài hang. Trong hang kiến, lượng enzym nhiều hơn trên mặt đất rất nhiều.

Trong hoạt động sống, sinh vật đất thường tiết ra các enzym, các axit hữu cơ, các chất kích thích sinh trưởng, các loại vitamin. Những chất này được tích lũy trong đất và có tác dụng rất lớn đến các hoạt động sinh học xảy ra trong đất và tác động đến quá trình sinh trưởng phát triển của cây trồng.

BẢNG 3.3. VI SINH VẬT VÙNG RỄ SẢN SINH CÁC CHẤT HỮU CƠ, CÁC ENZYM Ở VÙNG RỄ CÂY

Giống vi sinh vật	Enzym có lợi cho cây
<i>Bacillus subtilis, Fusarium</i>	Protopectinaza
<i>Acetobacter agilis</i>	Amilaza 1-6 glucosidaza, α - amilaza
<i>Aspergillus candidus</i>	α - amilaza, β - amilaza, gluco - amilaza
<i>Saccharomyces cerevisia</i>	α - amilaza, β - amilaza, gluco - amilaza
<i>Cytophaza, Bacteroides</i>	Exo - xenulaza, Endo - xenulaza
<i>Ruminococcus</i>	Exo - xenulaza, Endo - xenulaza

BẢNG 3.4. VI SINH VẬT VÙNG RỄ SẢN SINH CHẤT KÍCH THÍCH SINH TRƯỞNG CHO CÂY VÀ CÁC AXIT HỮU CƠ

Giống vi sinh vật	Chất kích thích	Axit độc hại cây
<i>Basidiomycetes</i>	Auxin	Axit Fumaric, xuxinic
<i>Fusarium</i>	Giberelin $A_1 - A_{10}$	Axit limonic,
<i>Aspergillus</i>	Indolilaxetic	Axit glicolic, glicoxilic
<i>Penicillium</i>	Auxin, ...	Axit lactic, ...

II- ENZYM TỪ HỆ CÂY TRỒNG

Quan niệm cho rằng tế bào, các tổ chức thực vật phần trên mặt đất khi rơi vào đất cũng như những tế bào từ chỗ rễ bị rách đã mang rất nhiều loại enzym vào đất đã được chứng minh và thừa nhận.

Nhưng quan niệm cho rằng rễ tiết ra enzym là vấn đề cần phải tiếp tục thảo luận. Thực tế, khi người ta thêm một số cơ chất vào rễ cây trồng trồng trong dung dịch, người ta đã thu được những sản phẩm của quá trình phân giải. Có thể cơ chất ấy đầu tiên hấp thụ lên rễ rồi bị phân giải và đi vào dung dịch. Những sản phẩm thuỷ phân không phải là do tác động bởi enzym từ rễ tiết ra ngoài mà là do tác động của enzym trong rễ.

**BẢNG 3.5. HÀM LƯỢNG ENZYM TRONG ĐẤT
THÂM CANH CÂY TRỒNG KHÁC NHAU**
(Kozlov, 1964)

Cây trồng	Peroxydaza ($\mu\text{H}/24\text{h/g}$ đất)		Polyphenol Oxydaza ($\mu\text{H}/24\text{h/g}$ đất)		Dihydrogenaza ($\mu\text{H}/24\text{h/g}$ đất)		Số lượng VSV ($10^6/\text{g}$ đất)		Mùn (%)	
	Từ đất	Từ vùng rễ cây	Từ đất	Từ vùng rễ cây	Từ đất	Từ vùng rễ cây	Từ đất	Từ vùng rễ cây	Từ đất	Từ vùng rễ cây
<i>Festuca</i> sp	2	6	3	7	360	525	57,4	187,4	3,32	4,15
<i>Aneurolepidium</i> sp	1	4	4	8	270	572	161,5	706,4	2,39	3,38
<i>Tanacetum</i> sp	3	6	1	2	267	390	206,5	474,5	2,42	3,55
<i>Stipa</i> sp	2	4	3	5	210	460	106,1	539,6	3,21	3,54

Trong quá trình sinh trưởng, phát triển của cây trồng, rễ cây trồng khác nhau đã sản sinh ra các loại enzym, các axit hữu cơ, các chất kích thích sinh trưởng khác nhau. Những chất này được tích lũy trong đất và có tác dụng đến quá trình sinh hoá học xảy ra trong đất.

**BẢNG 3.6. CÂY TRỒNG ĐÃ SẢN SINH CÁC HỢP CHẤT
ẢNH HƯỞNG ĐẾN SINH VẬT ĐẤT**

Hydrat cacbon	Axit amin	Axit hữu cơ	Vitamin
Có tới 10 loại đường khác nhau: gluco, fructo, arabino, manto, raphino, saccaro,...	Lơxin, izolơxin, valin, glutamic, asparagin, alanin, serin, lysin,...	Axit foocmic, axetic, propinic, butynic, xitric, vanic, fumaric,...	Biotin, thiamin, penthotenat, niacin,...

Trong số enzym có nguồn gốc thực vật trong đất có thể kể là: saccharaza (Estermann và Molarin, 1961, Kiss, 1961; Gilot và Dommergues, 1967); phosphataza (Estermann và Ibolasen, 1961) và ureaza. Về ureaza, có người cho rằng có nguồn gốc từ vi sinh vật

III- TRẠNG THÁI EMZYM ĐẤT

- Enzym tự do:

Đây là những enzym ngoại bào hoặc nội bào được giải phóng sau khi tế bào bị tự tiêu. Enzym ở dạng tự do tồn tại không lâu vì nó dễ bị phân giải sinh học.

- Enzym hấp phụ trên các keo đất và các keo hữu cơ:

Enzym hấp phụ trên keo vô cơ hay keo hữu cơ đã hạn chế phần nào hoạt tính của enzym, nhưng mặt có lợi là bảo vệ được enzym khỏi những tác động khác.

- Enzym của những tế bào chết hay của những mẫu tế bào (Fragments cellulaires).

I.L. Stevenson (1964) cũng như một số nhà nghiên cứu khác cho rằng enzym trong đất hấp phụ chủ yếu trên các thành phần sét.

Một số khác cho rằng chúng ở trong những tế bào chết của thực vật và vi sinh vật, hoặc trong những mảnh tế bào vi sinh vật và thực vật (tàn dư các tổ chức trên mặt đất của cây, hay những tế bào tróc mảng của rễ).

BẢNG 3.7. NHỮNG ENZYM QUAN TRỌNG THƯỜNG GẶP TRONG ĐẤT

Enzym	Dạng phản ứng xúc tác
I. Hydrolaza	Tách cơ chất và cố định những thành phần của nước lên những sản phẩm của phản ứng:
	$A-B \longrightarrow \begin{matrix} A+B \\ \downarrow \downarrow \\ HO-H \end{matrix}$
1. Oxydaza và những enzym họ hàng	Cắt đứt giữa C và O của một dây nối osidique:
	$\begin{matrix} \diagup & & \diagdown \\ -O-C-O-R \\ & & \\ OH & & H \end{matrix} \xrightarrow{\text{Oxydaza}} \begin{matrix} -O-C- & + & -O-R \\ & & \\ OH & & H \end{matrix}$
Saccharaza (invertaza)	Saccharo $\rightarrow$ gluco + fructo
Levane - sucroseaza	n Saccharo $\rightarrow$ (fructo) _n + ngluco
Amylaza	Amidon $\rightarrow$ dextrin + maltose
Xenulaza	Xenululo $\rightarrow$ Xellodextrin + oligosaccaric
Inulaza	Inulin $\rightarrow$ fructo + oligosaccaric
Pectinaza	Pectin $\rightarrow$ axit galacturonic + galactose
Phosphotaza	Glyxerophosphat $\rightarrow$ glyxerol + phosphat
Phomonoestera, phytat và phosphodiesteraza	Phenylphosphat $\rightarrow$ phenol + phosphat

2. Amidaza Ureaza Asparaginaza 3. Proteaza	Cắt đứt dây nối amit $\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ -\text{C}-\text{N}- \end{array} \xrightarrow{\text{amidaza}} \begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{C} \\ \\ \text{OH} \end{array} + \begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{N}- \\ \\ \text{H} \end{array}$ Ure + H₂O → CO₂ + amoniac Asparagin + H₂O → Axit aspartic + amoniac Thủy phân những dây nối peptit của những protein giải phóng ra những protein đơn giản hơn hay những peptit
II. Transferaza Aspartat - alanine transaminaza Leucin-alaninetransaminaza Glutamat-alaninetransaminaza	Chuyển một nhóm hay một gốc của một cơ chất đến một chất khác (khác với hydrolaza và oxyreductaza) Aspartat - pyruvat ⇌ alanin + oxalacetat Leucin - pyruvat ⇌ alanin + α - cetosovalerat Glutamat-pyruvat ⇌ alanin + α - cetoglutarat
III. Oxydoreductaza Oxydaza và peroxydaza Catalaza Peroxydaza Tyrosinaza Laccaza Transhydrogenaza (dihydrogenaza) IV. Clastaza Dicarboxylaza Uroaza Aspartic dicarboxylaza	Oxydoreductaza, chuyển hydrogen hay electron Khử O₂ hay một peroxyde: $2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{O}_2 + 2\text{H}_2\text{O}$ $\text{AH}_2 + 2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{A} + \text{H}_2\text{O}$ Tyrosin + O₂ → melanin (đen) Tyrosin → 3,4. dihydroxy phenylalanin → 3,4. quinone de phenylalanin → halla chrom → Melanin Di hay polyphenol thành ortho và para quinon tương ứng p.dihydro benzen + 1/2 O₂ → quinon + H₂O Chuyển H hay electron của chất cho một chất nhận. Chất nhận này là O₂ hay một chất nhận tự nhiên hay nhân tạo Cắt đứt hay hình thành một dây nối C - C Giải phóng CO₂ ở nhóm carboxyl Axit uric → allantoin + CO₂ Axit L-aspartic → β-alamin + CO₂

Trên đây là một số loại enzym chính thường gặp trong đất. Các enzym trên có nguồn gốc từ cây trồng, vi sinh vật, động vật nguyên sinh.

Riêng về vi sinh vật, chúng phân bố rất rộng: từ đồi núi đến đồng bằng, từ nhiệt đới đến ôn đới. Ví dụ giống *Azotobacter* có thể tìm thấy

ở rất nhiều loại đất trên thế giới. Do đó enzym từ *Azotobacter* tiết vào trong đất cũng sẽ được gặp rất nhiều ở các loại đất.

Cũng như *Azotobacter*, các loại nấm, các loại nguyên sinh động vật, các loại cây trồng cũng phân bố khắp nơi trên trái đất. Enzym từ những sinh vật này cũng được gặp nhiều ở khắp nơi.

Mặt khác, chúng ta lại thấy ngay trong giống *Azotobacter* cũng có nhiều loài có những đặc tính sinh lý khác nhau và phản ứng với điều kiện ngoại cảnh khác nhau. Enzym của chúng tiết vào đất cũng có hoạt tính phụ thuộc những đặc tính và điều kiện ngoại cảnh.

Vì vậy phải có những phương pháp nghiên cứu thích hợp để đánh giá được đúng hoạt tính và hàm lượng của từng loại enzym được sản sinh ra từ nguồn nào, trong điều kiện môi trường nào?

Chương IV

VI SINH VẬT ĐẤT TRONG QUÁ TRÌNH PHÂN HUỖ, CHUYỂN HOÁ CÁC HỢP CHẤT CACBON TRONG ĐẤT

I- VÒNG TUẦN HOÀN CACBON TRONG TỰ NHIÊN

– Trong không khí, cacbon tồn tại dưới dạng khí CO_2 . Khí CO_2 chiếm tỷ lệ 0,03% so với không khí (khoảng 6000 tỷ tấn). Kết quả nghiên cứu cho thấy: Cây xanh mỗi năm lấy từ không khí 600 tỷ tấn CO_2 , trong đó có khoảng 200 tỷ tấn cacbon. Như vậy nếu không có sự phân giải hữu cơ thì khoảng 30 – 40 năm không khí sẽ cạn kiệt CO_2 . Lúc bấy giờ sự sống trên trái đất sẽ ngừng hoạt động, thế giới sẽ bị diệt vong.

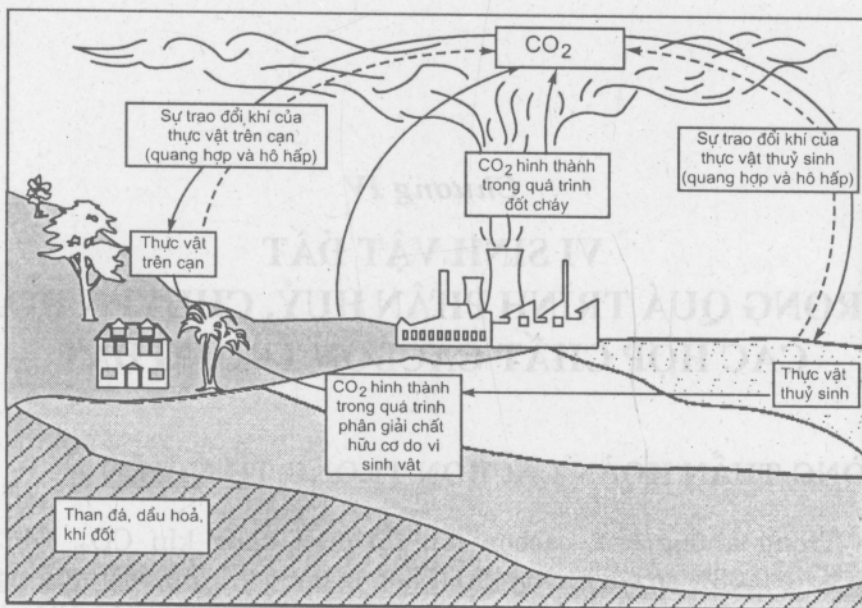
Sự bất hạnh trên không thể xảy ra được là nhờ luôn luôn có sự bù trả CO_2 cho không khí thông qua hoạt động sống của sinh vật đất nói riêng và các sinh vật nói chung.

– Nguồn dự trữ cacbon trong tự nhiên rất lớn, người ta ước tính được như sau:

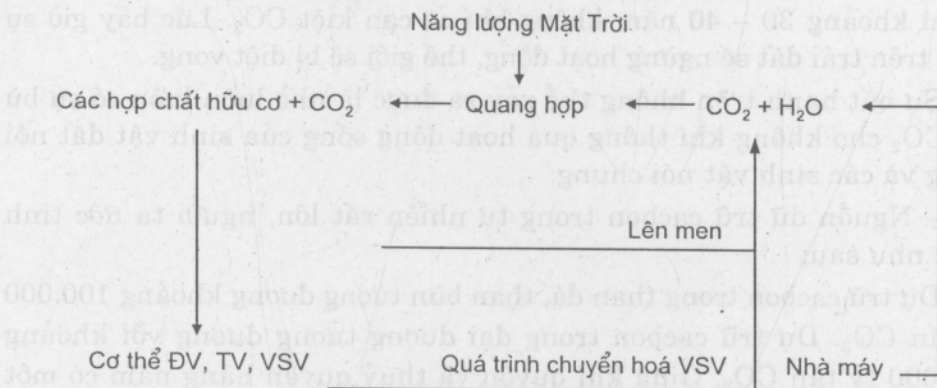
Dự trữ cacbon trong than đá, than bùn tương đương khoảng 100.000 tỷ tấn CO_2 . Dự trữ cacbon trong đại dương tương đương với khoảng 130.000 tỷ tấn CO_2 . Giữa khí quyển và thủy quyển hàng năm có một khối lượng cacbon tương đương với 200 tỷ tấn CO_2 .

– Như vậy với tốc độ sinh sôi nảy nở rất nhanh chóng, với tính đa dạng về mặt sinh lý và có khả năng trao đổi chất hết sức mạnh mẽ, sinh vật đất có vai trò rất quan trọng trong việc thực hiện khép kín vòng tuần hoàn cacbon trong tự nhiên.

Dưới tác dụng của vi sinh vật, tất cả các hợp chất hữu cơ đều bị phân giải tiến hành theo con đường oxy hoá triệt để, tạo thành CO_2 và H_2O . Trong điều kiện không có oxy, sự phân giải tiến hành theo con đường oxy hoá kỵ khí, hay còn gọi là con đường lên men. Năng lượng thu được trong quá trình hô hấp hoặc lên men được vi sinh vật dùng để thực hiện các quá trình sống trong cơ thể.



Hình 4.1. Sơ đồ vòng tuần hoàn cacbon trong tự nhiên



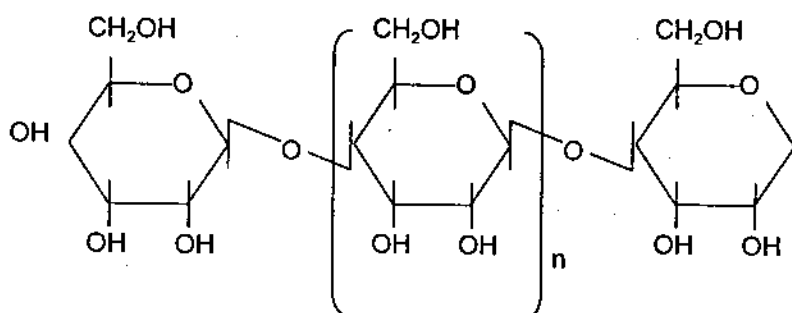
Hình 4.2. Sơ đồ vòng tuần hoàn cacbon trong tự nhiên

II- QUÁ TRÌNH PHÂN HUỶ CHUYỂN HOÁ XENLULO

2.1. KHÁI NIỆM VỀ XENLULO

– Hằng năm có khoảng 30 tỷ tấn chất hữu cơ được cây xanh tổng hợp trên Trái Đất. Trong số này 30% là xenlulo. Người ta nhận thấy xenlulo chiếm trên 90% trong bông, 40 – 50% trong gỗ. Nhờ phương pháp phân tích bằng tia rơnghe, người ta đã biết xenlulo có cấu tạo dạng sợi. Các sợi xenlulo trong tự nhiên thường chứa khoảng 10.000 – 12.000 gốc gluco. Các sợi này liên kết lại thành bó sợi gọi là microfibrin.

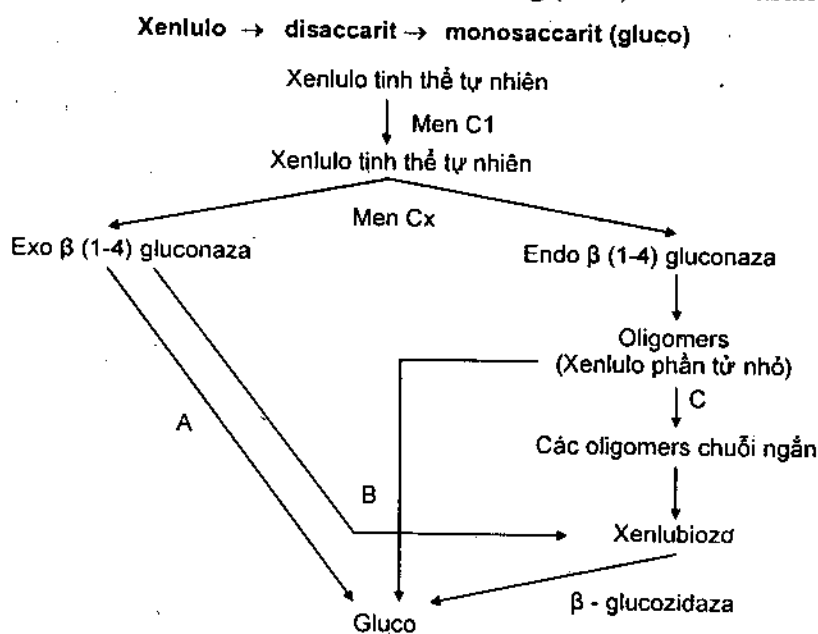
– Xenlulo là hợp chất khá bền vững, không tan trong nước (chỉ bị phồng lên do hấp thụ nước). Xenlulo không tiêu hoá được trong bộ máy tiêu hoá của người. Sở dĩ động vật nhai lại có thể đồng hoá được xenlulo là nhờ hoạt động phân giải xenlulo của rất nhiều loại vi sinh vật sống trong dạ cỏ.



2.2. CƠ CHẾ CỦA QUÁ TRÌNH PHÂN GIẢI XENLULO

– Quá trình phân giải xenlulo thường qua các giai đoạn khác nhau với sự tham gia của các men C1, C2, và β -glucosidaza.

Nhiều tác giả đã trình bày sơ đồ quá trình phân giải xenlulo nhờ men (Mandels và Recse (1964); Ogawa, Toyam (1964); Iwasaki, Hayoshi, Walabayais, Nisizwa (1964); Funata (1965); King (1965) và Srinivasan (1973).



Hình 4.3. Sơ đồ phân giải xenlulo của Srinivasan, 1973

A: ở nấm *Trichodesma viride*; B: ở vi khuẩn *Cellvibrio fuvus*; C: ở nhiều VSV khác

2.3. VI SINH VẬT PHÂN GIẢI XENLULO TRONG ĐẤT

2.3.1. Vi sinh vật hảo khí

Pôpôp (1875) là người đầu tiên xác nhận khả năng phân giải sợi xenlulo của một số vi sinh vật kỵ khí. Nghiên cứu này về sau được V.L.Omelianski tiếp tục phát triển. Nhờ tìm được môi trường chọn lọc, ông đã xây dựng được các phương pháp phân lập vi sinh vật phân giải xenlulo. Các môi trường này ngày nay vẫn được coi là môi trường kinh điển.

Người đầu tiên phát hiện thấy khả năng phân giải của các vi khuẩn hảo khí là Rôxon (1903). Về sau, các nghiên cứu về nhóm vi khuẩn này (nhất là các loại thuộc giống niêm vi khuẩn *Cytophaga*) được phát triển thêm rất nhiều nhờ các công trình nghiên cứu của X.N. Vinogradski (1926 – 1952) và A.A. Imxooniêxki (1934 – 1953).

a) *Sporocytophaga*

Vi khuẩn hình que đầu tròn, nguyên sinh chất đồng đều, không có nhân phân hoá, không có tiên mao. Di động nhờ uốn cong cơ thể. Phân chia tế bào theo kiểu phân cắt. Vòng đời phức tạp. Vi khuẩn hình que chuyển thành hình cầu. Dạng hình cầu này gọi là bào nang. Bào nang có vỏ bao bọc và có sức chống đỡ mạnh với điều kiện ngoại cảnh thay đổi. Bào nang là dạng ngủ nghỉ của vi khuẩn. Bào nang gặp điều kiện thuận lợi lại phát triển thành tế bào dinh dưỡng dạng que.

Trong giống *Sporocytophaga* này thường gặp 2 loại: *Sporocytophaga myxocoides* và *Sporocytophaga ellipsospora*. *Sporocytophaga myxocoides* có màu vàng. *Sporocytophaga ellipsospora* có màu nâu. Chúng đều là những vi khuẩn phân giải xenlulo mạnh.

b) *Cytophaga*

Đây cũng là loại niêm vi khuẩn. Về hình thái rất giống *Sporocytophaga* nhưng không hình thành bào nang. Trong môi trường nuôi cấy, vi khuẩn hình que, sau đó rút thành hình cầu và thường sản sinh màu sắc rất khác nhau.

c) *Sorangium*

Tế bào dinh dưỡng hình que, hai đầu tròn. Tế bào chất nhân dạng hạt, có khả năng hình thành bào nang nhưng bào nang không định hình. Bào nang khác với *Sporocytophaga* ở chỗ nó do nhiều tế bào kết lại mà thành. Trên môi trường dinh dưỡng, sản sinh sắc tố rất khác nhau. *Sorangium* cũng là một loại niêm vi khuẩn.

Ngoài các vi khuẩn trên, trong điều kiện hảo khí, người ta còn gặp một số loại vi khuẩn khác như *Cellfacicula*, *Cellvibrio*.

– *Cellfacicula*: Hình que nhỏ, hai đầu tròn. Trên môi trường dinh dưỡng có thể sinh màu xanh hoặc màu vàng nhạt.

– *Cellvibrio*: Hình que, không bào tử, hai đầu tròn, đơn tiên mao, Gram âm, sản sinh màu vàng trên môi trường xenlulo.

Hoạt động phân giải xenlulo của nhóm vi sinh vật đặc biệt sống trong dạ dày của động vật nhai lại đã được chú ý cách đây rất lâu (W.A. Henebec, Xicmen (1864), Taponic (1884)). Đó là cầu khuẩn thuộc giống *Ruminococcus*, nhất là *R. flavefaciens*. Chúng nhuộm Gram không ổn định (Gram $\pm$), không có tiên mao, có khả năng đồng hoá gluco, xenlulo, xilo, etanon, axit foocmic, axit lactic, và CO_2 . Đó cũng là loại trực khuẩn *Bacteroids succinogen*, Gram âm, không có tiên mao và có khả năng đồng hoá xenlulo thành axit axetic, axit foocmic, axit succinic, axit lactic và CO_2 (Hangel, 1947 – 1950).

Theo Y. Dommergues và F. Mangenot thì trong đường ruột của mối phá hoại gỗ (*Calotermitides*, *Termopsides*, *Rhinotermitides*) có chứa rất nhiều vi khuẩn giống như vi khuẩn ở dạ cỏ động vật. Vai trò của những vi khuẩn đối với đời sống của mối, nhất là đối với quá trình phân giải xenlulo nhanh chưa được nghiên cứu nhiều.

Đa số nghiên cứu về xenlulo được tập trung vào nấm mốc. Các loại nấm có hoạt tính phân giải xenlulo mạnh đáng chú ý là các loại sau đây: *Aspergillus fumigatus*, *A. Niger*, *Fusarium maliniforme*, *P.purpurogenum*, *Trichodesma vinide*, *Trichoderma koningi*, *Humicola insoluns*, *Mucor pusillius* NRRL 1543, *Streptomyces antibioticus*, *S.cellulosac*, *S.celluloflavus*.

2.3.2. Vi sinh vật yếm khí

Theo Omelianxki thì trong vi khuẩn yếm khí phân giải xenlulo một số loài, dòng quan trọng thường gặp là: *Bacillus cellulosac hydrrogenicus*, *Bacillus cellulosac methanicus*. Trong quá trình sống, phân giải xenlulo của mình *B.cellulosac hydrogenicus* đã sản sinh ra H_2 còn *Bacillus cellulosac methanicus* thì sản sinh ra khí metan. Những nghiên cứu gần đây cho thấy hai dòng vi khuẩn này chỉ là một và được gọi chung là *Bacillus omelianxki*.

Theo Y. Dommergues và F. Mangenot trong quá trình phân giải xenlulo yếm khí thì giống *Clostridium* có vai trò rất quan trọng. Chúng có số lượng lớn ở những nơi ngập nước, đầm lầy, ao bùn, những mô mùn ngập nước.

2.3.3. Vi sinh vật chịu nóng

Ngoài các vi khuẩn hảo khí và yếm khí đã nêu, trong đất hay trong đồng phân ủ, người ta còn gặp một số vi sinh vật ưa nóng phân giải xenlulo như: *Bacillus omelianskii* var. *Thermophilus*, *Aspergillus*, *Mucor*, *Actinomyces*,...

2.4. ĐIỀU KIỆN NGOẠI CẢNH ẢNH HƯỞNG ĐẾN QUÁ TRÌNH PHÂN GIẢI XENLULO

2.4.1. Độ ẩm

Độ ẩm chỉ phối hoạt động sinh học trong đất nói chung và của vi sinh vật phân giải xenlulo nói riêng. Trong môi trường độ ẩm nhỏ hơn 50 – 60% độ giữ nước của đất, hay là những khoảng thời gian xen kẽ giữa khô và ẩm thì nấm mốc phát triển tốt, còn những vi sinh vật đơn bào thì thích nơi có độ ẩm cao, nước đầy đủ. Ở độ ẩm 20%, vẫn thấy một số xạ khuẩn có khả năng phân giải xenlulo.

2.4.2. Oxy hoá khử

Ở độ oxy hoá $rH \geq 19$ người ta gặp được những vi khuẩn hảo khí phân giải xenlulo. Khi $rH \leq 9,3$ thì chỉ có *Clostridium* yếm khí.

Các loại giống nấm có khả năng hoạt động ở rH rất rộng ($rH = 1,0 - 30,0$ vôn), tùy từng giống khác nhau mà thích ứng ở rH khác nhau. Kết quả nghiên cứu cho thấy vi khuẩn phân giải xenlulo hoạt động mạnh ở tầng mặt đất.

2.4.3. Độ pH

Vi khuẩn yếm khí chịu độ pH thay đổi hơn là vi khuẩn hảo khí. Theo Jensen (1931) ở pH 6,5 – 7,0 thường gặp giống *Vibrio*, còn từ 5,7 – 6,2 thì gặp nhiều *Cytophaga*. Ở pH chua thì gặp nhiều nấm.

Cellulomonas thích hợp với pH = 6 – 7; *Cellvibrio* thích hợp ở pH = 6,0 – 6,5. Xạ khuẩn thích hợp ở pH trung tính. Nhìn chung xenlulo bị vi sinh vật phân giải ở khoảng pH từ 4,6 đến 9,0.

Nói chung pH có ảnh hưởng lớn đến sự phân bố và hoạt động của vi sinh vật phân giải xenlulo.

2.4.4. Nhiệt độ

Quá trình phân giải xenlulo trong tự nhiên bắt đầu khi nhiệt độ khoảng từ 50°C đến 65°C. Ở nhiệt độ trên 65°C thì chỉ có vi sinh vật ưa nhiệt hoạt động. Đa số vi sinh vật phân huỷ xenlulo trong khoảng nhiệt độ từ 25°C đến 45°C. Vi sinh vật sinh nhiệt, như: *Ruminococcus*, *Basidiomycetes*, *Bacillus*, *Mucor*, *Aspergillus*,... có thể chịu được ở nhiệt độ 60°C – 80°C. Giống *Clostridium* thích hợp ở 25 – 45°C, ở 50°C hoạt động yếu. Các loại vi sinh vật chịu nóng đều có ở trên các loại đất, tuy nhiên số lượng ít (khoảng 1%) (Mishutin và Vasileva) và thường gặp nhiều ở trong phân chuồng, các đồng rác thải, phế thải hữu cơ. Vi sinh vật phân giải xenlulo đại đa số là loại ưa ấm và enzym xenlulaza hoạt tính thích hợp nhất ở khoảng 30°C – 45°C (Riviere và Roux 1961).

2.4.5. Nitơ

Quá trình phân giải xenlulo trong đất cung cấp đường cho vi sinh vật. Đường được vi sinh vật đồng hoá một phần để tổng hợp nên chất hữu cơ của cơ thể, một phần biến thành năng lượng trong quá trình sống. Để phân giải được xenlulo, để hoạt động sống tiến hành bình thường thì vi sinh vật cần nitơ. Nếu môi trường lượng xenlulo nhiều, N ít (C/N) cao thì ở giai đoạn đầu của quá trình phân giải, vi sinh vật lấy N của môi trường, giữa vi sinh vật và cây trồng có sự tranh chấp nitơ của môi trường. Ngược lại nếu C/N thấp, các điều kiện ngoại cảnh khác thuận lợi thì sự phân giải xenlulo được thuận lợi, môi trường sẽ có nitơ tích lũy, giữa cây trồng và vi sinh vật sẽ không còn quá trình tranh chấp.

2.4.6. Cacbon

Từ lâu, người ta cho rằng, một số vi sinh vật yếm khí và hảo khí phân giải xenlulo chỉ dùng xenlulo làm nguồn cacbon và không có khả năng sử dụng các loại đường thông thường. Quan niệm này không đúng. Tuy nhiên cũng cần chú ý thêm: mỗi loài vi sinh vật có yêu cầu về nguồn cacbon khác nhau ngoài xenlulo. Loại *Cytophaga hutchinsonii* ngoài xenlulo, trong môi trường chỉ có thể dùng Cellobiose hay gluco. Nếu trong môi trường vừa có các đường thông thường dễ tiêu và xenlulo thì trong quá trình sinh trưởng phát triển của vi sinh vật nó sẽ đồng hoá đầu tiên các dạng đường và sau đó mới đến xenlulo.

2.4.7. Biện pháp canh tác

Các biện pháp canh tác tăng cường hoạt động của vi sinh vật. Nếu cùng loại đất thì trên đất có trồng trọt lượng vi sinh vật nhiều

hơn đất không trồng trọt và như vậy quá trình phân huỷ, chuyển hoá xenlulo sẽ mạnh hơn.

Biện pháp canh tác, như làm đất, luân canh, tưới tiêu, bón phân,... ảnh hưởng rất lớn đến sinh vật đất, dẫn đến ảnh hưởng đến quá trình phân huỷ, chuyển hoá xenlulo trong đất.

III- QUÁ TRÌNH PHÂN HUỶ CHUYỂN HOÁ HEMIXENLULO

3.1. CHẤT HEMIXENLULO

Hemixenlulo là những heteropolysaccharit. Cùng với xenlulo, hemixenlulo có trong thành phần tế bào thực vật và chúng có thể được dùng một phần làm chất dinh dưỡng dự trữ. Trong rơm rạ, hemixenlulo chiếm 15 – 30%, ở cây song tử diệp 20 – 25%, ở gỗ thông 7 – 12%.

Hemixenlulo là một nhóm các polyzơ không hoà tan trong nước, nhưng hoà tan trong dung dịch kiềm. Hemixenlulo bị thuỷ phân bởi axit dễ dàng hơn so với xenlulo. Khi đó chúng tạo thành gluco, manozơ, galactozơ, arabinazơ, xilozơ.

Các chất thuộc nhóm hemixenlulo thường gặp là: Xilan, mannan, galactan, glucan.

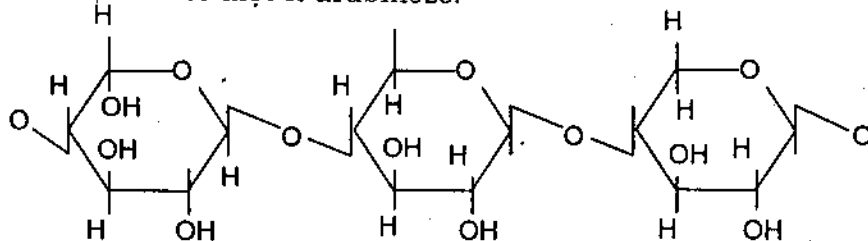
Dưới tác dụng của các enzym manaza, xilanaza, galatanaza, các chất trên sẽ được phân giải.

3.1.1. Xilan

3.1.1.1. Cấu tạo

Xilan có rất nhiều trong gỗ, rơm, trong thân và các cơ quan khác của thực vật. Chủ yếu chúng có trong thành phần của vỏ tế bào.

Xilan được tạo nên từ gốc β -D-xilozơ ở dạng piranozơ. Chúng được liên kết với nhau bằng các liên kết 1-4. Trong thành phần của xilan đôi lúc còn có một ít arabinozơ.



Hình 4.4. Cấu tạo phân tử xilan

3.1.1.2. Cơ chế phân giải

Khi phân giải xilan sẽ cho chúng ta xilozơ (cắt đứt đầu các dây nối) và các oligosides có từ 2 – 6 xilozơ. Nếu phân tử xilan còn có mạch nhánh thì người ta còn thấy xuất hiện arabinozơ và axit galacturonic.

Enzym xilanaza có thể tác dụng và làm đứt các dây nối 1 – 4 và 1 – 3. Dùng điện di chúng ta có thể tách 3 thành phần trên.

3.1.1.3. Vi sinh vật phân giải xilan

- Vi khuẩn yếm khí: *Clostridium*.
- Vi khuẩn hiếu khí: *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Bacillus*, *Vibrio*, *Sporocytophage*.
- Xạ khuẩn: *Streptomyces*, *Micromonospora*.
- Nấm mốc: *Chaetomium*, *Penicillium*, *Aspergillus*.

3.1.2. Sự phân giải glucan

3.1.2.1. Glucan

β -glucan nói chung bao gồm các polysaccharit chứa các gốc β -D-glucopyranozơ liên kết với nhau chủ yếu qua các dây nối β – (1 – 3) – glucosit. Nhiều glucan có chứa cả dây nối β – (1 – 6) – glucosit. Chính vì vậy mà người ta phân biệt ra hai loại enzym thủy phân glucan khác nhau: β – (1 – 3) – gluconaza và β – (1 – 6) – gluconaza. Nhiều nấm men có thể sinh ra những enzym β – gluconaza có thể thủy phân đồng thời cả dây nối β – (1 – 3) lẫn dây nối β – (1 – 6) – glucosit. Glucan là một thành phần chủ yếu của thành tế bào nhiều loại nấm túi (Ascomycetes), nấm đảm (Basidiomycetes) và nấm bất toàn (Deuteromycetes).

3.1.2.2. Vi sinh vật phân giải glucan

Nhiều loại vi sinh vật sống trong đất có khả năng sản sinh enzym glucanaza. Các loại nấm sau đây đã được chứng minh là có khả năng sản sinh enzym β – (1 – 3) – gluconaza: *Aspergillus niger*, *A.oryzae*, *Ceroaspora salina*, *Hanseniaspora*, *Claviceps fusiformis*, *Penicillium claviform*, *Penicillium lilacium*, *Saccharomyces cerevisiae*, *S.lactis*, *Trichoderma album*.

Các loại vi khuẩn có khả năng sản sinh β – (1 – 3) – gluconaza: *Arthrobacter sp.*, *Bacillus circulans*, *Cytophage johnsonii*.

Enzym β – (1 – 6) – gluconaza có thể được sinh ra từ một số trong

số loài kể trên. Đó là: *Bacillus circulans*, *Cytophaga johnsonii*, *Penicillium lilacinum*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Streptomyces parvus* (R.G.Broun - 1967, 1972, 1973).

3.2. NHÂN TỐ NGOẠI CẢNH ẢNH HƯỞNG ĐẾN QUÁ TRÌNH PHÂN GIẢI HEMIXENLULO

Quá trình phân giải hemixenlulo tiến hành song song với quá trình phân giải xenlulo. Trong điều kiện yếm khí, sự phân giải tiến hành chậm. Các loại nấm có vai trò chủ yếu trong môi trường axit. Trong môi trường trung tính, nấm và vi khuẩn tiến hành mạnh quá trình phân giải hemixenlulo. Cũng có một số vi sinh vật ưa nóng phân giải hemixenlulo. Như vậy chẳng những quá trình phân giải hemixenlulo tiến hành song song với quá trình phân giải xenlulo mà hơn nữa 2 quá trình này có nhiều điểm rất giống nhau và một số lớn vi sinh vật phân giải xenlulo cũng đồng thời là những vi sinh vật phân giải hemixenlulo.

IV- QUÁ TRÌNH PHÂN HUỖ, CHUYỂN HOÁ PECTIN

4.1. CHẤT PECTIN

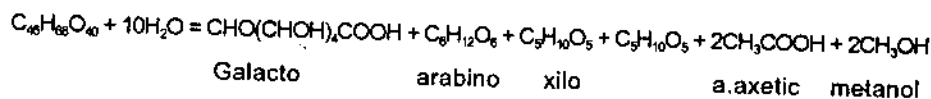
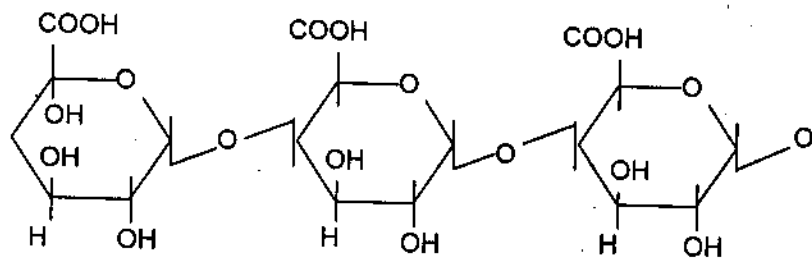
Các chất pectin đều là những hợp chất cao phân tử có bản chất glucit. Chúng có nhiều trong quả, củ, hạt và thân thực vật. Trong thực vật, chất pectin có mặt ở dạng protopectin không tan.

Propectin chuyển thành pectin hoà tan chỉ sau khi xử lý bằng axit loãng hoặc dưới tác dụng của men protopectinaza. Loại pectin không hoà tan (hay protopectin) là thành phần quan trọng của chất gian bào, làm nhiệm vụ liên kết các tế bào thực vật với nhau.

4.2. CƠ CHẾ PHÂN GIẢI

Người ta chia pectin thành 3 loại: pectin không hoà tan, pectin hoà tan, axit pectinic và axit pectic.

Dưới tác dụng của men protopectinaza, người ta nhận thấy protopectin (pectin không hoà tan) chuyển thành pectin hoà tan. Dưới tác dụng của men pectaza (pectin metinesteraza) các dây nối este sẽ đứt và tạo thành axit pectinic tự do và methanon. Men pectinaza (poligalacturinaza) phân giải các phân tử axit pectinic và tạo thành axit D.galacturinic.



Hình 4.5. Phân tử pectin hoà tan

4.3. VI SINH VẬT PHÂN GIẢI PECTIN

Nhiều loại nấm và vi khuẩn có khả năng phân giải pectin. Trong mỗi gam đất thường có hàng chục vạn tế bào vi sinh vật có khả năng phân giải pectin. Những loại vi sinh vật có khả năng phân giải pectin mạnh mẽ, nhất là *Bacillus macerans*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus mesentericus*, *Bacillus polymyxa*, *Clostridium pectororum*, *C. felsineum*, *Fusarium oxysporum*.

– Vi sinh vật yếm khí:

+ *Clostridium pectororum* hình que (10 – 12 x 0,8μm), Gram dương, chu tiên mao, bào tử đính ở đỉnh tế bào (nha bào), khuẩn lạc không màu hoặc hơi trắng, có thể lên men pectin, tinh bột, gluco, không phân giải được xenlulo. Phân giải pectin cho axit butyric, axit axetic, H₂ và CO₂. Có lúc sản sinh ra rượu butylic, axeton.

+ *C. felsineum* (3,5 – 5 x 0,3 – 0,4μm), nha bào ở giữa cơ thể, khuẩn lạc màu vàng hoặc màu nâu vàng, có thể sinh trưởng, phát triển ở nhiệt độ tương đối cao, phân giải pectin sản sinh ít axit butyric.

– Vi sinh vật hiếu khí phân giải pectin:

+ Sản phẩm thuỷ phân có thể oxy hoá triệt để.

+ Ngoài vi khuẩn, một số nấm như *Mucor stolonifer* có khả năng phân giải pectin mạnh. Nấm *Botrytis cinerea*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Alternaria*.

+ Ngoài vi khuẩn và nấm, một số xạ khuẩn như *Streptomyces*, *Nocardia* cũng có khả năng phân giải pectin.

4.4. ĐIỀU KIỆN NGOẠI CẢNH ẢNH HƯỞNG ĐẾN QUÁ TRÌNH PHÂN HỦY, CHUYỂN HOÁ PECTIN

Vi khuẩn yếm khí (*Clostridium*) ở đất tưới nước bình thường và

trong rơm rác độn chuồng số lượng không lớn. Số lượng chúng tập trung hơn ở những đất ngập nước, ở những ao hồ nước đọng và trong những đất bón nhiều phân hữu cơ. Tuy nhiên, số lượng của chúng luôn luôn nhỏ hơn vì khuẩn phân giải pectin hảo khí (Y. Dommergues và F. Mangenot).

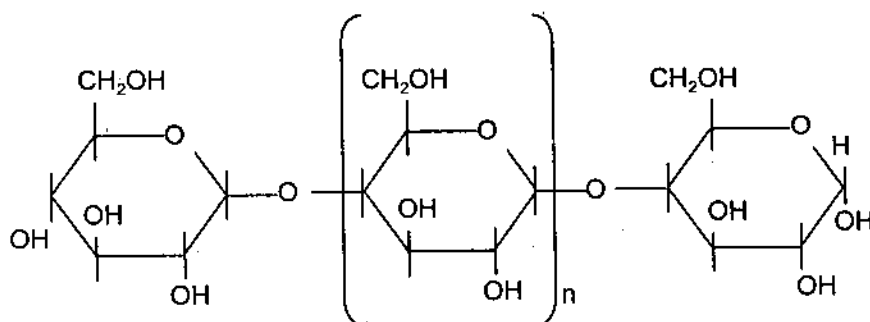
Ở đất có pH thấp, quá trình phân giải pectin thường là do nấm mốc. Chúng có số lượng lớn, pH lớn hơn 5,5 nhất là những đất trung tính, số lượng *Actinomyces* và vi khuẩn chiếm ưu thế. Chất hữu cơ phong phú kích thích toàn bộ hệ vi sinh vật phân giải pectin trong đất.

V- QUÁ TRÌNH PHÂN GIẢI TINH BỘT

5.1. CHẤT TINH BỘT

Tinh bột là chất dự trữ chủ yếu của thực vật. Nó phản ứng với iot tạo thành hợp chất có màu lam tím. Trong tế bào thực vật, tinh bột tồn tại dưới dạng các hạt tinh bột. Các hạt tinh bột có kích thước và hình dạng thay đổi tùy loại thực vật (thường từ 2 – 170 μ m).

Tinh bột gồm hai thành phần khác nhau: amilo (amilose) và amilopectin (amilopectine). Amilo tan trong nước nóng còn amilopectin thì tạo thành hồ.

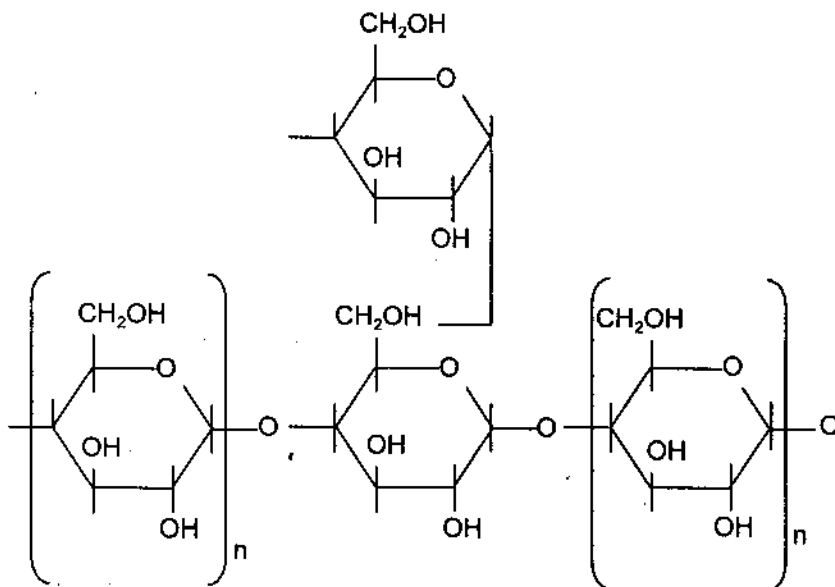


Hình 4.6. Cấu tạo của Amilo ($n > 100$)

Amilo có chứa $\leq 0,03\%$ phospho, hiện màu xanh với dung dịch iot. Amilo là những chuỗi không phân nhánh, cũng cấu tạo bởi các gốc α -D-glucopirano, liên kết với nhau bằng dây nối 1 – 4 glucosit.

Amilopectin có chứa từ 0,1 – 0,8% P_2O_5 . Đó là một chuỗi phân nhánh cấu tạo bởi các gốc α -D-glucopirano, liên kết với nhau bằng

dây nối 1 – 4 và 1 – 6 glucosit. Amilopectin như một loại xi măng, co giãn được, liên kết các tinh thể amilo với nhau. Amilopectin có cấu tạo như sau ($m = 25 - 30$).



Hình 4.7. Cấu tạo của Amilopectin ($n = 25 - 30$)

5.2. ENZYM PHÂN GIẢI TINH BỘT

Nhiều loại vi sinh vật có khả năng sản sinh enzym amilaza ngoại bào tiến hành phân giải tinh bột thành các thành phần đơn giản hơn. Có thể phân biệt một số loại amilaza sau đây:

a) α -amilaza: Tác động đồng thời lên nhiều dây nối ($\alpha - 1 - 4$) kể cả các dây nối bên trong đại phân tử (vì vậy còn gọi là enzym endoamilaza). α -amilaza làm dịch hoá một cách nhanh chóng tinh bột. Sản phẩm quá trình phân giải này ngoài mantozơ còn có các oligomer chứa 3 – 4 gốc gluco.

b) β -amilaza: Khác với α -amilaza, men β -amilaza chỉ tác động vào phần ngoài đại phân tử (vì vậy còn có tên gọi là exoamilaza). Dưới tác dụng của β -amilaza, tinh bột vẫn giữ khá lâu. Phản ứng màu iot nhưng được đường hoá khá nhanh. Những β -dextrin còn lại sau tác dụng của β -amilaza được gọi là các dextrin tận cùng.

c) Amila 1- 6 glucosidaza: phân cách dây nối 1 – 6 glucosit (ở chỗ phân nhánh).

d) **Glucoamilaza:** phân giải tinh bột thành gluco và các α -oligosaccharit. Một số thực nghiệm cho biết, ngoài việc phân cắt dây nối $\alpha - 1 - 4$, men glucoamilaza còn có thể cắt cả dây nối $\alpha - 1 - 6$.

5.3. VI SINH VẬT PHÂN GIẢI TINH BỘT

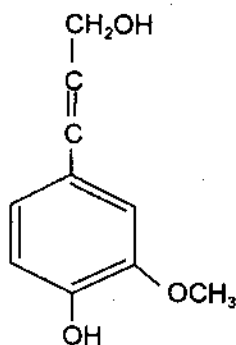
Aspergillus cadidus, *Asp.niger*, *Asp.oryzae*, *B.mesentericus*, *B.sulitilis* có khả năng tiết ra enzym α .amilaza:

**BẢNG 4.1. MỘT SỐ GIỐNG VI SINH VẬT CHÍNH
CÓ KHẢ NĂNG TIẾT RA ENZYM PHÂN GIẢI TINH BỘT**

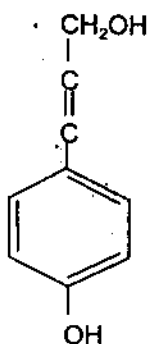
Loại amilaza	Vi sinh vật
α -amilaza	<i>Aspergillus candidus</i> <i>A.niger</i> <i>A.oryzae</i> <i>Bacillus macerans</i> <i>Bacillus mesentericus</i> <i>B.sulitilis</i> <i>Candida sitophila</i> <i>Candida japonica</i> <i>Clostridium acetobutylicum</i> <i>Clostridium butyricum</i> <i>Clostridium pasteurianum</i> <i>Endomycopsis capsularis</i> <i>Pseudomonas saccharophila</i> <i>Pullularia pullulans</i> <i>Rhizopus avannicus</i> <i>Rhizopus tonkinensis</i> <i>Streptomyces bovis</i> <i>Streptomyces aureofaciens</i>
β -amilaza	<i>Aspergillus awamori</i> <i>Aspergillus oryzae</i> <i>Candida sitophila</i> <i>Clostridium acetobutylicum</i> <i>Rhizopus javanicus</i> <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Glucoamilaza	<i>Aspergillus awamori</i> <i>Aspergillus niger</i> <i>Aspergillus oryzae</i> <i>Rhizopus niveus</i> <i>Rhizopus tonkinensis</i> <i>Saccharomyces cerevisiae</i>

VI- SỰ PHÂN GIẢI LIGNHIN (LIGININE)

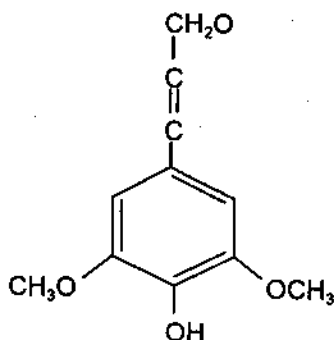
6.1. CÔNG THỨC LIGNHIN LÀ $C_{18}H_{30}O_{15}$



Rượu coniferilic

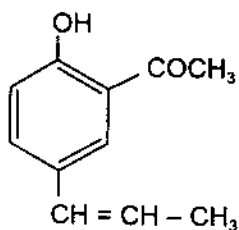


Rượu p.oxixinnamic

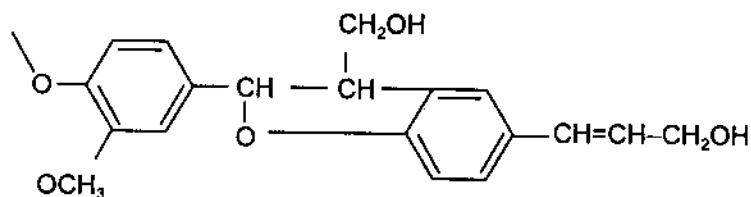


Rượu xinapilic

Trong lignhin nguyên thể, người ta cho rằng có sự tồn tại của các cấu trúc dehydro izoeugenol.



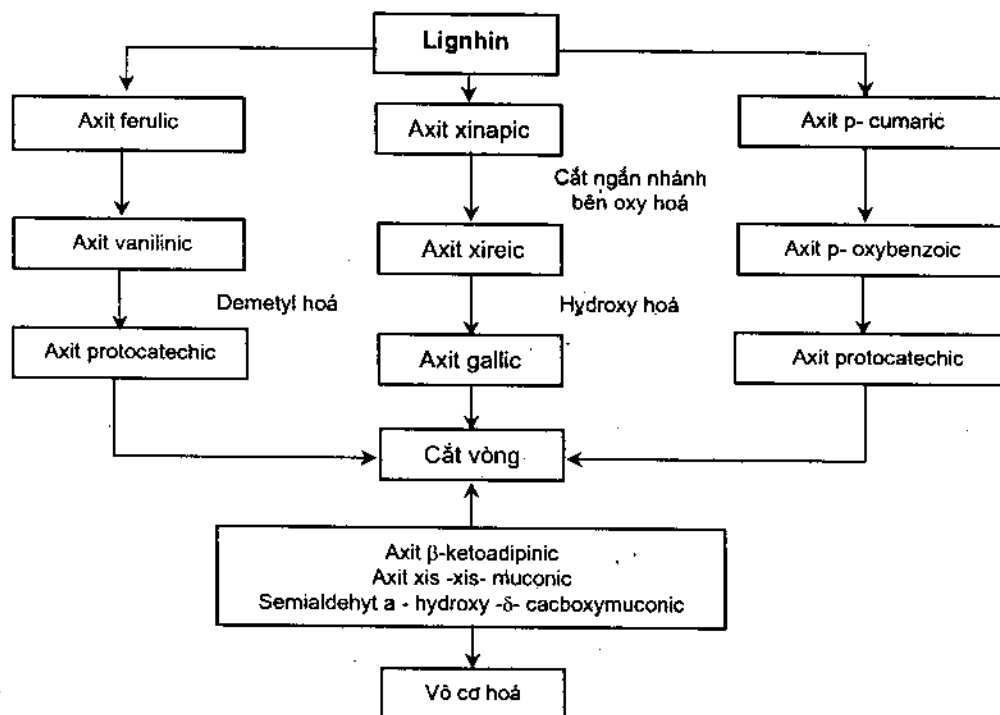
Axit ferulic



Một đoạn của lignhin nguyên thể

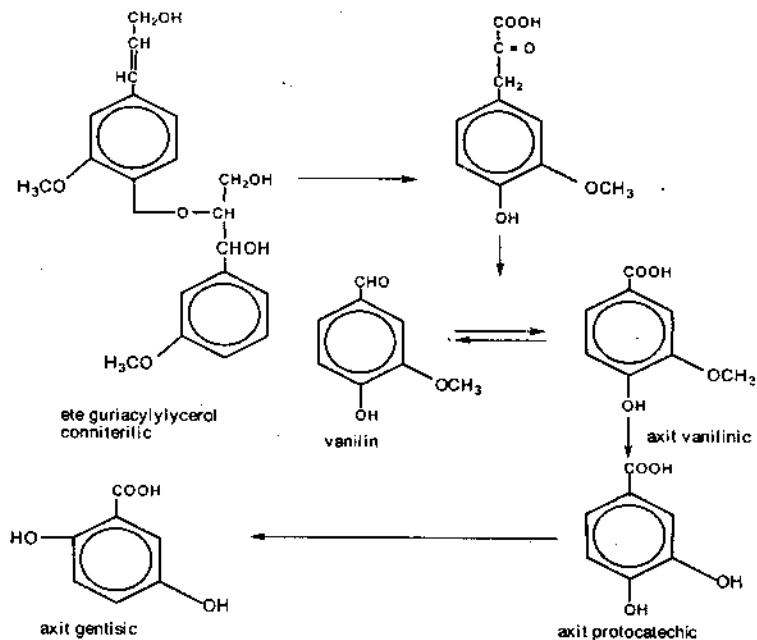
6.2. CƠ CHẾ PHÂN GIẢI LIGNHIN

Người ta có thể tìm thấy tàn dư thực vật bị phân giải thành bột màu trắng các axit vanilic, axit syringic và axit parahydroxybenzoic với tỷ lệ khác nhau tùy theo mức độ phân giải lignhin. Người ta cũng gặp những aldehyt và rượu tương ứng. Như vậy vì sinh vật phân giải lignhin có thể đồng thời tiến hành quá trình oxy hoá và quá trình khử những sản phẩm ấy. Người ta cũng gặp những trường hợp chất ấy trong khi oxy hoá lignhin bởi nitro benzen alcalin (Henderson, 1955).



Hình 4.8. Sơ đồ phân giải lignhin

Cơ chế phân giải lignhin có thể trình bày theo Henderson 1955, như sau:



Hình 4.9. Sơ đồ phân giải lignhin

6.3. VI SINH VẬT PHÂN GIẢI LIGNHIN

Basidiomycetes (phá hoại gỗ), *Polysitctus versicolor*, *Stereum hisutum*, *Pholiota*, *Clytocybe*, *Lenzites*, *Trametes*. *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Agrobacterium*.

Về nấm mốc, người ta chia thành 3 loại hình:

– Phân giải lignhin cho những bột nát mềm: Do nấm *Ascomycetes* (*chaetomium*, *xylaria*, *hypoxylon*) và nhiều nấm bất toàn *Conythyrium*, *Stysanus*, *Alternaria*,...

– Phân giải lignhin cho những bột nát màu nâu: *Gyrophana lacrymans*, *Armillariella mellea*, *Laccaria lacata*,... chúng đều thuộc *Basidiomycetes*.

– Phân giải lignhin cho bột nát màu trắng: Do nấm *Ascomycetes*, *Hypoxylon*, *Xylaria*,... Ngoài nấm *Ascomycetes* còn có *Basidiomycetes*, *Agaricales* (*Pholliota*) hay *Aphyllphorales* (*stereum*, *coriolus*, *fomes*,...).

VII- QUÁ TRÌNH LÊN MEN

7.1. QUÁ TRÌNH LÊN MEN ETYLIC (ETHYLIQUE)

7.1.1. Định nghĩa

Dưới tác dụng của một số loại vi sinh vật trong điều kiện yếm khí, các hợp chất hữu cơ bị chuyển hoá thành đường gluco, sau đó tiếp tục chuyển hoá thành etylic và CO_2 , đồng thời giải phóng năng lượng. Quá trình này gọi là quá trình lên men etylic, hay còn gọi là quá trình lên men rượu.

7.1.2. Vi sinh vật chủ yếu

Saccaromyces cerevisiae, *Sac. vinii*, *Sac. uvarum*, *Sac. bergensis*, *Sac. schizo*,...

7.1.3. Cơ chế

Hợp chất hữu cơ $\rightarrow \text{C}_2\text{H}_5\text{OH} + \text{CO}_2 + \text{Q}$

7.1.4. Điều kiện môi trường lên men

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

pH = 4 – 6 (môi trường chua) thì kết quả cho etylic. Nếu pH = 8, thì ngoài etylic còn thu được axit axetic hoặc một số axit hữu cơ khác.

Nhiệt độ giới hạn từ 3 đến 45°C, nếu < 10°C gọi là lên men lạnh, > 10°C gọi là lên men nóng.

7.2. LÊN MEN LACTIC

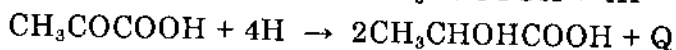
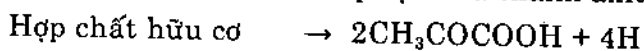
7.2.1. Định nghĩa

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

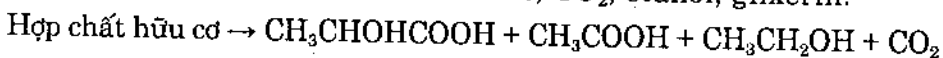
7.2.2. Cơ chế quá trình

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

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



Trong quá trình lên men lactic dị hình, ngoài axit lactic còn tạo thành các sản phẩm khác như axit axetic, CO₂, etanol, glixerin.



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

Vi khuẩn lên men lactic dị hình thuộc họ *Streptococcaceae*, *Lactobacillaceae*. Vi khuẩn lactic thuộc giống *Lactobacillus*, chúng đều là vi khuẩn không sinh bào tử, Gram dương (trừ loài *Lactobacillus inulinus*), thường không di động. Khác với các vi khuẩn thuộc họ *Enterobacteraceae* (cũng có khả năng sản sinh axit lactic), *Lactobacillus* không chứa các loại hemoprotein (như xitocrom catalaza), chúng thuộc loại kỵ khí hoặc vi hiếu khí (*Microaerophil*).

7.2.3. Điều kiện lên men lactic

Vi khuẩn lactic thường ở nhiệt độ cao thì phát triển tốt. Tùy loại, yêu cầu nhiệt độ có khác nhau nhưng để thuận lợi cho quá trình lên men, nhiệt độ thường từ 20°C đến 45°C. pH = 4 – 8. Vi khuẩn lactic

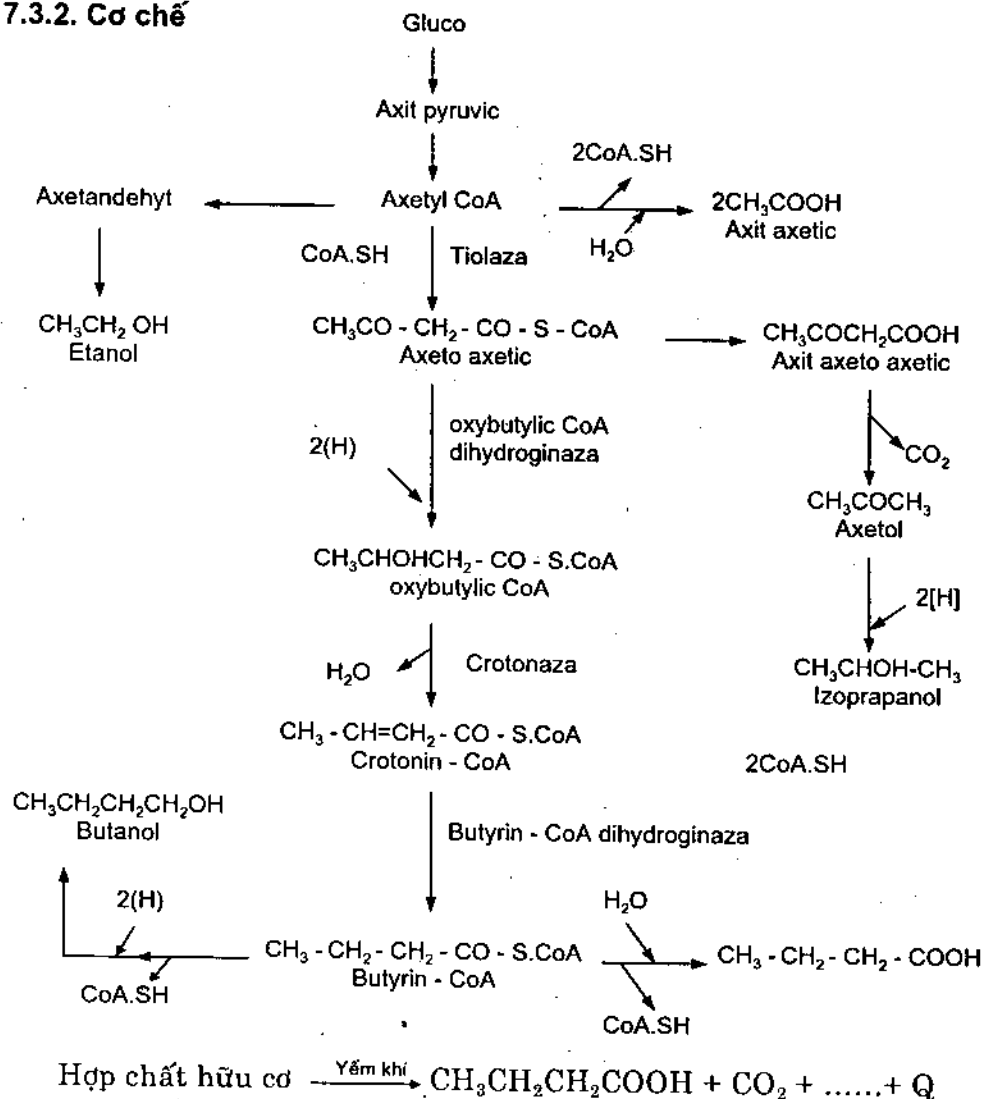
thường ít gặp trong đất và trong nước. Chúng thường phát triển ở những nơi có chứa nhiều chất hữu cơ phức tạp như trên xác thực vật, sữa,...

7.3. LÊN MEN BUTYRIC

7.3.1. Định nghĩa

Trong tự nhiên, các hợp chất hữu cơ, dưới tác dụng của một số vi sinh vật yếm khí được chuyển hoá để cho axit butyric gọi là quá trình lên men butyric.

7.3.2. Cơ chế



Hình 4.10. Cơ chế lên men butyric

7.3.3. Vi sinh vật lên men butyric

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

Căn cứ vào các sản phẩm lên men khác nhau, người ta chia *Clostridium* thành nhóm sinh lý khác nhau:

BẢNG 4.2. MỘT SỐ LOÀI CLOSTRIDIUM THAM GIA LÊN MEN BUTYRIC

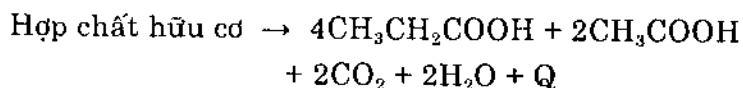
Nhóm và loài <i>Clostridium</i>	Cơ chất	Sản phẩm lên men
1. Nhóm lên men butyric		
<i>C. butyricum</i>	Glucose, tinh bột, dextrin	Axit butyric, axit axetic, H ₂ , CO ₂
<i>C. lactoacetophilum</i>	Glucose, lactat (glixerint axetat)	nt
<i>C. pasteurianum</i>	Glucose, tinh bột, manit inulin	nt
<i>C. pectinovorum</i>	Pectin, tinh bột, glicogen, dextrin	axit butyric, axit axetic
2. Nhóm sinh butanol		
<i>C. butylicum</i>	Glucose	Axit butyric, axit axetic, butanon
<i>C. acetobutylicum</i>	Glucose, glycerin, pyruvat	Izopropamin, CO ₂ , H ₂ Axit butyric, axit axetic
3. Nhóm sinh axit propionic		
<i>C. propionicum</i>		
4. Nhóm sinh axit capronic		
<i>C. kluyveri</i>	Alanin, treonin	Butanon axeton, CO ₂ , H ₂ Axit axetic, axit propionic, CO ₂
5. Nhóm có phản ứng Stickland	Protein, axit amin	Axit axetic, axit lactic, NH ₃ , H ₂
<i>C. botulinum</i>		
<i>C. histolyticum</i>		
<i>C. sporogenes</i>		
<i>C. sticklandii</i>		
6. Nhóm có các kiểu trao đổi chất đặc biệt		
<i>C. acetium</i>	CO ₂ + H ₂ + fructose	Axit axetic
<i>C. tetanomorphum</i>	Glutamat, histidin	Axit butyric, axit axetic, NH ₃ , CO ₂ , N ₂
<i>C. acidurici</i>	Axit uric, xanlin	Axit axetic, axit fomic, CO ₂ , NO ₃

7.4. LÊN MEN PROPIONIC

7.4.1. Định nghĩa

Quá trình chuyển hoá từ hợp chất hữu cơ trong điều kiện yếm khí thành axit propionic, axit axetic, CO_2 dưới tác dụng của một số chủng VSV.

7.4.2. Cơ chế lên men propionic



7.4.3. Vi sinh vật

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

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

7.5. LÊN MEN METAN

7.5.1. Định nghĩa

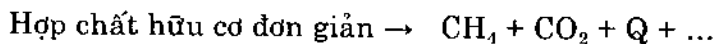
Dưới tác dụng của một số vi sinh vật, một số hợp chất hữu cơ sẽ bị chuyển hoá để cho chúng ta khí CH_4 gọi là quá trình lên men metan.

7.5.2. Cơ chế lên men metan

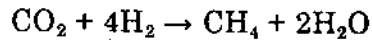
Quá trình này có thể chia làm hai giai đoạn:

Giai đoạn đầu là giai đoạn phân giải các hợp chất hữu cơ phức tạp thành các axit hữu cơ, axit béo, CO_2 , Q.

Giai đoạn hai là giai đoạn chuyển hoá hợp chất hữu cơ đơn giản thành CO_2 , CH_4 , Q,...

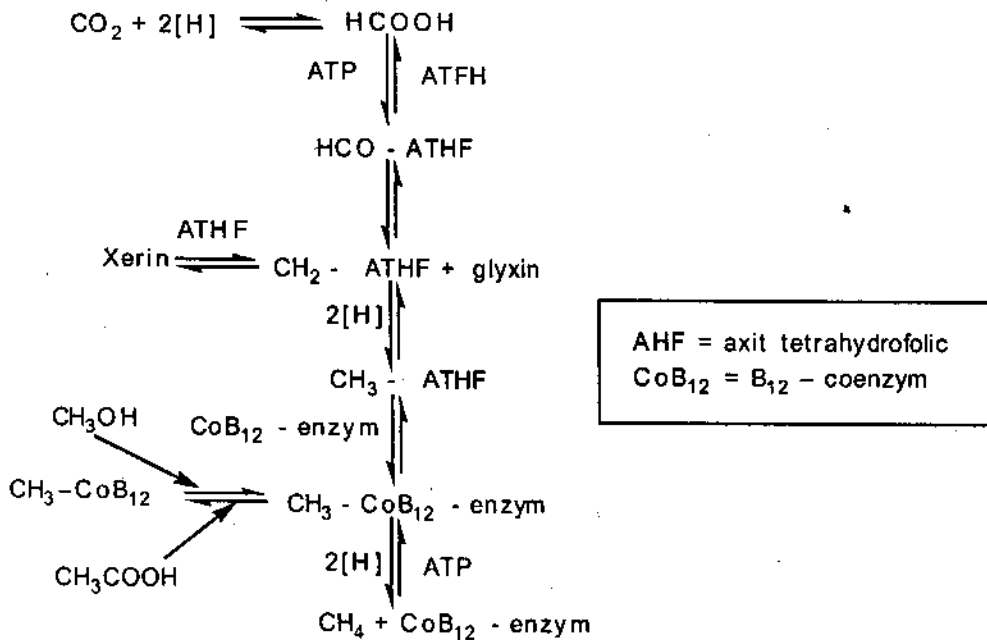


Hai quá trình này đều do Stadman và Barket chứng minh năm 1949. Metan còn có thể được hình thành do khử CO_2 của *Methanobacterium* (một hỗn hợp chung mà trước đây thường gọi là *Methanobacterium omelianskii*). Trong trường hợp này chất cho hydro là H_2 .



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

Cơ chế lên men metan có thể trình bày bằng sơ đồ sau:



Hình 4.11. Cơ chế lên men metan

7.5.3. Vi sinh vật lên men metan

Vi sinh vật phân giải xenlulo, vi sinh vật phân giải pectin, vi sinh vật phân giải protein, vi sinh vật phân giải lipid, vi sinh vật phân giải các hydrat cacbon khác đều tham gia vào quá trình lên men metan.

Methanobacterium soehngenii, *Saricina methanica*, *Micrococcusnazei*,... Đặc biệt các giống vi khuẩn yếm khí, như: *Methanococcus*, *Methanosarcina*,... có thể chuyển hoá thành CH_4 .

Vi sinh vật lên men metan là vi sinh vật yếm khí bắt buộc, ưa nhiệt độ trung bình, một số thích nhiệt độ cao, pH từ chua đến trung tính hoặc hơi kiềm, cơ chất có thể là hợp chất hữu cơ.

BẢNG 4.3. NGUỒN CACBON ĐỂ VI KHUẨN TẠO THÀNH CH₄

Vi khuẩn metan	Cơ chất (chất cho [H])	Nguồn cacbon để tạo thành CH ₄
<i>Methanobacterium M₀-H</i>	H ₂	CO ₂
<i>Methanosarcina barkeri</i>	H ₂ , CO ₂ , metanol, axetat	CO ₂ , CO
<i>Methanobacterium formicium</i>	H ₂ , CO, focmat	CO ₂
<i>Methanococcus vanniellii</i>	H ₂ , focmat	CO ₂
<i>Methanobacterium ruminantium</i>	H ₂ , focmat	CO ₂
<i>Methanobacterium suboxydans</i>	Butirat, valerat, capronat	CO ₂
<i>Methanobacterium sohygenii</i>	Axetat, butirat	Nhóm - CH ₃
<i>Methanosarcian methanica</i>	Axetat, metanol, butirat	Nhóm - CH ₃
<i>Methanococcus mazei</i>	Axetat, butirat	Nhóm - CH ₃

Chương V

SINH VẬT ĐẤT TRONG QUÁ TRÌNH PHÂN HUỖ, CHUYỂN HOÁ CÁC HỢP CHẤT VÀ CÁC NGUYÊN TỐ TRONG ĐẤT

I- TÁC DỤNG CỦA SINH VẬT ĐẤT TRONG QUÁ TRÌNH CHUYỂN HOÁ NITƠ

1.1. VÒNG TUẦN HOÀN NITƠ TRONG TỰ NHIÊN

– Nitơ là nguyên tố dinh dưỡng quan trọng không thể thiếu đối với động vật, thực vật mà ngay cả đối với các loài vi sinh vật. Dự trữ nitơ trong tự nhiên rất lớn: trong không khí, nitơ chiếm 78,16% thể tích. Người ta ước tính rằng, trong bầu không khí bao trùm lên một hecta đất đai chứa tới 8 triệu tấn nitơ. Lượng nitơ này có thể cung cấp cho cây trồng tới hàng chục triệu năm (nếu như cây trồng có khả năng đồng hoá nó). Trong cơ thể các loại sinh vật trên trái đất cũng có khoảng $(10 + 25) \times 10^9$ tấn nitơ. Trong các vật trầm tích chứa khoảng 4×10^{15} tỷ tấn nitơ.

– Nhưng cây trồng không đồng hoá trực tiếp nitơ hữu cơ, mà phải nhờ các loại vi sinh vật phân huỷ và chuyển hoá nguồn nitơ bền vững thành ra nitơ dạng dễ tiêu (NH_3 hoặc NH_4^+), cung cấp nguồn dinh dưỡng nitơ cho cây trồng, quá trình này được gọi là *quá trình amon hoá*.

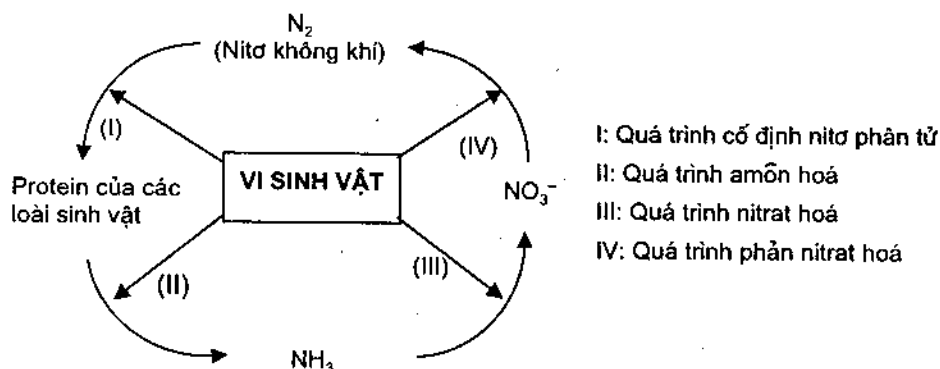
– Tiếp nối quá trình amon hoá, các loài vi sinh vật lại chuyển hoá tiếp từ NH_3 thành NO_3^- được gọi là *quá trình nitrat hoá*.

– Tiếp theo của quá trình nitrat hoá, các loại vi sinh vật lại chuyển hoá từ NO_3^- thành N_2 để bù trả nitơ cho không khí được gọi là *quá trình phản nitrat hoá*.

– Dưới tác dụng của các loại vi sinh vật, nitơ không khí được chuyển vào các hợp chất hữu cơ chứa nitơ được gọi là *quá trình cố định nitơ phân tử*.

Tất cả các quá trình: cố định – phân huỷ – chuyển hoá và phản nitrat hoá luôn luôn xảy ra dưới tác dụng của các loài vi sinh vật và tạo được thể cân bằng nitơ. Nhờ đó mà đã khép kín được vòng tuần hoàn nitơ trong tự nhiên.

Đứng về phương diện vi sinh vật, chúng ta tóm tắt sơ đồ vòng tuần hoàn nitơ trong tự nhiên như hình 5.1.



Hình 5.1. Sơ đồ vòng tuần hoàn N

1.2. QUÁ TRÌNH CỐ ĐỊNH NITƠ PHÂN TỬ

Hàng năm nông phẩm trên toàn thế giới lấy đi từ đất hàng trăm triệu tấn nitơ. Bằng cách bón phân con người mới trả lại cho đất khoảng 50%. Lượng thiếu hụt còn lại cơ bản được bổ sung bằng nitơ do các loài vi sinh vật tổng hợp nên. Vì vậy việc nghiên cứu, sử dụng nguồn đạm sinh học được xem là một giải pháp quan trọng trong ngành nông nghiệp. Đặc biệt điều đó càng có ý nghĩa với một nước nông nghiệp có nền công nghiệp hoá chưa phát triển.

Mặt khác trong công nghiệp hoá học, để phá vỡ mối liên kết 3 của phân tử nitơ, tạo ra phân nitơ hoá học thì cần phải trải qua quá trình kỹ thuật rất tốn kém như ở nhiệt độ cao ($150^{\circ}C$), áp suất lớn (200atm) và phải dùng các loại xúc tác đắt tiền. Trong khi đó các loài vi sinh vật đồng hoá nitơ từ không khí một cách dễ dàng và thường xuyên xảy ra. Người ta gọi việc làm này là quá trình cố định nitơ phân tử.

Bản chất của quá trình cố định nitơ phân tử được hai nhà bác Hellriegel và Uynfac tìm ra năm 1886. Nhưng mãi đến năm 1964, việc nghiên cứu về quá trình cố định nitơ phân tử này mới được coi là một trong hai vấn đề quan trọng nhất của chương trình sinh học quốc

tế (IBP). Ở Việt Nam từ những năm đầu của thập kỷ 60 thế kỷ XX đã chú ý đến hướng nghiên cứu này và được chính thức đưa vào đề tài cấp Nhà nước năm 1980, với chủ đề “Sinh học phục vụ nông nghiệp” nay là “Công nghệ sinh học”.

1.2.1. Quá trình cố định nitơ phân tử tự do

1.2.1.1. Vi khuẩn *Azotobacter*

Năm 1901, Beijerinck phân lập được từ đất một loài vi khuẩn Gram âm, không sinh bào tử, có khả năng cố định nitơ phân tử. Ông đặt tên cho loài vi khuẩn này là *Azotobacter chroococcum*.

Vi khuẩn *Azotobacter* khi nuôi cấy trong các môi trường nhân tạo thường biểu hiện đặc tính đa hình. Tế bào khi còn non thường có tiên mao (flagellum) có khả năng di động được. Ngoài ra tế bào còn có tiêm mao. Khi già, tế bào thường được bao bọc lớp vỏ dày và tạo thành nang xác. Khi gặp điều kiện thuận lợi, nang xác sẽ nứt ra và tạo thành các tế bào mới.

Trên môi trường có chứa etanol, *Azotobacter* có dạng hình que, hình bầu dục, kích thước tế bào $1,8 - 2,5 \times 2,5 - 5,5 \mu\text{m}$.

Trên môi trường đặc, khuẩn lạc của *Azotobacter* có dạng nhày, đàn hồi, khá lồi, có khi ở dạng nhẵn nhéo.

Khi già, khuẩn lạc có màu vàng lục, màu hồng hoặc màu nâu đen. Màu sắc khuẩn lạc là một trong những tiêu chuẩn để phân loại các loài *Azotobacter*.

Azotobacter có các loài chủ yếu sau đây:

a) *Azotobacter chroococcum* (đồng danh: *Az. acidum*, *Az. araxii*, *Az. nigricans*, *Az. galophilum*, *A. unicapsulare*, *Az. woodswanii*)

Azotobacter chroococcum có kích thước tế bào $2,0 \times 3,1 \mu\text{m}$. Có khả năng tạo nang xác, có khả năng di động được, có tiên mao (flagellum). Khuẩn lạc khi già có màu nâu đen, sắc tố không khuếch tán vào môi trường. Có khả năng đồng hoá mannit, ramno, tinh bột.

b) *Azotobacter beijerinckii* có kích thước tế bào $2,4 \times 5,0 \mu\text{m}$, có khả năng tạo nang xác, không có tiên mao, không di động được. Khi già có màu vàng, hoặc màu nâu sáng. Sắc tố không khuếch tán vào môi trường. Có khả năng đồng hoá mannit, ramno, không đồng hoá tinh bột, nhưng đồng hoá được benzoat natri.

c) *Azotobacter vinelandii* (đồng danh: *Az.smyrnii*, *Az.hilgardii*, *Az.vitreum*, *Az.fluorescens*). Tế bào có kích thước $1,5 \times 3,4\mu\text{m}$, có khả năng tạo nang xác, có tiên mao, có khả năng di động. Sinh sắc tố màu vàng lục huỳnh quang, sắc tố khuếch tán vào môi trường, có khả năng đồng hoá mannit, ramno, có khả năng đồng hoá benzoat natri.

d) *Azotobacter agillis* (đồng danh: *Az.agile* – *Azotobacter agile*). Tế bào có kích thước $2,8 \times 3,3\mu\text{m}$. Không tạo nang xác, có tiên mao (flagellum), có khả năng di động được. Khi già khuẩn lạc có màu vàng lục huỳnh quang. Sắc tố khuếch tán vào môi trường. Không có khả năng đồng hoá benzoat natri, mannit và ramno.

Azotobacter không có khả năng đồng hoá chất mùn, chúng phát triển mạnh ở môi trường giàu chất hữu cơ dễ đồng hoá. Đất có bón phân xanh, phân chuồng, rơm rạ, có tác dụng thúc đẩy sự phát triển của *Azotobacter*. Trong đất, *Azotobacter* đồng hoá rất tốt các sản phẩm phân giải của xenlulo.

Azotobacter có thể đồng hoá nhiều hợp chất hữu cơ và vô cơ chứa phosphat. Sự miễn cảm cao của *Azotobacter* đối với phospho chứa trong môi trường cho phép người ta sử dụng chúng như là loài vi sinh vật chỉ thị để định lượng phospho dễ tiêu trong đất. Canxi cũng có ảnh hưởng lớn đến sự phát triển của *Azotobacter*. Vì vậy người ta cũng dùng *Azotobacter* là vật chỉ thị để xác định nhu cầu bón vôi cho từng loại đất.

Các nguyên tố vi lượng (B, Mo, Fe, Mn) cũng rất cần thiết đối với *Azotobacter*. Chúng đã giúp cho quá trình cố định nitơ tiến hành được thuận lợi.

Các nguyên tố phóng xạ (radi, tori, urani) có khả năng kích thích sự phát triển của *Azotobacter* và quá trình cố định nitơ của chúng.

Azotobacter rất miễn cảm với pH. Nói chung chúng có thể phát triển được ở pH = 4,5 – 9,0. Nhưng pH thích hợp nhất đối với *Azotobacter* là pH = 7,2 – 8,2. Môi trường axit (chua) rất bất lợi đối với sự phát triển và hoạt động sống của *Azotobacter* và ảnh hưởng rất xấu đến quá trình cố định nitơ của *Azotobacter*. Tế bào *Azotobacter* có áp suất thẩm thấu thấp hơn so với tế bào nấm và xạ khuẩn. Nhu cầu về độ ẩm của *Azotobacter* tương tự đối với nhu cầu của cây trồng (là loại ưa ẩm). Nhiệt độ thích hợp 25 – 30°C, nhưng *Azotobacter* có khả năng chống chịu tốt ở nhiệt độ thấp.

Azotobacter còn có khả năng tiết ra các loại vitamin và các chất sinh học như: B1, B6,... axit nicotinic, axit pantotenic, biotin, auxin.

Azotobacter còn có khả năng tiết ra các loại thuốc kháng sinh để chống nấm thuộc nhóm Anixomixin.

1.2.1.2. Vi khuẩn *Beijeriniskii*

Năm 1893, nhà bác học Stackê (Ấn Độ) đã phân lập được loại vi khuẩn ở ruộng lúa có độ axit cao và đặt tên là *Beijeriniskii* có khả năng cố định nitơ phân tử.

Giống vi khuẩn *Beijeriniskii* có hình cầu, hình bầu dục hoặc hình que. Tế bào có kích thước $0,5 - 2,0 \times 1,0 - 4,5\mu\text{m}$. Có loài di động được và không di động được, không sinh bào tử và nang xác. Sinh trưởng chậm, khuẩn lạc của *Beijeriniskii* rất lỏng, rất nhày, không màu, khi già có màu tối.

Vi khuẩn *Beijeriniskii* có khả năng đồng hoá tốt các loại đường đơn và kép, đồng hoá yếu tinh bột và axit hữu cơ. Khác với *Azotobacter*, *Beijeriniskii* có tính chống chịu cao với phản ứng axit, chúng có thể phát triển được ở môi trường pH trung tính hoặc kiềm yếu. Độ ẩm thích hợp 70 – 80% và nhiệt độ 25 – 30°C.

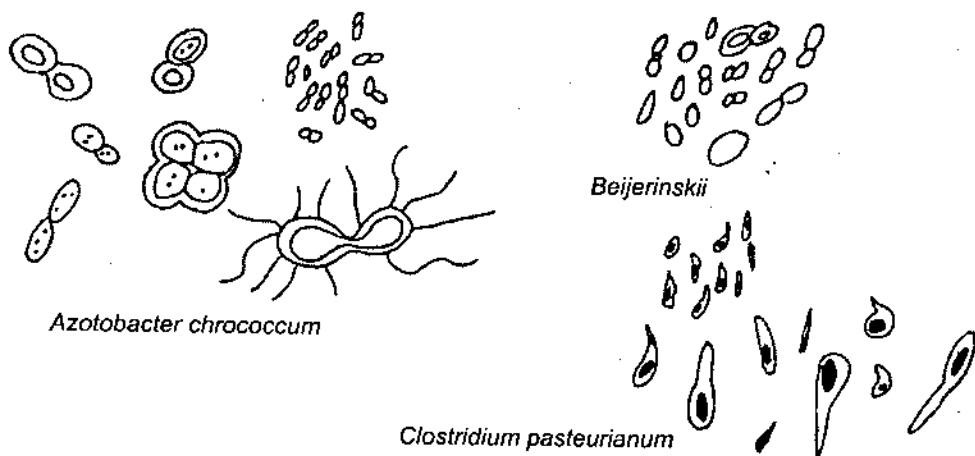
Beijeriniskii phân bố rất rộng trong tự nhiên, đặc biệt ở vùng nhiệt đới.

1.2.1.3. Vi khuẩn *Clostridium*

Năm 1939, nhà bác học người Nga Vinogradski đã phân lập được một loài vi khuẩn kỵ khí, sinh nha bào, có khả năng cố định nitơ phân tử, ông đặt tên là *Clostridium pasteurianum*. Tế bào *Clostridium pasteurianum* có kích thước $0,7 - 1,3 \times 2,5 - 7,5\mu\text{m}$. Chúng có thể đứng riêng, xếp từng đôi hoặc xếp thành chuỗi ngắn, có tiên mao, có khả năng di động. Bào tử có kích thước $1,3 \times 1,6\mu\text{m}$, có thể nằm ở giữa hoặc ở phía đầu tế bào.

Người ta chia thành nhiều loài *Clostridium*: *Clostridium butyrium*; *C.beijeriniskii*; *C.pectinovorum*. *Clostridium* có khả năng đồng hoá tất cả các nguồn thức ăn nitơ vô cơ và hữu cơ.

So với *Azotobacter*, *Clostridium* ít mẫn cảm hơn đối với P, K, Ca và có tính ổn định cao hơn đối với pH. pH = 4,5 – 8,5. Độ ẩm thích hợp 60 – 80%, nhiệt độ 25 – 30°C.



Hình 5.2. Hình dạng của một số vi khuẩn *Beijerinckii* và *Clostridium*

1.2.2. Quá trình cố định nitơ phân tử cộng sinh

1.2.2.1. Khái niệm về cố định nitơ cộng sinh và quan điểm về phân loại

– Quá trình đồng hoá nitơ của không khí dưới tác dụng của hệ cộng sinh tạo thành các hợp chất chứa nitơ (axit amin) được gọi là quá trình cố định nitơ cộng sinh. Mối quan hệ đặc biệt giữa cây họ đậu và vi khuẩn nốt sần (VKNS), hay địa y là mối quan hệ giữa nấm và tảo,...

Cây họ đậu hút nước, muối khoáng và các chất dinh dưỡng ở trong đất để nuôi cộng sinh, còn vi khuẩn nốt sần đồng hoá nitơ không khí nuôi cho hệ cộng sinh. Cứ như vậy chúng gắn bó với nhau như một cơ thể tuyệt hảo.

Vai trò của quá trình này được các nhà khoa học ví mỗi nốt sần rễ cây họ đậu là một nhà máy sản xuất phân đạm tí hon.

Đúng vậy! Năm 375 – 287 Trước Công nguyên, nhà triết học cổ Hy Lạp (theo Pharastes, trong tập “Những quan sát về cây cối”) đã coi cây họ đậu như vật bồi bổ lại sức lực cho đất. Nhận xét này đã được nhiều người cổ La Mã quan tâm vào những năm 30 Trước Công nguyên. Varron đã đề nghị luân canh cây trồng với cây họ đậu.

Ở Việt Nam, vấn đề cố định nitơ cộng sinh này cũng được chú ý từ lâu. Năm 1773, trong “Vân đài loại ngữ” của Lê Quý Đôn “Phép làm ruộng” có nói, thứ nhất là trồng đậu xanh, sau đó trồng đậu nhỏ và vừng.

Năm 1866, Hellriegel và Uynfac đã khám phá ra bản chất của quá trình cố định nitơ phân tử. Các ông đã chứng minh được khả năng của cây họ đậu lấy được nitơ khí quyển là nhờ vi khuẩn nốt sần sống trong rễ nốt sần vùng rễ cây họ đậu. Họ đã đặt tên cho vi khuẩn này là *Bacillus radicola*. Sau đó, Pramoovski đã đổi tên là *Bacterium radicola*. Cuối năm 1889, Frank đề nghị đổi tên là *Rhizobium*.

Về phân loại VKNS cho đến nay vẫn còn chưa hoàn thiện, nhưng có thể liệt kê như sau:

+ Năm 1974, theo Bergey thì VKNS bao gồm 6 loài:

Rhizobium leguminosarum

Rhizobium phaseoli

Rhizobium trifolii

Rhizobium lupini

Rhizobium japonicum

Rhizobium meliloti

+ Năm 1978, theo Mixustin thì VKNS bao gồm 11 loài:

Rhizobium leguminosarum

Rhizobium phaseoli

Rhizobium japonicum

Rhizobium vigna

Rhizobium cicer

Rhizobium lupini

Rhizobium trifolii

Rhizobium meliloti

Rhizobium simplese

Rhizobium lotus

Rhizobium robinii

+ Năm 1984, theo Bergey thì vi khuẩn nốt sần thuộc họ *Rhizobiaceae* có 2 nhóm, gồm 7 loài sau:

Nhóm 1: có 2 – 6 tiên mao, mọc theo kiểu chùm mao hoặc chu mao, phát triển nhanh trên môi trường cao nấm men (môi trường nuôi cấy VKNS).

Thuộc về nhóm 1 có 4 loài: *Rhizobium leguminosarum* (cộng sinh ở cây đậu Hà Lan); *Rhizobium phaseolii* (cộng sinh ở cây đậu Cô ve);

Rhizobium trifolii (cộng sinh ở cây cỏ Ba lá); *Rhizobium meliloti* (cộng sinh ở cây phân xanh— medicago).

Thuộc về nhóm 2 có 3 loài: *Rhizobium japonicum* (cộng sinh ở cây đậu tương); *Rhizobium vigna* (cộng sinh ở cây Đậu xanh, cây Lạc); *Rhizobium lupini* (cộng sinh ở cây Lupin).

+ Năm 1996, các nhà khoa học tạm phân loại VKNS thành 2 nhóm với 4 giống sau:

Sinorhizobium feradii.

Bradyrhizobium.

Agrobacterium.

Phyllobacterium.

Trong 4 giống trên chỉ có 2 giống là *Sinorhizobium feradii* và *Bradyrhizobium* có khả năng cố định nitơ phân tử trong nốt sần rễ cây họ đậu. Còn 2 giống *Agrobacterium* và *Phyllobacterium* cộng sinh ở cây không thuộc họ đậu Parasponia, được gọi riêng là *Trema*.

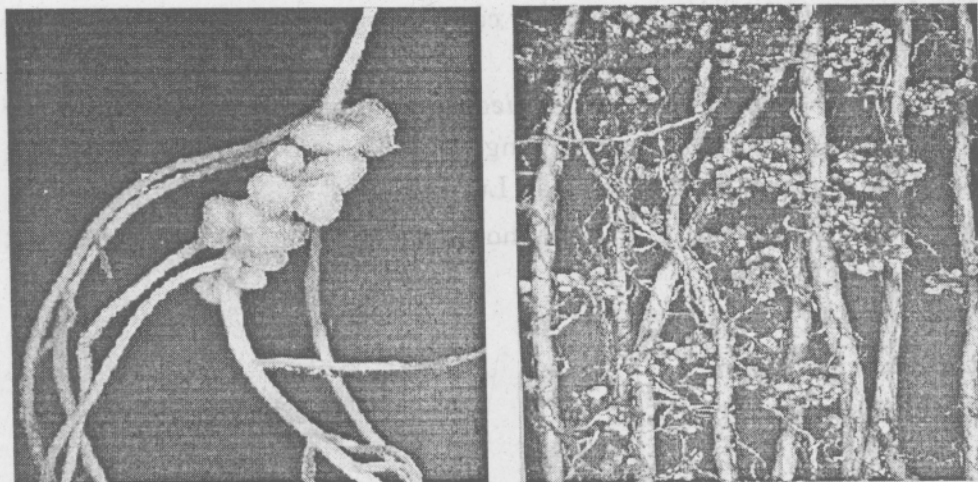
Một số nhà nghiên cứu cho rằng: *Agrobacterium* có vai trò rất lớn trên các loại đất trồng cây lâm nghiệp, cây thuốc. *Phyllobacterium* có vai trò rất lớn trên các loại đất nuôi trồng thủy hải sản.

Đặc điểm của giống *Sinorhizobium feradii* là những loài mọc nhanh, sản sinh axit, hình thành độ đục trên môi trường dịch thể. Khuẩn lạc hình thành trong 2 – 3 ngày. Có thời gian thế hệ là 2 – 4 giờ, có kích thước 0,5 – 1,3 x 2,5 – 3,0 μm . Có từ 2 – 3 roi, có khả năng di động được. Chúng phát triển tốt ở môi trường gluco, mannitol và sacarozơ. Loài vi khuẩn này thích hợp ở vùng nhiệt độ ôn hoà.

Đặc điểm của giống *Bradyrhizobium* là những loài mọc chậm, sản sinh chất kiềm. Khuẩn lạc hình thành 3 – 5 ngày. Có thời gian thế hệ là 6–8 giờ, có kích thước 0,3 – 1,2 x 2,2 – 3,2 μm , có từ 1 – 2 tiên mao, có khả năng di động được. Chúng phát triển tốt ở môi trường pentozơ.

1.2.2.2. Đặc tính sinh học và tính chuyên hoá của VKNS

– Vi khuẩn nốt sần *Rhizobium* là loại trực khuẩn hình que, hảo khí, Gram âm, không sinh nha bào, có tiên mao mọc theo kiểu đơn mao hoặc chu mao, có khả năng di động được. Khuẩn lạc có màu đục, nhầy, lồi, có kích thước 2 – 6mm. Tế bào *Rhizobium* có 0,5 – 0,9 x 1,2 – 3,2 μm . Chúng thích ứng ở pH = 6,5 – 7,5, độ ẩm 60 – 70%, nhiệt độ 28 – 30°C.



Hình 5.3. Nốt sần rễ họ đậu

Về quan hệ giữa VKNS với cây họ đậu đã được nghiên cứu rất nhiều, chúng tạo thành một thể sinh lý hoàn chỉnh, khi tách rời, khả năng đồng hoá nitơ phân tử không còn. Tất nhiên không phải cây họ đậu nào cũng có VKNS cộng sinh. Theo Anlen thì người ta mới tìm hiểu được khả năng tạo nốt sần của 1.200 loài trong số hơn 11.000 loài cây thuộc bộ đậu. Trong số 1.200 loài này có 133 loài (khoảng 9%) được chứng minh là không có khả năng tạo nốt sần. Tỷ lệ các loài không tạo thành nốt sần ở các họ khác nhau không giống nhau. Khi nốt sần đã hình thành rồi thì độ ẩm cao hay thấp ít ảnh hưởng đến hoạt động của chúng.

Độ thoáng khí của đất có liên quan đến số lượng và chất lượng nốt sần. Nốt sần tạo thành nhiều ở các rễ phân bố nông (xung quanh cổ rễ cây họ đậu), càng xuống sâu, ít oxy, số lượng nốt sần ít hơn. Điều kiện kém thoáng khí làm giảm hàm lượng sắc tố Leghemoglobin, làm giảm tính kháng nguyên và chất hoạt tính hô hấp của vi khuẩn nốt sần.

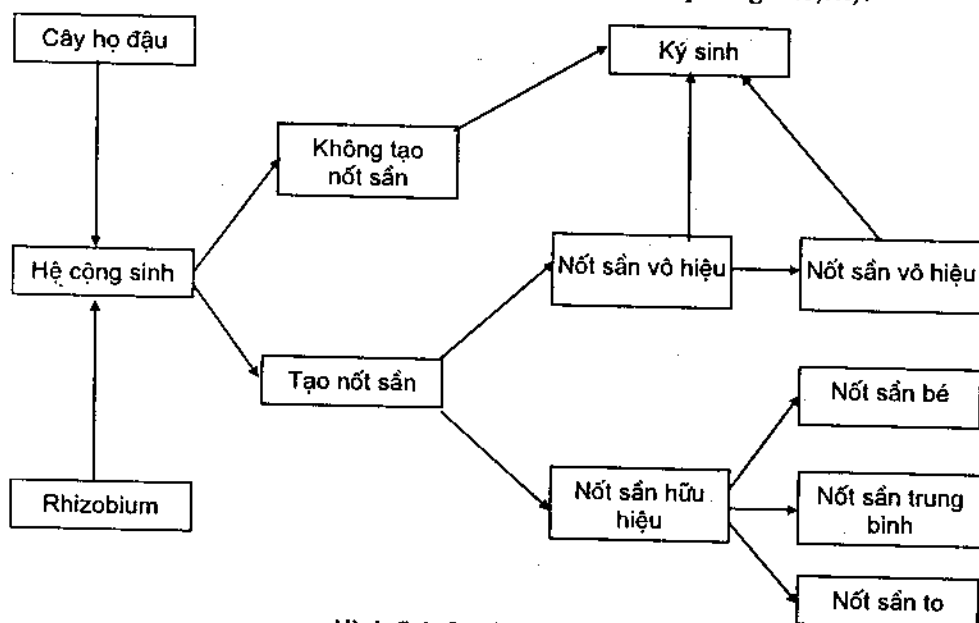
1.2.2.3. Sự hình thành hệ cộng sinh ở rễ cây họ đậu

Chỉ tiêu đánh giá nốt sần trong quá trình cộng sinh là tính chất về hình thái, sinh lý, sinh hoá của nốt sần tạo nên ở rễ cây, thể hiện trong từng giai đoạn, từng mức độ cố định nitơ của hệ cộng sinh.

+ Giai đoạn đầu là giai đoạn xâm nhiễm của VKNS vào rễ cây họ đậu:

Vi khuẩn nốt sần thường xâm nhập vào rễ cây họ đậu thông qua các

lông hút và đôi khi thông qua vết thương ở vỏ rễ. Mỗi loại cây họ đậu thường tiết ra xung quanh rễ những chất có tác dụng kích thích những chủng vi khuẩn nốt sần chuyên tính và ức chế những chủng không chuyên tính để thực hiện quá trình xâm nhiễm như các hợp chất gluxit, các axit amin, các axit hữu cơ (axit malic, axit asparaginic,...).



Hình 5.4. Sự hình thành nốt sần

Nhiều tác giả cho rằng, VKNS có tính chuyên tính rất cao đối với cây họ đậu cùng chi. Một số lại cho rằng, chúng có tính chuyên tính thấp đối với cây họ đậu cùng chi.

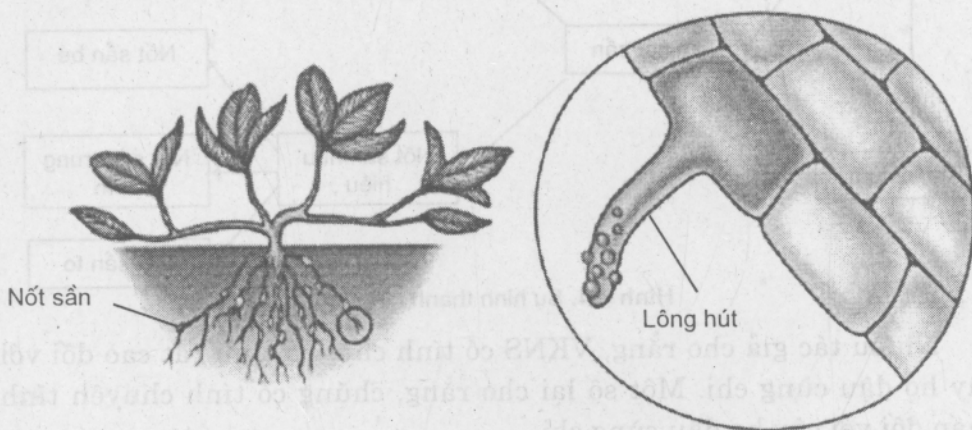
Theo quan điểm thứ nhất người ta làm thí nghiệm thấy chủng DX_1 (VKNS cây đậu xanh) nhiễm cho cây lạc không tạo được nốt sần ở lạc, còn theo quan điểm thứ hai thì chủng G3 (VKNS đậu tương) nhiễm cho cây lạc tạo được nốt sần.

Dưới ảnh hưởng của vi khuẩn nốt sần, cây họ đậu tiết ra enzym polygalacturonaza làm phá vỡ thành lông hút và giúp cho vi khuẩn nốt sần xâm nhập vào rễ. Ở trong lông hút, vi khuẩn nốt sần sẽ tạo thành "dây xâm nhập", đó là một khối chất nhầy dạng sợi, bên trong chứa đầy vi khuẩn dạng hình que, "dây xâm nhập" di dần vào bên trong với tốc độ khoảng $5 - 8 \mu\text{m/s}$. Sự vận động của "dây xâm nhập" được thực hiện dưới áp lực sinh ra do sự phát triển của VKNS bên trong dây. Đến lớp nhu mô, vi khuẩn nốt sần kích thích các tế bào rễ

cây phát triển và phân chia vi khuẩn thoát ra khỏi “dây xâm nhập” và đi vào tế bào chất. Ở đó chúng sinh sản rất nhanh và tạo dạng giả khuẩn.

Cường độ cố định nitơ của từng loại cây trồng khác nhau thì khác nhau, vì vậy cho số lượng nốt sần khác nhau. Thậm chí còn phụ thuộc vào từng giai đoạn sinh trưởng của cây: Cây đậu xanh có nốt sần sớm hơn ở các cây họ đậu đỗ khác (10 – 15 ngày có nốt sần). Cây đậu tương sau 20 – 25 ngày có nốt sần, còn ở cây lạc có nốt sần sau 25 – 30 ngày sau khi cây mọc.

Số lượng nốt sần tổng số và nốt sần hữu hiệu ở cây đậu đỗ đạt cực đại vào thời kỳ cây ra hoa, hình thành quả non và giảm dần đến cuối vụ thu hoạch.



Hình 5.5. Cơ chế xâm nhập của *Rhizobium* vào rễ cây

1.2.3. Các loại vi sinh vật cố định nitơ khác

Ngoài những giống vi sinh vật cố định nitơ phân tử trên còn vô số các loài khác: Có các vi sinh vật cố định nitơ phân tử tạo nốt sần ở thân cây như cây điền thanh (*Sespania nostota*), ở trên kẽ lá hoặc trên lá.

1.2.3.1. Vi khuẩn

– Hảo khí: *Azotomonas insolita*, *Azotomonas fluorescens*, *Pseudomonas azotogenis*, *Azospirillum*.

– Hảo khí không bắt buộc: *Klebsiella pneumoniae*, *Aerobacter acrogenes*, *Bacillus polmyxa*.

– Ky khí quang hợp: *Rhodospirillum rubrum*, *Chromatium sp*, *Chlorobium sp*, *Rhodomicrobium sp*,....

– Ky khí không quang hợp: *Desulfovibrio desulfuricans*, *Methanobacterium sp*.

1.2.3.2. Xạ khuẩn: Một số loài *Streptomyces* (hay *Actinomyces*).

1.2.3.3. Nấm: *Thodotorula*.

1.2.3.4. Tảo:

– Đơn bào: *Glococapsa sp*.

– Hình sợi: Không có dị bào (heterocystous), *Lyngbyaps*, *Oscillatoria sp*, *Plectonema sp*, *Boryanum*, *Plectonema sp*.

– Hình sợi: Có dị tế bào: *Anabaena ambigua*, *A. azollae*, *A. cycadae*, *A. cylindrica*, *A. fertilissima*, *Calothrix brevissima*, *Cal. elenkii*, *Cal. paricalina*, *Cylindrospermum*, *Cyl. gorakhporensis*, *Cyl. lioheniforme*, *Nostoccaloicola*, *N. commune*, *N. cycadae*, *N. entophyllum*, *N. muscorum*, *N. paludosum*, *N. punctiforme*, *N. sphaerium*, *Scytonema arcangelii*, *Scyt. hotmanii*, *Scyt. dendroideum*, *Tolypothrix tenuis*.

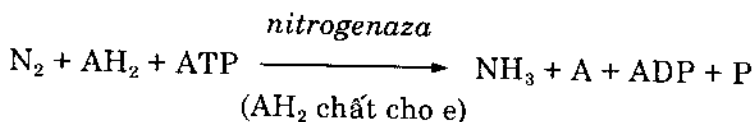
1.2.4. Cơ chế của quá trình cố định nitơ phân tử

– Trong suốt thời gian dài, cơ chế của quá trình cố định nitơ vẫn là một bí mật đầy hấp dẫn của tự nhiên. Trong khi con người phải sử dụng những điều kiện kỹ thuật rất cao và tốn kém (400 – 500°C, 200 – 1000atm) để phá vỡ mối liên kết ba của phân tử nitơ.

– Phân tử N_2 (có năng lượng là $9,4 \times 10^5 \text{ J/mol}$) thì các vi sinh vật cố định nitơ lại có thể đồng hoá ngay trong các điều kiện rất bình thường về áp suất và nhiệt độ.

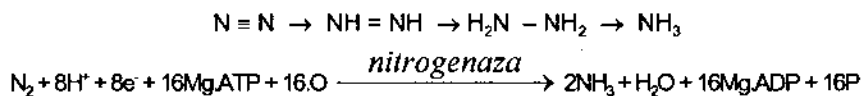
+ Những thành tựu nghiên cứu trong những năm gần đây đã cho thấy rõ được một phần cơ chế của quá trình cố định nitơ nhờ enzym.

Có thể nói, quá trình cố định nitơ là một quá trình khử N_2 thành NH_3 và enzym nitrogenaza đã xúc tác cho quá trình khử này khi có mặt ATP.



Bằng phương pháp sắc ký khí trên máy ICC “120” BIP (Pháp) với cột sắc ký Poropak, ta nhận được và xác định được cường độ cố định nitơ phân tử theo hoạt tính nitrogenaza.

+ Sau một thời gian dài, các nhà khoa học dần hoàn thiện cơ chế cố định nitơ phân tử. Theo cơ chế hoàn thiện mới nhất (1992) thì quá trình cố định nitơ được thể hiện bằng phương trình sau đây:



Cơ chế của quá trình cố định nitơ này khá phức tạp và được làm sáng tỏ nhờ các công trình nghiên cứu công bố trong nhiều năm gần đây (Hardy, Bun, 1968; Mortenson, 1966, 1968; Hardetal, 1970; Bulen, Le Comte, 1966; Bergersen, 1969; Gvozdz et al, 1971; Silop, 1971,...).

* Nitrogenaza được tinh chế từ *Az.vinelandii* vào năm 1966 (Bulen, Lecomte, 1966). Về sau này được xác minh là gồm hai phần khác nhau: enzym I (có khối lượng phân tử bằng 40.000 – 60.000 và có chứa hai nguyên tử không hemin) (Burns, 1970).

* Electron của các chất khử (feredoxin, ditionit) đi vào trung tâm có chứa Fe của thành phần II (protein – Fe) và tiếp tục chuyển cho thành phần enzym (protein – Fe – Mo).

Electron đã hoạt hoá sẽ đi theo mạch nguyên tử Fe để đến Mo, ở bên trong “hạt”, I Mo sẽ bị khử, nhờ đó nó có khả năng phản ứng nhanh chóng với N_2 .

* Phân tử N_2 đi qua khe có kích thước khoảng 4 – 5Å⁰, tức là tương đương với chiều dài của phân tử N_2 vào bên trong men và được hoạt hoá ở đây.

* Kết quả của quá trình nitrogenaza hoạt hoá và hấp thụ hoá học nitơ sẽ làm đứt hai dây nối trong số dây nối cực phân tử N_2 . Năng lượng tiêu phí là $7,8 \times 10^5 \text{J/mol}$. Dây nối thứ 3 sẽ bị cắt đứt khi tiếp xúc với hydro đã được hoạt hoá nhờ các men dihydrogenaza và hệ thống hydrogenaza.

* Sau đó NH_3 hoặc sản phẩm khử được sinh ra sẽ liên kết với các ketoaxit để tạo thành axit amin. Trong hoạt động cố định nitơ của thể cộng sinh giữa vi khuẩn nốt sần và cây họ đậu có sự tham gia của cả vi khuẩn lẫn cây họ đậu. Leghemoglobin đóng vai trò chuỗi chuyển electron giữa cây họ đậu và VKNS.

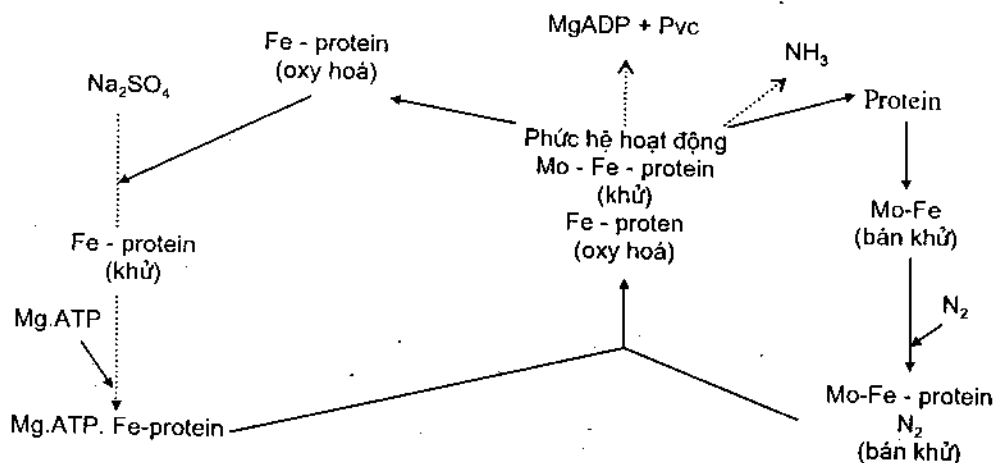
Tóm lại nhờ có hoạt tính cố định nitrogennaza, N_2 chuyển thành NH_3 .

Nitrogenaza được cấu tạo bởi hai phần:

1) Fe – protein có khối lượng phân tử khoảng 6.10^4 .

2) Mo – Fe – protein có khối lượng phân tử khoảng $2,2.10^5$.

Trong Mo – Fe – protein chứa 2 nguyên tử Mo, có 32 nguyên tử Fe và 25 – 30 nguyên tử S không bền với axit. Quá trình vận chuyển điện tử trong hoạt động và tái tạo của nitrogenaza có thể trình bày bằng sơ đồ sau:



Hình 5.6. Sơ đồ cơ chế quá trình cố định N

– Hoạt động của nitrogenaza còn phụ thuộc và liên quan chặt chẽ với men nitrat reductaza (men đồng hoá N trong đất). Nếu men nitrat reductaza hoạt động mạnh nó sẽ kìm hãm men nitrogenaza (men đồng hoá nitơ không khí) và ngược lại.

Nắm được quy luật này, người ta thường dùng các biện pháp canh tác để cân bằng hai loại men, khi đó sẽ cho năng suất và chất lượng cây trồng cao nhất.

1.2.5. Điều kiện ngoại cảnh ảnh hưởng đến quá trình cố định nitơ phân tử

Cường độ cố định nitơ phân tử phụ thuộc vào rất nhiều yếu tố ngoại cảnh:

– Ngoài các đặc tính sinh học của VKNS, thì những yếu tố ảnh hưởng rất lớn đến cường độ cố định nitơ phân tử đó là khí hậu, thời tiết, cụ thể là nhiệt độ, ánh sáng, độ ẩm và các nguyên tố dinh dưỡng trong môi trường sống, độ thoáng khí,...

Người ta đã tổng kết rằng, cường độ cố định nitơ phân tử ở các

vùng nhiệt đới và á nhiệt đới xảy ra mạnh hơn ở vùng ôn đới và hàn đới. Về ánh sáng, chỉ cần vừa đủ có tác dụng tốt cho sự hình thành nốt sần và quá trình cố định nitơ (Swarai K., Adrelva I.N, 1984).

– Điện thế oxy hoá khử trong đất ảnh hưởng rất lớn đến cường độ cố định nitơ phân tử. Thường là điện thế oxy hoá khử trong môi trường từ 10 – 30V, còn lớn hơn 30 vôn chúng ảnh hưởng xấu đến hoạt động sống của VKNS.

– Tùy từng loại vi khuẩn cố định nitơ khác nhau mà thích ứng với môi trường pH của đất khác nhau. Nhìn chung pH thích hợp cho hoạt động của vi sinh vật cố định nitơ phân tử: pH = 6,5 – 7,5.

Kết quả nghiên cứu về ảnh hưởng của pH môi trường đến cường độ cố định nitơ phân tử như sau:

pH = 3, số lượng nốt sần = 0 nốt/cây.

pH = 4, số lượng nốt sần = 3,5 nốt/cây.

pH = 5, số lượng nốt sần = 17 nốt/cây.

pH = 6, số lượng nốt sần = 35 nốt/cây.

pH = 7, số lượng nốt sần = 42 nốt/cây.

pH = 8, số lượng nốt sần = 155 nốt/cây.

pH = 9, số lượng nốt sần = 4,5 nốt/cây.

– Số lượng vi khuẩn cố định nitơ phân tử chuyên tính trong đất có ảnh hưởng trực tiếp đến hiệu lực của quá trình cố định nitơ phân tử. Người ta đã tổng kết được rằng, để có thể xâm nhiễm vào rễ cây họ đậu được tốt, số lượng VKNS chuyên tính trong đất ít nhất phải đạt được 10^4 tế bào/1g đất khô.

– Ngoài ra cường độ cố định nitơ phân tử còn phụ thuộc vào điều kiện canh tác. Ở đâu có phương thức canh tác hợp lý làm cho đất tơi xốp, thoáng khí, chế độ tưới tiêu phù hợp, bón phân hợp lý thì ở đó cường độ cố định nitơ phân tử cao và ngược lại.

1.2.6. Ứng dụng chế phẩm sinh học

– Vai trò của quá trình cố định nitơ phân tử có ý nghĩa rất lớn đối với nông nghiệp. Người ta tính được rằng, để sản xuất ra 1 tấn phân đạm, cần phải chi hết 200 đôla Mỹ, không những vậy mà còn gây nhiều độc hại cho môi trường. Trong khi đó để sản xuất ra 1 tấn phân đạm sinh học chỉ mất có 50 đôla Mỹ, rất dễ dàng, thuận lợi, lại không gây độc hại môi sinh.

– Người ta cũng đã chứng minh được rằng, sử dụng phân đạm sinh học cho cây trồng được lâu hơn, bền hơn, không gây độc hại đến nông sản phẩm.

Nhìn chung phân đạm sinh học có ưu thế nhiều hơn đạm hoá học. Đạm sinh học là nguồn phân bón chắc chắn thay thế đạm hoá học hiện nay và cho đến mai sau và là xu hướng của thời đại khoa học công nghệ cao. Vấn đề này không phải gần đây các nhà khoa học mới biết đến. Từ thế kỷ XIX, đã có nhiều nước sản xuất phân sinh học (phân đạm sinh học đã được sản xuất ở Anh, Mỹ từ 1895; ở Tiệp Khắc – 1895, ở Nga – 1904, ở Canada – 1905, ở Áo – 1914,...). Cho tới nay có tới gần 100 nước đã sản xuất và ứng dụng các chế phẩm sinh học bón cho cây trồng. Ở nhiều nước, việc bón phân đạm sinh học cho cây trồng là việc làm thiết thực, đương nhiên của mỗi người nông dân.

Ở Việt Nam, quá trình cố định nitơ phân tử được nghiên cứu vào những năm đầu của thập kỷ 60 thế kỷ XX, nhưng mãi đến năm 1980, vấn đề này mới được chính thức đưa vào đề tài cấp Nhà nước với chủ đề “Sinh học phục vụ nông nghiệp”, nay là “Công nghệ sinh học” và mãi đến tháng 3 năm 1995, Nhà nước mới chính thức công nhận và đưa ra được quy định về chất lượng phân bón vi sinh vật cho cây trồng (Quyết định số 161/QĐ-TĐC của Bộ Khoa học, Công nghệ và Môi trường).

– Về thuật ngữ, định nghĩa phân sinh học như sau: Phân bón vi sinh vật là loại sản phẩm chứa một hoặc nhiều chủng loại vi sinh vật sống có ích đã được tuyển chọn, mà những hoạt động của chúng tạo nên trong đất trồng các loại chất dinh dưỡng hay các chất hữu cơ có hoạt tính kích thích sinh trưởng, tạo điều kiện nâng cao năng suất hoặc chất lượng nông sản, tăng độ màu mỡ của đất; các chủng vi sinh vật này không gây ảnh hưởng xấu đến người, vật nuôi, môi trường sinh thái và chất lượng nông sản.

– Tên gọi phân cố định nitơ phân tử rất khác nhau, tùy từng nước và tùy từng cơ sở địa phương gọi tên sao cho thuận tiện.

Ở Liên Xô gọi là Nitragin, Azotobacterin, Phosphobacterin,... Ở Mỹ có tên là Nitrogen, Nitrobacterio (Anh), N Germ hoặc Vacxinogen (Pháp), Campen (Hà Lan), Nodrit (Bỉ), Biolav (Tân Tây Lan), Nitropit (Áo).

Ở Việt Nam, năm 1980, trường Đại học Cần Thơ đã chế loại phân

đạm sinh học này bón cho cây lạc có tên là Vidana; cùng năm, Trường Đại học Nông nghiệp I, Trường Đại học Tổng hợp Hà Nội đã chế phân đạm sinh học bón cây đậu đỗ và gọi là Nitragin. Năm 1992, Viện Khoa học Nông nghiệp miền Nam gọi tên loại phân này là Rhidafo, bón cho cây lạc. Hiện nay theo thống nhất của Ban Điều hành về chất lượng phân bón vi sinh vật quyết định gọi loại phân đạm sinh học này là: Phân đạm vi sinh.

– Để đánh giá hiệu quả của quá trình cố định nitơ phân tử, Viện sĩ Protocob Ivanovic (Liên Xô) đã tổng kết, cứ 3 năm trồng cây Medicago (cây phân xanh) đã làm giàu cho đất 400 – 600kg N/ha, để lại 12 – 15 tấn mùn/ha.

Theo Giáo sư Himotova (Tiệp Khắc) thì bón phân vi khuẩn nốt sần (Nitragin) cho cây đậu tương có tác dụng làm tăng năng suất hạt 30 – 45% so với không bón.

Theo Giáo sư Musustin (Liên Xô) thì bón phân vi sinh vật có tác dụng làm tăng năng suất cây trồng từ 20 – 25%, làm giảm tỷ lệ sâu, bệnh xuống 14 – 45% so với bón phân hoá học.

Theo Giáo sư Ngô Thế Dân thì cây đậu đỗ có thể đồng hoá nitơ không khí từ 60 đến 342kg N/ha/năm phụ thuộc vào tùy từng loại cây và vùng sinh thái.

Theo Giáo sư Võ Minh Kha, Nguyễn Đường, Nguyễn Xuân Thành (Trường Đại học Nông nghiệp I), bón phân đạm sinh học cho cây trồng có tác dụng thúc đẩy nhanh cường độ cố định nitơ của cây trồng, làm tăng năng suất cây trồng 10 – 25%, làm tăng độ phì của đất, làm giảm tỷ lệ sâu, bệnh thậm chí > 50%.

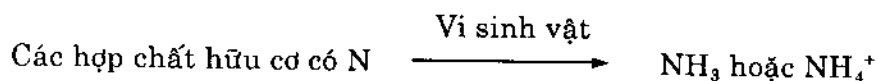
Bón phân Azorin, Azotobacterin cho cây khoai tây làm tăng năng suất 12,4 tạ/ha, cho cây ngô làm tăng 22,4 tạ/ha, cho cà chua tăng 28 tạ/ha, cho cây rau bắp cải tăng 75 tạ/ha so với không bón.

Phân bón vi sinh vật cố định nitơ hội sinh và tự do có tác dụng tốt đến sinh trưởng, phát triển, năng suất cây trồng và hiệu quả trồng trọt. Tại Ấn Độ, sử dụng phân vi sinh vật cố định nitơ cho lúa, cao lương và bông làm tăng năng suất trung bình 11,4%, 18,2% và 6,8% tương ứng mang lại lợi nhuận 1015 rupi, 1149 rupi và 343 rupi/ha. Tại Liên bang Nga, bón chế phẩm VSVCĐN cho tăng năng suất khoai tây 12,8 tạ/ha; tăng năng suất cà chua 28,0 tạ/ha; tăng năng suất ngô hạt 22,4 tạ/ha; tăng năng suất cây bắp cải 75,2 tạ /ha.

Ở Việt Nam, các thử nghiệm sử dụng phân vi sinh vật cố định nitơ hội sinh (Azogin) ở 15 tỉnh miền Bắc, miền Trung và miền Nam trên diện tích hàng chục ngàn hecta cho thấy: trong cùng điều kiện sản xuất, ruộng lúa được bón phân VSVCDN đều tốt hơn đối chứng, biểu hiện ở bộ lá phát triển tốt hơn, tỷ lệ nhánh hữu hiệu, số bông/khóm, nhiều hơn đối chứng. Năng suất hạt tăng so với đối chứng 6 – 12%, nhiều nơi đạt 15 – 20%. Những ruộng bón VSVCDN giảm bớt 1kg đạm ure cho mỗi sào, năng suất vẫn tăng so với đối chứng. Đối với rau (xà lách, rau diếp, khoai tây,...), bón phân VSVCDN cũng làm tăng sản lượng thu hoạch 20 – 30%. Việc bón phân VSVCDN còn làm tăng khả năng chống chịu của cây và giảm lượng nitrat tồn dư trong rau. Hiệu quả kinh tế do sử dụng phân VSVCDN là rõ rệt. Nếu đầu tư 1 đồng cho việc sử dụng phân vi sinh, lãi suất thu về từ 16,2 đến 19,1 đồng cho cây lúa.

1.3. QUÁ TRÌNH AMÔN HOÁ

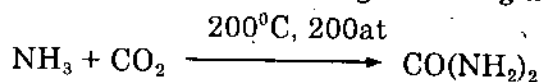
Là quá trình phân huỷ và chuyển hoá các hợp chất hữu cơ có chứa N dưới tác dụng của các loài vi sinh vật thành NH_4^+ (NH_3) cung cấp dinh dưỡng cho cây trồng.



1.3.1. Quá trình amôn hoá ure

1.3.1.1. Khái niệm

Ure là một loại hợp chất hữu cơ đơn giản chứa 46,6% N, được sản xuất trong các nhà máy phân bón bằng cách tổng hợp:



Lượng hữu cơ được vùi vào đất rất lớn, hàm lượng dinh dưỡng các chất này nằm trong đất khá nhiều nhưng cây trồng không thể hấp thụ được trực tiếp từ các chất hữu cơ đó, mà phải thông qua quá trình phân huỷ và chuyển hoá của các loài vi sinh vật để thành các chất dinh dưỡng dễ tiêu cây trồng mới hấp thụ được. Nếu không có quá trình amôn hoá thì dù có giàu hữu cơ đến đâu cũng đều vô hiệu với cây trồng và càng gây độc hại cho môi sinh.

Đơn giản nhất đó là lượng ure chứa trong nước tiểu. Người ta đã

1.3.2. Quá trình amôn hoá protein

1.3.2.1. Khái niệm chung

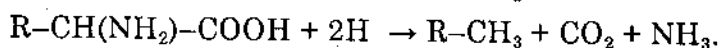
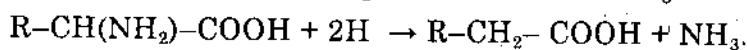
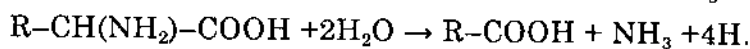
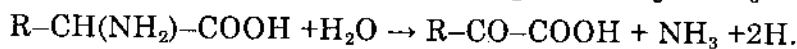
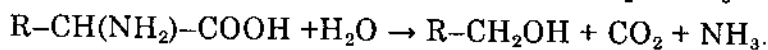
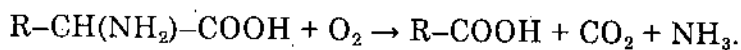
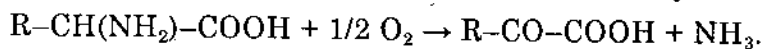
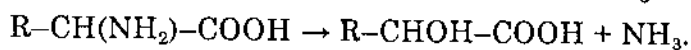
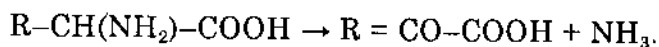
Protein là thành phần cơ bản của chất nguyên sinh, hàng năm protein được đưa vào đất với số lượng rất lớn (cùng với xác hữu cơ, phân chuồng, phân xanh, phân rác). Trong protein chứa khoảng 15 – 17% nitơ.

Quá trình phân huỷ và chuyển hoá các hợp chất hữu cơ (protein) để tạo ra NH_3 cung cấp dinh dưỡng cho cây trồng dưới tác dụng của các loài vi sinh vật được gọi là quá trình amôn hoá protein.

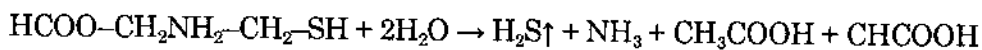
1.3.2.2. Cơ chế của quá trình

Dưới tác dụng của proteaza, các protein được phân giải thành các hợp chất đơn giản hơn (polypeptit, oligopeptit). Các chất này tiếp tục được phân giải thành axit amin nhờ tác dụng của men peptidaza ngoại bào. Các chất này cũng có thể trực tiếp hấp thụ vào tế bào vi sinh vật, sau đó tiếp tục chuyển hoá thành axit amin. Các axit amin này sẽ được sử dụng một phần vào quá trình sinh tổng hợp protein của vi sinh vật, một phần được tiếp tục phân giải để tạo thành NH_3 , CO_2 và nhiều sản phẩm trung gian khác.

Quá trình khử amin sẽ xảy ra theo một trong những phản ứng sau:



Khi phân giải các axit amin chứa S (như metionin, xistin, xistein) vi sinh vật giải phóng ra H_2S và nếu tích lũy nhiều trong đất sẽ làm thối rữa cây trồng.



Khi phân giải tryptophan, một số vi sinh vật có thể sinh ra chất có mùi thối là indon và scatôn.

Một số amin sinh ra trong quá trình khử cacboxyl của các axit amin có thể độc với người và gia súc, đáng chú ý là histamin, acmatin, putrexin, cadavein.

1.3.2.3. Vi sinh vật

– Vi khuẩn gồm: *Bacillus mycoides*, *B.mesentericus*, *B.subtilis*, *Protéus vulgaris*, *Chromobacterium prodigiosum*, *Pseudomonas fluorescens*, *Escherichia coli*, *Clostridium sporogenes*.

– Xạ khuẩn gồm: *Streptomyces griseus*, *S.rimesus*.

– Nấm gồm: *Aspergillus oryzae*, *A.flavus*, *A.terricola*, *A.niger*, *Penicillium camomberli*, *Mucor*.

Các vi sinh vật này đều có thể sản sinh vào môi trường men proteaza, proteinaza, peptidaza, chúng xúc tác quá trình thuỷ phân liên kết peptit và một số liên kết khác.

1.3.3. Quá trình amôn hoá kitin

1.3.3.1. Khái niệm chung

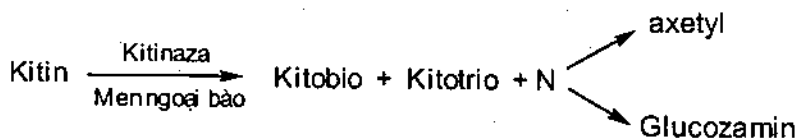
Kitin hợp chất cao phân tử bền vững. Cấu trúc của kitin gần với cấu trúc của xenlulo, nhưng trong phân tử các gốc gluco, người ta thấy gốc hydroxin ở nguyên tử C thứ hai được thay thế bằng những gốc amin đã được axetin hoá.

Kitin có mặt trong thành tế bào của nhiều loại nấm (nhất là *Acomycetes* và *Basidiomycetes*), trong vỏ của nhiều loại côn trùng.

Hàng năm có tới hàng triệu tấn kitin của giáp xác hình thành trong các đại dương. Kitin cũng có số lượng không nhỏ trong đất.

Với khối lượng lớn như vậy, nhờ có các loài vi sinh vật, kitin được phân giải và chuyển hoá để thành các chất hữu cơ đơn giản, sau đó lại tiếp tục phân giải để cho ra các dinh dưỡng cung cấp cho cây trồng.

1.3.3.2. Cơ chế phân giải kitin



1.3.3.3. Những vi sinh vật phân giải kitin

Có rất nhiều loài vi sinh vật phân giải kitin như:

- Vi khuẩn gồm: *Achromobacter*, *Flavobacterium*, *Bacillus*, *Cytophaga*, *Pseudomonas*, *Nocardia*, *Micromonospora*.
- Nấm gồm: *Aspergillus*, *Mortierella*.
- Xạ khuẩn: *Streptomyces griseus*.

1.3.4. Quá trình phân giải chất mùn

1.3.4.1. Khái niệm về mùn

– Mùn là một chỉ tiêu quan trọng để đánh giá độ phì của đất. Là chất vô định hình, màu tối, khi bị vi sinh vật phân giải nó cho các chất hữu cơ như lipid, sáp, glucit, protein,...

Cứ 1ha đất canh tác ở tầng 0 – 20cm có khoảng 30 – 300 tấn mùn, tương ứng với mùn chứa khoảng 1,5 – 15 tấn nitơ. Loại đất hữu cơ có tới 20% mùn, loại đất bạc màu, đất đồi feralit chỉ có 0,3 – 0,5% mùn. Đất ở vùng thung lũng, rừng núi thường chứa hàm lượng mùn cao hơn ở vùng đồng bằng, trung du.

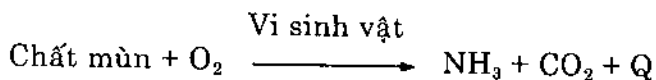
Song hàm lượng mùn nhiều hay ít mà không được các loài vi sinh vật phân giải, chuyển hoá thì không có ý nghĩa đến dinh dưỡng của cây trồng.

1.3.4.2. Thành phần mùn

Theo D.Z. Nikitin (1960) thì trong chất mùn tự nhiên của đất Secnozém (đất xám) có chứa các thành phần sau:

Hydratcacbon:	1,3%
Hemixenlulo:	3,0%
Xenlulo:	0,4%
Lignhin:	4,2%
Axit humic:	29,6%
Axit funvic:	22,0%
Humin:	36,5%

1.3.4.3. Cơ chế phân giải mùn



1.3.4.4. Các loài sinh vật đất phân giải mùn

Phân giải chất mùn có rất nhiều các loài sinh vật đất tham gia, kể cả hảo khí và yếm khí: vi khuẩn, xạ khuẩn nấm mốc; nguyên sinh động vật (các loại trùng); động vật đất (giun đất, mối đất, kiến đất, ve, bét, bọ hung, chuột đất,...).

1.4. QUÁ TRÌNH NITRAT HOÁ

1.4.1. Khái niệm chung

– Quá trình chuyển hoá từ NH_3 (NH_4^+) dưới tác dụng của các loài vi sinh vật thành NO_3^- được gọi là quá trình nitrat hoá.

Trước đây, người ta quan niệm rằng, quá trình nitrat hoá là quá trình có lợi cho nông nghiệp, vì cây trồng hấp thụ nitơ ở dạng NO_3^- nhanh hơn ở dạng NH_4 . Mặt khác, quá trình chuyển hoá này làm tăng axit cho môi trường, vì vậy làm tăng quá trình khoáng hoá một số muối khó tan như phospho, kali, canxi, magiê.

Ngày nay có quan niệm ngược lại: quá trình nitrat hoá là quá trình có hại cho nông nghiệp, vì qua nhiều thí nghiệm cho thấy cây trồng hấp thụ nitơ ở dạng NH_3 (NH_4^+) không thua kém NO_3^- . Quá trình chuyển hoá từ $\text{NH}_4^+ \rightarrow \text{NO}_3^-$ làm tiền đề cho quá trình mất đạm trong đất qua các con đường thấm sâu, rửa trôi, đặc biệt là phản nitrat hoá. Dinh dưỡng nitơ ở dạng NH_4^+ được giữ trong keo đất bền hơn ở dạng NO_3^- .

Quá trình chuyển hoá này làm cho đất chua đi, nó ảnh hưởng rất xấu cho quá trình sinh trưởng và phát triển của cây trồng và ảnh hưởng xấu đến hoạt động sống của khu hệ vi sinh vật đất.

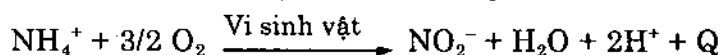
1.4.2. Cơ chế chuyển hoá và các loài vi sinh vật tham gia vào quá trình

Giữa thế kỷ XIX, Paxtơ đã chứng minh được cơ chế của quá trình nitrat hoá là do các loài vi khuẩn chuyển hoá.

Năm 1891, nhà bác học Nga – Vinogradski khẳng định quá trình nitrat hoá xảy ra qua hai giai đoạn: giai đoạn nitrit hóa và giai đoạn nitrat hoá.

1.4.2.1. Quá trình nitrit hoá

– Là quá trình chuyển hoá từ NH_4^+ + $\xrightarrow{\text{Vi sinh vật}}$ NO_2^-

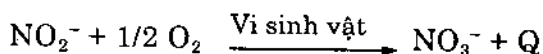
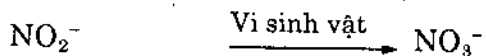


– Tham gia vào giai đoạn này có 4 giống chủ yếu:

Nitrosomonas; *Nitrosolobus*; *Nitrocystis*; *Nitrospira*.

Loài vi khuẩn nitrit hoá có hình bầu dục, hình cầu, hình que hơi xoắn. Tế bào có kích thước $0,6 - 1,0 \times 0,9 - 2,5\mu\text{m}$, có tiên mao, có khả năng di động được, đa số Gram âm, không sinh nha bào. Phát triển tốt ở pH = 7,0 – 7,5, ở nhiệt độ 28 – 30°C, độ ẩm của đất 40 – 70%, tùy từng chủng khuẩn.

1.4.2.2. Quá trình nitrat hoá



Tham gia vào giai đoạn này gồm có 3 giống vi sinh vật: *Nitrobacter*, *Nitrospira*, *Nitrococcus*. Là những vi khuẩn hình cầu, hình trứng, có tiên mao, di động được, Gram âm, không sinh nha bào. Tế bào có kích thước $0,3 - 0,4 \times 2,1 - 6,5\mu\text{m}$. Thích ứng ở môi trường pH trung tính hơi kiềm, nhưng vẫn có thể phát triển tốt ở môi trường chua.

Ngoài các giống vi khuẩn cơ bản chuyển hoá trên còn có các loài vi sinh vật khác: Nhóm vi sinh vật dị dưỡng: *Alcaligenes*, *Anthrobacter*, *Corynebacterium*, *Achromobacter*, *Pseudomonas*, *Nocardia*, *Streptomyces*.

1.4.2.3. Các biện pháp để hạn chế quá trình nitrat hoá

Ngoài các biện pháp canh tác như tưới tiêu chủ động tránh các điều kiện ngập nước, yếm khí, tránh khô hạn, áp dụng các công thức luân canh hợp lý ra, hiện nay người ta dùng các biện pháp hoá học như: các dạng phân đạm bọc lưu huỳnh; dùng thuốc ức chế nitrificid bón vào đất để ức chế hoạt động của các loài vi sinh vật tham gia vào quá trình nitrat này.

Ở Mỹ, Nhật Bản, Đức đã dùng thuốc N secer – (2-clor-6 piridin)

Ở Liên Xô đã dùng thuốc AM (2 amino – 4 clo – 6 metyl piridin)

Với những loại thuốc ức chế này cũng mới chỉ hạn chế được 5 – 10% của quá trình chuyển hoá trên.

Nhìn chung hiện nay vấn đề trên còn đang ở thời kỳ thử nghiệm, hy vọng tương lai sẽ có các biện pháp và các loại thuốc ức chế tốt hơn.

1.5. QUÁ TRÌNH PHẢN NITRAT HOÁ

1.5.1. Khái niệm chung

Quá trình chuyển hoá từ NO_3^- thành N_2 để bù trả lại nitơ cho không khí được gọi là quá trình phản nitrat hoá, hay quá trình phản nitrat hoá.

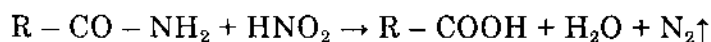
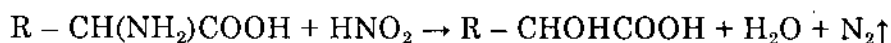
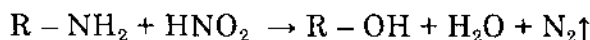
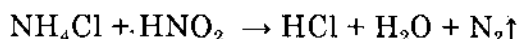
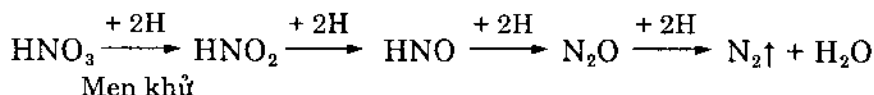
Người ta đã ước tính rằng cây trồng chỉ có khả năng hấp thụ được khoảng 50% lượng phân đạm bón vào đất, còn 50% số còn lại bị mất đi theo ba con đường sau:

- Thẩm sâu.
- Rửa trôi.
- Phản nitrat hoá.

Trong ba con đường mất đạm trên thì quá trình phản nitrat hoá chiếm tới 90% tổng lượng đạm mất.

1.5.2. Cơ chế của quá trình phản nitrat hoá

Dưới tác dụng của các loài vi sinh vật:



1.5.3. Các loài vi sinh vật tham gia vào quá trình phản nitrat hoá

Những vi khuẩn phản nitrat hoá điển hình là: *Pseudomonas denitrificans*, *Ps. aeruginosa*, *Ps. stutzeri*, *Ps. fluorescens*, *Micrococcus denitrificans*, *Bacillus licheniformis*,...

Một số loại vi khuẩn tự dưỡng hoá năng cũng có khả năng thực hiện quá trình này như *Thiobacillus denitrificans*, *Hydrogenomonas agilis*.

1.5.4. Các biện pháp hạn chế quá trình phản nitrat hoá

Ở những chân ruộng đất chặt (thành phần cơ giới đất nặng) quá trình gây hoá mạnh, đất rất chua và chua, đất khô hạn thì càng tạo điều kiện thuận lợi cho quá trình phản nitrat hoá.

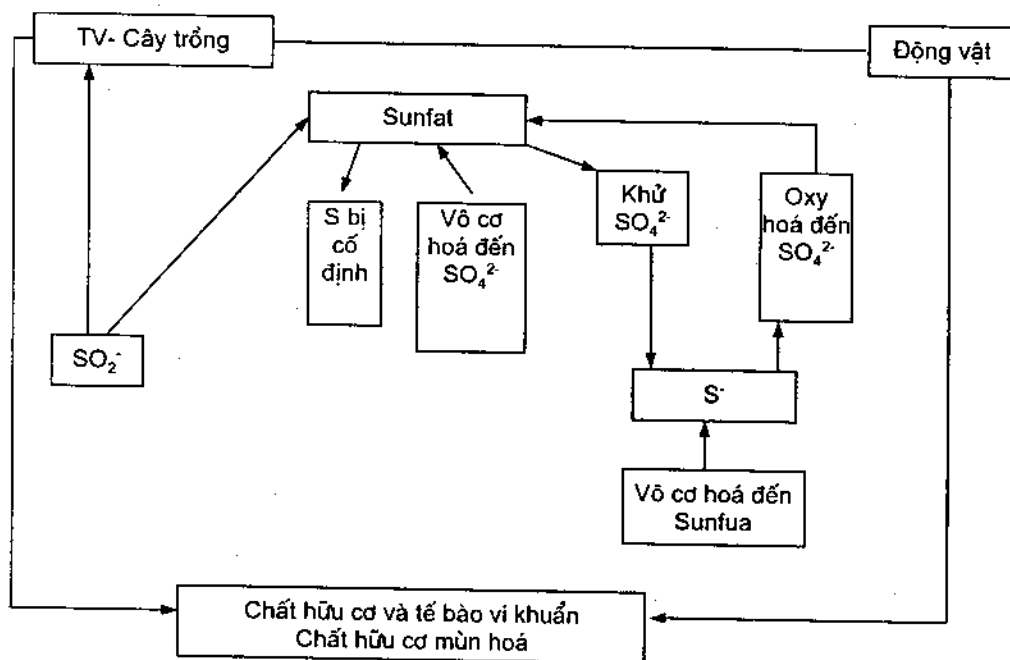
Tất cả các loại vi sinh vật tham gia vào quá trình phản nitrat hoá này đều là loài vi sinh vật yếm khí tùy tiện. Chúng phân bố rộng rãi trong tự nhiên và được liệt vào các loài vi sinh vật có tác dụng xấu đối với nông nghiệp.

Trên cơ sở đó chúng ta phải đưa ra các biện pháp canh tác sao cho hợp lý để hạn chế quá trình phản nitrat hoá. Ngoài các biện pháp phòng trừ như đã được nêu (mục 1.4. Quá trình nitrat hoá) người ta thường làm cỏ, sục bùn, tiêu úng cho các vùng bị úng lụt, tưới nước cho các vùng bị hạn, bón phân đạm vào lúc trời ít nắng cho lúa.

II- TÁC DỤNG CỦA SINH VẬT ĐẤT TRONG QUÁ TRÌNH CHUYỂN HOÁ CÁC NGUYÊN TỐ KHÁC TRONG ĐẤT

2.1. TÁC DỤNG CỦA SINH VẬT ĐẤT TRONG QUÁ TRÌNH CHUYỂN HOÁ LƯU HUỖNH

2.1.1. Chu trình tuần hoàn lưu huỳnh



Hình 5.7. Vòng tuần hoàn lưu huỳnh trong tự nhiên

Vòng tuần hoàn S và N có nhiều điểm giống nhau:

– Trong đất N và S ở dạng hữu cơ là chủ yếu cho nên cây trồng không đồng hoá được. Muốn đồng hoá phải được vô cơ hoá.

– Quá trình SO_4^{2-} hoá gần giống quá trình NO_3^- .

+ Quá trình sunfua hoá (hay còn gọi là quá trình vô cơ hoá S hữu cơ) rất giống quá trình amôn hoá.

+ Quá trình khử SO_4^{2-} rất giống quá trình phản nitrat hoá.

2.1.2. Các dạng lưu huỳnh trong đất

2.1.2.1. Vô cơ hoá lưu huỳnh hữu cơ (có 3 dạng)

a) Axit amin có S.

b) Sunfat hữu cơ (sunfat cholin) và este sunfuric của hydratcacbon và lipit.

c) S hữu cơ gắn chặt trong các phần axit humic và phần khoáng.

2.1.2.2. Vô cơ hoá lưu huỳnh vô cơ (có 2 dạng)

a) **Muối Sunfat:** $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; Na_2SO_4 ; H_2SO_4 ; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

b) **Muối Sunfit:** FeS_2 ; Na_2S ; ZnS ; H_2S .

2.1.3. Quá trình vô cơ hoá lưu huỳnh hữu cơ và cơ chế phân giải

2.1.3.1. Những giai đoạn phân giải các chất hữu cơ có lưu huỳnh

Những giai đoạn phân giải các chất hữu cơ có lưu huỳnh khá phức tạp, cho đến nay chưa được nghiên cứu thật rõ ràng, trừ một vài hợp chất như cystin, methionin.

Những sản phẩm của quá trình phân giải có thể là SO_4^{2-} , có thể là sunfua hoặc là những chất dễ bốc hơi như methymercaptan (Federick và cộng tác viên, 1957). Bản chất của những sản phẩm cuối cùng phụ thuộc vào thành phần cấu tạo ban đầu và những điều kiện ngoại cảnh.

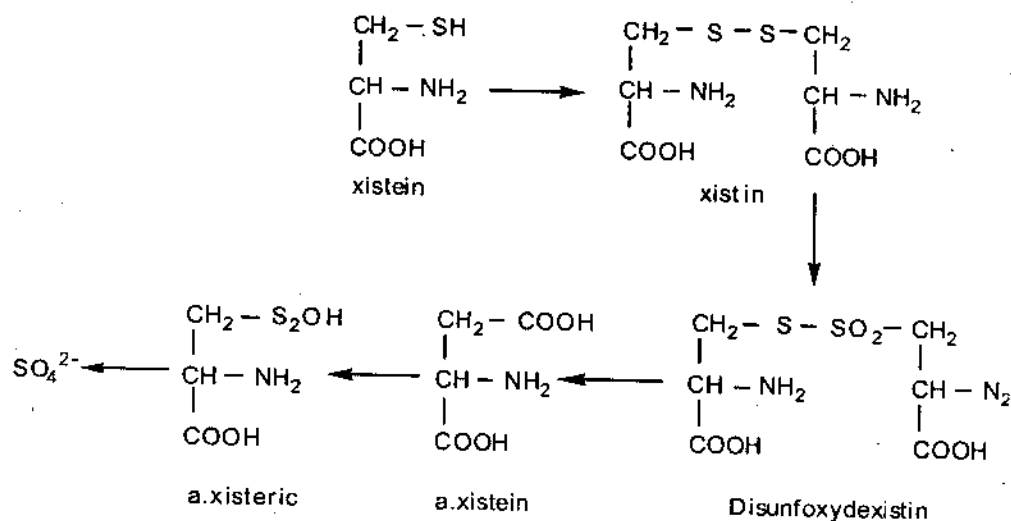
Nếu sản phẩm là những sunfua, người ta gọi đây là quá trình sunfua hoá. Quá trình sunfua hoá có thể tiến hành trong điều kiện hiếu khí hoặc yếm khí. Trong điều kiện yếm khí người ta dễ nhầm với quá trình phản SO_4^{2-} hoá vì quá trình phản SO_4^{2-} hoá cũng phải là những *desunfovibrio*.

2.1.3.2. Vi sinh vật

Rất nhiều vi sinh vật dị dưỡng hiếu khí và yếm khí tham gia quá trình phân giải lưu huỳnh hữu cơ:

- Vi khuẩn có các giống: *Proteus*, *Serratia*, *Pseudomonas*, *Clostridium*.
- Nấm có các giống: *Aspergillus*, *Microsporum* (Simon, Sylvestre, 1969).

2.1.3.3. Cơ chế phân giải lưu huỳnh hữu cơ



Hình 5.8. Những giai đoạn có thể có của quá trình phân giải cysteine (Freny và Stevenson, 1996)

2.1.3.4. Điều kiện ngoại cảnh ảnh hưởng đến quá trình phân giải lưu huỳnh hữu cơ

a) Độ ẩm

Thích hợp ở khoảng gần độ ẩm ở đồng ruộng (William, 1967). Ở đất ngập nước, lưu huỳnh hữu cơ không những cho ta những sunfua mà còn cho ta mercaptan- chất độc cho cây trồng, nhất là đối với lúa (Takai và Asami, 1962).

Khi đất khô, người ta thấy có sự tăng về SO_4^{2-} nếu chất bị phân giải là các sunfat hữu cơ (Barrow, 1961).

b) Nhiệt độ

Dưới 10°C , quá trình khoáng hoá đến SO_4^{2-} không đáng kể. Quá trình này tăng dần và mạnh nhất ở nhiệt độ 35°C (William, 1967).

Sự sản sinh mercaptan trong điều kiện yếm khí tiến hành ở nhiệt độ 30°C và càng cao ở $> 37^\circ\text{C}$ (Takai và Asami, 1962).

c) Tỷ số C/S

Sự khoáng hoá S trong chất hữu cơ vùi vào đất phụ thuộc tỷ lệ C/S của nó. Tỷ lệ này chỉ giới hạn dưới, từ đấy có sự tích lũy lưu huỳnh vô cơ trong đất. Tỷ lệ bản thân thường thay đổi từ 100 – 300. Điều này tùy thuộc bản chất hợp chất cacbon nghiên cứu.

Đối với phân chuồng và rơm rạ ủ, tỷ lệ C/S là 112 (Massouni và Corfield, 1965).

2.1.4. Quá trình oxy hoá hợp chất lưu huỳnh vô cơ

2.1.4.1 Vi sinh vật phân huỷ lưu huỳnh vô cơ

a) Trong tự nhiên, một số nhóm vi sinh vật có thể oxy hoá hợp chất lưu huỳnh vô cơ. Thường có 4 nhóm vi sinh vật:

- Vi sinh vật hoá năng dinh dưỡng – giống *Thiobacillus*.
- Vi sinh vật hoá năng hữu cơ dinh dưỡng (dị dưỡng).
- Vi sinh vật hoá năng dinh dưỡng thuộc họ *Beggiatoaceae*.
- Vi sinh vật hoá năng dinh dưỡng: *Chlorobacteriaceae* và *Thiorhodaceae*.

Trong đất, hai nhóm trên có tác dụng chủ yếu. Hai nhóm sau thường ở nước.

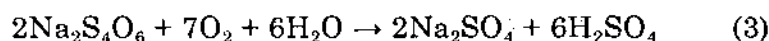
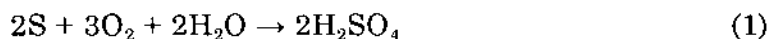
b) Đặc tính sinh học và quá trình chuyển hoá của vi sinh vật

– *Thiobacteriaceae*:

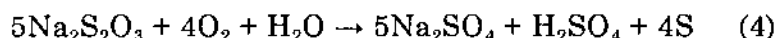
Giống *Thiobacillus* hình que (0,5 x 1,3µm), Gram âm, không có nha bào, di động nhờ lông (tiên mai) ở đầu, không có hạt S trong cơ thể.

Giống *Thiobacillus* gồm nhiều loại trong đó có 5 loại được nghiên cứu kỹ lưỡng: *Thiobacillus thioparus*, *T. denitrificans*, *T. thiooxidans*, *T. ferrooxidans*, *T. novellus*.

+ *T. thioparus*: Thường gặp trong đất chua trung tính, không hoạt động ở pH nhỏ hơn 5,0; hiếu khí. Nó có thể oxy hoá S, thiosunfat ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$), tetrathionat ($\text{Na}_2\text{S}_4\text{O}_6$), S thành SO_4^{2-} :



T. thioparus cũng có thể oxy hoá $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ thành S:



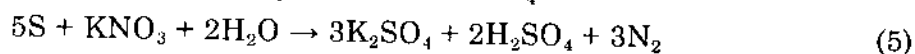
T.thioparus cũng có thể khử $\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^-$ và không chuyển NO_2^- thành N_2 như *T.denitrificans*.

BẢNG 5.1. VI SINH VẬT OXY HOÁ S

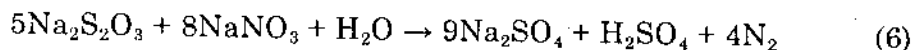
	Họ hoặc nhóm	Giống chủ yếu	Yêu cầu oxy	Đất
Tự dưỡng quang năng	Chlorobacteriacees (Vi khuẩn sunfua màu lục)	<i>Chlorobium</i>	Yếm khí	Đất (ứ) ngập nước
	Thiorhodacees Vi khuẩn sunfua màu tía	<i>Chromatium</i> <i>Thiocystis</i> <i>Lamprocysus</i> <i>Thiospirillum</i>	Yếm khí	Đất (ứ) ngập nước
Hoá năng dinh dưỡng	Beggiatoacees	<i>Beggiatoa</i> <i>Thioplaca</i> <i>Thiothris</i> <i>Thiopirillopsis</i>	Hảo khí	Đất (ứ) ngập nước
	Thiobacteriacees	<i>Thiobacillus</i>	Hảo khí (trừ <i>T.denitrificans</i> , yếm khí tùy tiện)	Đất (thoát nước) và ứ nước
Dị dưỡng	Các giống như	<i>Pseudomonas</i> <i>Micrococcus</i>	Hảo khí và bán hảo khí	Đất (thoát nước) và ứ nước

+ *Thiobacillus denitrificans*:

Gần giống *T.thioparus*, ưa trung tính, yếm khí tùy tiện, có thể khử NO_3^- thành N_2 , oxy hoá S thành SO_4^{2-} .



hay là:



+ *T.novellus*:

Vi khuẩn hình que, kích thước $0,5 \times (1,0 - 0,3)\mu\text{m}$, có tiên mao, có thể di động được, tự dưỡng hoá năng. Năng lượng cần thiết cho quá trình sống lấy từ quá trình oxy hoá S vô cơ, ưa trung tính. Có thể oxy hoá thiosunfat tetrathionat theo phương trình (2) (3). Nó không oxy hoá S thành SO_4^{2-} .

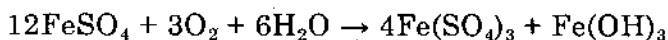
+ *T.thiooxidans*:

Có thể sống trong điều kiện chua, có thể chịu được pH từ 2,0 – 3,0.

Nó có thể sống ở nồng độ H_2SO_4 bằng 0,1M, nồng độ mà các vi khuẩn khác đều bị tiêu diệt. Nó không thể sống ở pH gần trung tính. Nó oxy hoá nhanh chóng S, các sunfua, thiosunfat, tetrathionat (theo các phương trình (1), (2), (3) đã nêu ở trên).

+ *T.ferrooxidans*:

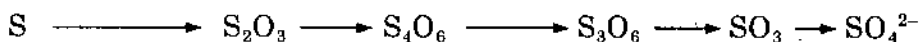
Thích môi trường chua. Nó oxy hoá S thiosunfat theo phương trình (1), (2). pH tối thích gần 3,0. Nó có thể oxy hoá Fe^{2+} và từ quá trình oxy hoá lấy năng lượng cho quá trình sống của mình.



Khi có cả S và Fe ở dạng khử, ví dụ Chalcopyrit (CuFeS_2) thì *T.ferrooxidans* có thể đồng thời oxy hoá S và Fe một cách độc lập (Ducan và cộng tác viên, 1967).

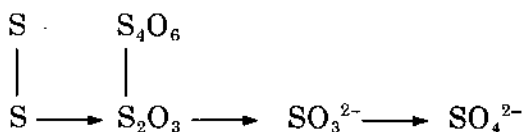
Trừ *T.novellus*, tất cả các *Thiobacillus* có thể dùng CO_2 làm nguồn cacbon, những muối amôn làm nguồn N. *T.denitrificans* sống yếm khí. Trong điều kiện yếm khí nếu có NO_3^- nó có thể sử dụng NO_3^- . NO_3^- dùng làm chất nhận electron trong quá trình oxy hoá. Nó không sử dụng được NO_2^- . Lúc bấy giờ để sinh trưởng, phát triển bình thường phải cung cấp muối NH_4^+ cho nó.

Các vi khuẩn thuộc giống *Thiobacillus* có thể oxy hoá theo sơ đồ sau:



Lưu huỳnh Thiosunfat Tetrathionat Trithionat Sunfit Sunfat

Một số tác giả khác cho rằng chất trung gian chủ yếu là thiosunfat.



– Vi sinh vật dị dưỡng:

Nhiều vi sinh vật dị dưỡng như: vi khuẩn hảo khí, Actinomycetes, nấm và nấm men có thể oxy hoá S. Có 2 quá trình chủ yếu.

+ Những vi khuẩn oxy hoá S và thiosunfat thành polythionat.

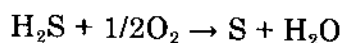
+ Những vi khuẩn oxy hoá polythiosunfat thành SO_4^{2-} .

Ngoài ra nhiều nấm có thể oxy hoá cystin, methionin và thiure thành SO_4^{2-} .

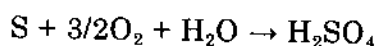
Nhìn chung quá trình oxy hoá của vi sinh vật dị dưỡng chậm hơn quá trình oxy hoá của *Thiobacillus*. Vai trò của chúng trong quá trình oxy hoá ít quan trọng hơn vi sinh vật tự dưỡng.

– Vi sinh vật thuộc họ *Beggiatoaceae*:

Giống *Beggiatoa*: Đây là giống điển hình cho họ này, nó có ở khắp nơi, nhất là những nơi có H_2S . *Beggiatoa* lấy năng lượng từ quá trình oxy hoá H_2S . H_2S đầu tiên được oxy hoá thành S. S được tích lũy thành hạt trong tế bào.



Khi nào nguồn H_2S cạn kiệt thì vi khuẩn oxy hoá S tích lũy trong tế bào thành H_2SO_4 .



– Vi khuẩn sunfua tự dưỡng quang năng:

Gồm 2 loại: *Chlorobacteriaceae* và *Thiorhodaceae*.

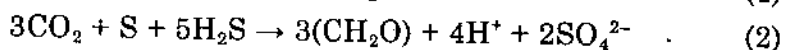
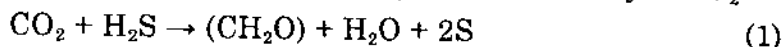
+ Những đặc tính cần chú ý của loại vi khuẩn trên là:

* Yếm khí.

* Có ánh sáng mặt trời.

* Có H_2S .

Những vi khuẩn này sử dụng H_2S làm chất cho electron để cho quá trình tổng hợp chất hữu cơ của cơ thể và nguồn cacbon ở đây là CO_2 .



Quá trình tổng hợp chất hữu cơ từ phương trình (1) và (2) rất giống quá trình tổng hợp chất hữu cơ của cây xanh.



Vi sinh vật sunfua quang hợp không chỉ tham gia vào quá trình tuần hoàn S mà còn có thể tham gia vào quá trình tuần hoàn nitơ, vì chúng có khả năng cố định nitơ.

+ *Chlorobacteriaceae*: Hình que hoặc cầu có màu xanh nhạt. Giống *Chlorobium* thuộc loại này.

+ *Thiorhodaceae*: Có thể là hình cầu lớn, xoắn và hình nấm men. Nói chung chúng lớn hơn các vi khuẩn. Trong tế bào đầy hạt S, có màu đỏ. Những giống chính là *Choromatum*, *Thiocystin*, *Lamprocystis*, *Thiospirillum*.

2.1.4.2. Điều kiện ngoại cảnh ảnh hưởng quá trình oxy hoá S

Đất bão hoà nước làm giảm quá trình oxy hoá sinh học S.

a) Nhiệt độ

Quá trình oxy hoá S trong đất rất mẫn cảm với nhiệt độ. Từ 4°C, quá trình oxy hoá sinh học S đã được biểu hiện và quá trình này mạnh nhất ở 23°C (Fox và cộng tác viên – Trích của Attob và Olson, 1966).

b) Độ pH

Ở trung tính nói chung hoạt động tốt. Bón vôi để tăng pH từ 5,2 lên đến 6,4 – 7,5, tăng cường quá trình oxy hoá S từ 10% đến 20% so với đối chứng không bón vôi (Ludwick, trích của Attob và Olson, 1966).

2.1.4.3. Tác dụng của quá trình oxy hoá S

– *Thiobacillus* có thể oxy hoá S chuyển thành SO_4^{2-} . Môi trường trở nên chua. Do đó có thể trung hoà một phần những đất kiềm, tăng cường cấu trúc của đất.

– H_2SO_4 được hình thành trong quá trình oxy hoá S sẽ làm tăng độ hoà tan của muối $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ khó tan, cung cấp phosphat monocanxi cho cây (cây đồng hoá PO_4^{3-} – Liman và cộng tác viên, 1916).

– Quá trình oxy hoá S làm tăng độ chua đất, từ đó một số nguyên tố khó tan thành dễ tan, ví dụ Mn: Mn^{4+} hoá trị 4 chuyển thành Mn^{2+} , cây trồng có thể đồng hoá được (Quastel và cộng tác viên 1948).

2.1.4.4. Quá trình khử các hợp chất lưu huỳnh vô cơ (phản SO_4^{2-} hoá)

Một số vi sinh vật yếm khí có khả năng khử SO_4^{2-} . Chúng được gọi là vi sinh vật phản SO_4^{2-} . Quá trình khử SO_4^{2-} đến H_2S không phải chỉ do vi sinh vật phản SO_4^{2-} hoá mà còn do các loại vi sinh vật khác.

2.1.5. Quá trình phản SO_4^{2-}

2.1.5.1. Chủng giống vi sinh vật

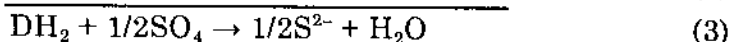
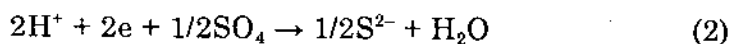
– Giống *Desulfovibrio*: Vi khuẩn không có nha bào, hình dấu phẩy, có tiên mao ở đỉnh, ưa ẩm.

– Giống *Desulfovibrio* gồm 5 loại: *Desulfovibrio desulfuricans*, *D.vulgaris*, *D.salexigens*, *D.gigas*, *D.africans*.

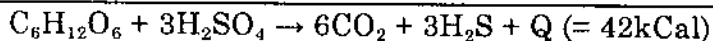
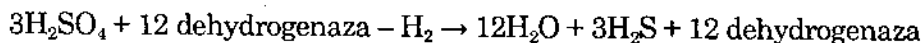
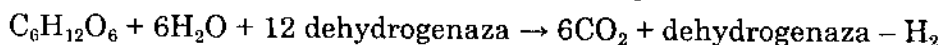
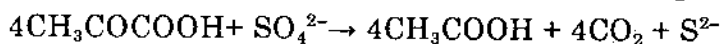
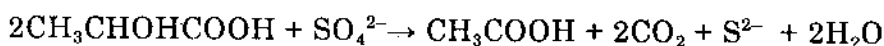
– Giống *Desulfotomaculum* gồm 3 loại: *Desulfotomaculum nigrificans*, *Dm.orientis*, *Dm.ruminis* (Postgate, 1965, Starkey, 1966).

Tất cả đều ưa trung tính. Tuy nhiên nó có thể hoạt động từ pH = 5,5 – 9,0. Có thể sống ở nồng độ 2,5g H₂S/lít.

Vi khuẩn khử SO₄²⁻ đều là yếm khí. Khử SO₄²⁻ thành H₂S. Quá trình khử SO₄²⁻ có thể tiến hành như sau: sử dụng chất hữu cơ làm chất cho electron.

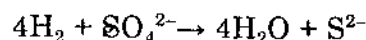


Nếu trong môi trường có một số chất hữu cơ được vi khuẩn sử dụng để làm nguồn cho electron như axit lactic, axit pyruvic, C₆H₁₂O₆ thì quá trình phản SO₄²⁻ có thể như sau:



Quá trình khử SO₄²⁻ cũng có thể dùng H₂.

Trong những sinh cảnh mà chất hữu cơ ít, một số vi sinh vật phản SO₄²⁻ có thể dùng H₂ như là nguồn năng lượng và electron. Phản ứng có thể:

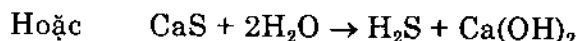
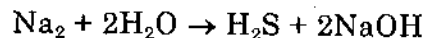


2.1.5.2. Vi sinh vật khử các hợp chất S mức độ oxy hoá kém hơn SO₄²⁻

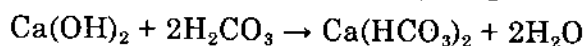
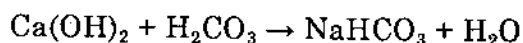
Những hợp chất S có mức độ oxy hoá SO₄²⁻ (sunfit, polythionat, thiosunfat, S) bị khử dễ dàng hơn SO₄²⁻. Quá trình khử này không chỉ riêng vi khuẩn phản SO₄²⁻ tiến hành mà còn các loại vi sinh vật khác cũng có thể thực hiện được: vi khuẩn, xạ khuẩn, nấm (Starkey, 1966).

2.1.5.3. Tác dụng của quá trình phản SO₄²⁻ hoá

a) Làm đất kiềm hoá



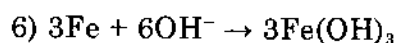
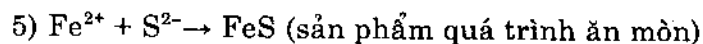
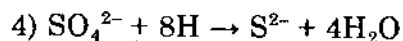
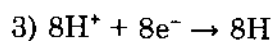
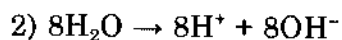
Do hoạt động của vi sinh vật và do quá trình hô hấp của cây trồng, môi trường có H₂CO₃. Trong trường hợp H₂CO₃ tác dụng với NaOH hoặc Ca(OH)₂ sẽ cho ta bicacbonat và cacbonat.



b) Tích lũy H_2S làm độc cho cây trồng

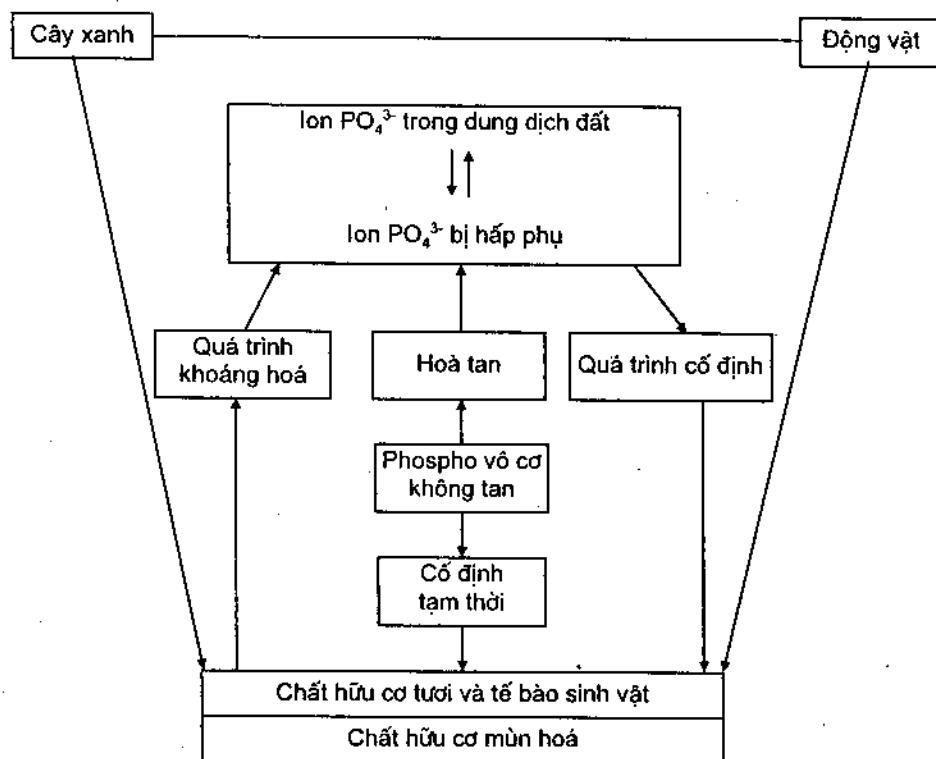
c) Gặm mòn kim loại

Quá trình gặm mòn có thể theo các phản ứng sau:



2.2. QUÁ TRÌNH CHUYỂN HOÁ PHOSPHO

2.2.1. Vòng tuần hoàn của phospho



Hình 5.9. Vòng tuần hoàn phospho trong tự nhiên

Lân là một trong những yếu tố quan trọng đối với cây trồng. Lân dễ tiêu trong đất thường không đáp ứng yêu cầu của cây, nhất là đối với cây trồng có năng suất cao. Bón phân lân và tăng cường độ hoà tan các dạng lân khó tiêu là biện pháp quan trọng trong sản xuất nông nghiệp. Bón phân hữu cơ, vùi xác động, thực vật vào đất ở mức độ nhất định là biện pháp tăng hàm lượng lân cho đất.

2.2.2. Các dạng lân trong đất

2.2.2.1. Lân hữu cơ

Lân hữu cơ có trong cơ thể động, thực vật, vi sinh vật thường gặp trong các hợp chất chủ yếu như phytin, phospholipit, axit nucleic. Trong không bào người ta còn thấy lân vô cơ ở dạng oethophosphat làm nhiệm vụ chất đệm và chất dự trữ. Trong cơ thể, S và N thường ở dạng khử ($-NH_2$, $-SH$). Cây trồng, vi sinh vật không thể đồng hoá trực tiếp lân hữu cơ. Muốn đồng hoá, chúng phải được chuyển hoá thành dạng muối của H_3PO_4 .

2.2.2.2. Lân vô cơ

Lân vô cơ thường ở trong các dạng khoáng như apatit, phosphoric, phosphat sắt, phospho nhôm,... Các dạng lân trên thường là những loại khó tan, cây trồng không thể đồng hoá được. Muốn cây trồng sử dụng được phải qua chế biến, biến chúng thành dạng dễ tan.

Cũng như các yếu tố khác, P luôn luôn tuần hoàn, chuyển hoá. Nhờ vi sinh vật, lân hữu cơ được vô cơ hoá biến thành muối của axit phosphoric. Các dạng lân này một phần được sử dụng, biến thành lân hữu cơ, một phần bị cố định dưới các dạng khó tan như $Ca_3(PO_4)_2$, $Fe(PO_4)$, $Al(PO_4)$. Những dạng khó tan này trong các môi trường có pH thích hợp sẽ được chuyển hoá và biến thành dạng dễ tan. Vi sinh vật giữ vai trò quan trọng trong quá trình này.

2.2.3. Sự phân giải hợp chất lân vô cơ

2.2.3.1. Thí nghiệm

– Từ năm 1900 đã có nhiều nhà khoa học nghiên cứu vấn đề này. J.Stoklaa dùng đất đã tiệt trùng có bón bột apatit và cấy vi khuẩn. Ông dùng *Bacillus megatherium*, *B.mycoides*, *Bacillus butyricus*. Sau khi cấy vi khuẩn và bón cho yến mạch thấy có tăng năng suất.

– Năm 1949, Gerresen. A cấy một số loại cây như Avena, Sinapis, Helianthus trong cát.

Các chất dinh dưỡng khác đều ở dạng hoà tan. Còn P thì ở dạng không tan như phosphat bicanxi hay $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$.

Thí nghiệm theo 2 công thức

1) Tiệt trùng các chậu, sau đó gieo hạt lại với 1% đất không tiệt trùng.

2) Tiệt trùng các chậu và không gieo lại hạt.

Ở công thức (1), sự đồng hoá P mạnh và cây phát triển tốt hơn. Điều đó chứng tỏ rằng ở đây có tác động của vi sinh vật trong quá trình phân giải các hợp chất lân khó tan.

– Nhiều vi khuẩn như *Pseudomonas fluorescens*, vi khuẩn nitrat hoá, một số vi khuẩn hệ rễ, nấm, xạ khuẩn cũng có khả năng phân giải $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ và bột apatit.

– Ngoài ra trong các quá trình lên men butyric, lên men lactic, quá trình lên men dấm, trong phân chuồng cũng có thể xúc tiến quá trình hoà tan $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ và bột apatit. Vi khuẩn vùng rễ phân giải $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ mạnh.

Ở hệ rễ lúa mì thường có 30% vi khuẩn có khả năng phân giải $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ và lượng lân phân giải so với đối chứng tăng 6 – 18 lần.

2.2.3.2. Vi sinh vật

Vi sinh vật phân giải những hợp chất phosphat khó tan thuộc nhiều nhóm, nhiều loại khác nhau, có thể chiếm khoảng 10 – 15% hệ vi sinh vật đất (Sperrer, 1958; Swary và Sperrer, 1985, Katznelson và cộng tác viên, 1962).

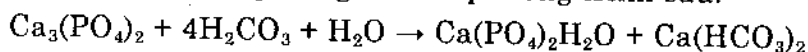
– Vi khuẩn phân giải những hợp chất lân vô cơ khó tan thường gặp gồm các giống: *Pseudomonas* (*Ps.denitrificans*), *Alcaligenes* (*A.faecalis*), *Achromobacter* (*A.delicatulus*), *Agrobacterium* (*A.radiobacter*), *Aerobacter* (*A.aerogenes*), *Escherichia* (*E.freundi*), *Brevibacterium*, *Micrococcus*, *Flavobacterium* (*F.aurantiacus*), *Chlorobacterium* (*Chl.denitrificans*), *Mycobacterium* (*M.cyanum*), *Sarcina* (*S.flava*), *Bacillus megaterium* var. *phosphaticum* và một số *Pseudomonas* có thể hoà tan lân hữu cơ khó tan làm tăng năng suất cây trồng. Người ta đã dùng chúng làm phân vi khuẩn P.

– Bên cạnh các vi khuẩn, xạ khuẩn cũng như những nấm như *Penicillium*, *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Sclerotium* cũng có tác dụng trong quá trình hoà tan hợp chất lân khó tan (Gerretsen, 1949; Sprrer, 1985; Myskow, 1961; Katznelson và cộng tác viên, 1962).

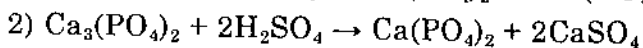
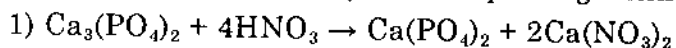
2.2.3.3. Cơ chế hoà tan phospho

– Đại đa số nghiên cứu đều cho rằng, sự phân giải $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ có liên quan mật thiết với sự sản sinh axit trong quá trình sống của vi sinh vật. Trong đó axit cacbonic rất quan trọng. Chính H_2CO_3 đã làm cho $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ phân giải.

Quá trình có thể phân giải theo phương trình sau:



– Trong đất, vi khuẩn nitrat hoá và vi khuẩn chuyển hoá S cũng có tác dụng quan trọng trong việc phân giải $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$. Trong quá trình sống, các vi khuẩn này tích lũy trong đất HNO_3 , H_2SO_4 . Quá trình hoà tan có thể biểu thị theo các phương trình sau:



– Quá trình hoà tan các hợp chất lân khó tan có thể theo cơ chế: lân khó tan tạm thời được đồng hoá bởi vi sinh vật, sau đó lân được giải phóng khỏi vi sinh vật dưới dạng có thể đồng hoá cho cây trồng.

2.2.3.4. Điều kiện ngoại cảnh

– *Độ pH*: Nhìn chung pH ảnh hưởng không nhiều đến vi sinh vật phân giải lân (Tardieux–Roche 1966). Tuy nhiên, pH 7,8 – 7,9 ảnh hưởng tốt đến sự phát triển của hệ vi sinh vật phân giải P.

– *Nước*: Ở những nơi ngập nước, hàm lượng chất hữu cơ cao (do hoạt động của VSV), làm tăng quá trình phân giải chất hữu cơ khó tan.

– *Hợp chất hữu cơ*: Theo Tardieux – Roche (1966), hàm lượng chất hữu cơ mùn hoá không ảnh hưởng đến quá trình phân giải lân. Hợp chất hữu cơ tươi làm tăng sự sinh trưởng vi sinh vật, từ đấy dẫn đến quá trình hoà tan hợp chất lân khó tan.

– *Hệ rễ*: Hệ rễ cây trồng kích thích sự phát triển của VSV. Do đó sự phân giải hợp chất lân khó tan cũng được tăng cường.

2.2.4. Sự chuyển hoá lân hữu cơ

2.2.4.1. Các dạng lân hữu cơ thường gặp trong đất

Trong đất các dạng lân hữu cơ thường gặp là: phytin, axit nucleic và nucleoprotein, phospholipit.

a) *Phytin và các chất họ hàng*

Phytin là muối Ca và Mg của axit phytic. Trong đất những chất

có họ hàng với phytin thường gặp là inositol, inositol monophosphat, inositol triphosphat. Tất cả đều có nguồn gốc thực vật. Phytin và những chất có cùng họ hàng chiếm trung bình từ 40 – 80% phospho hữu cơ trong đất (L.L.Stevenson, 1964).

b) Axit nucleic và nucleoprotein

Những axit nucleic và nucleoprotein trong đất đều có nguồn gốc thực vật hoặc động vật và nhất là vi sinh vật. Hàm lượng của chúng trong đất khoảng 0 – 10% (L.L.Stevenson, 1964).

c) **Phospholipit.** Những hợp chất do sự kết hợp giữa phân tử lipid và phosphat không nhiều trong đất.

2.2.4.2. Vi sinh vật

– Vi sinh vật phân giải hợp chất lân hữu cơ thuộc nhiều loài vi khuẩn và nấm.

Trong giống *Bacillus* có thể kể các loài sau: *B. megaterium*, *B. subtilis*, *B. malabarensis*.

B. megaterium không những có khả năng phân giải hợp chất lân vô cơ mà còn có khả năng phân giải hợp chất lân hữu cơ. Người ta còn dùng *B. megaterium* làm phân vi sinh vật.

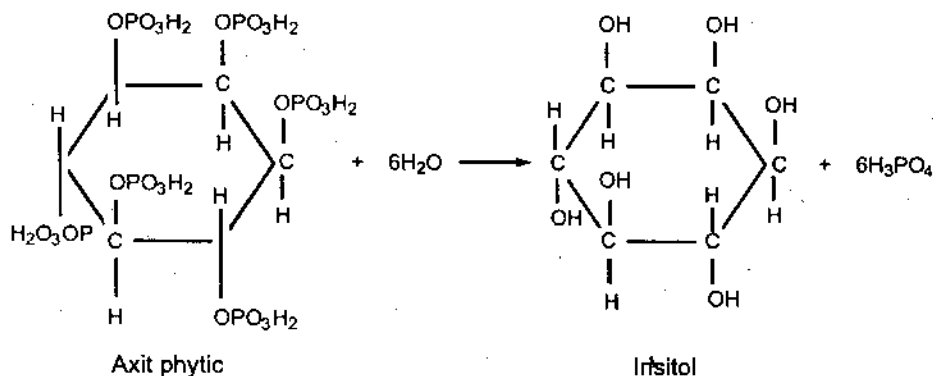
Ngoài ra còn các giống *Serratia*, *Proteus*, *Arthrobacter*.

– Về nấm chúng ta có thể kể: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Cunninghamella*.

– Về xạ khuẩn có thể kể *Streptomyces*.

2.2.4.3. Cơ chế phân giải

Nhiều vi sinh vật đất có men dephosphorylaza phân giải phytin theo phản ứng sau:

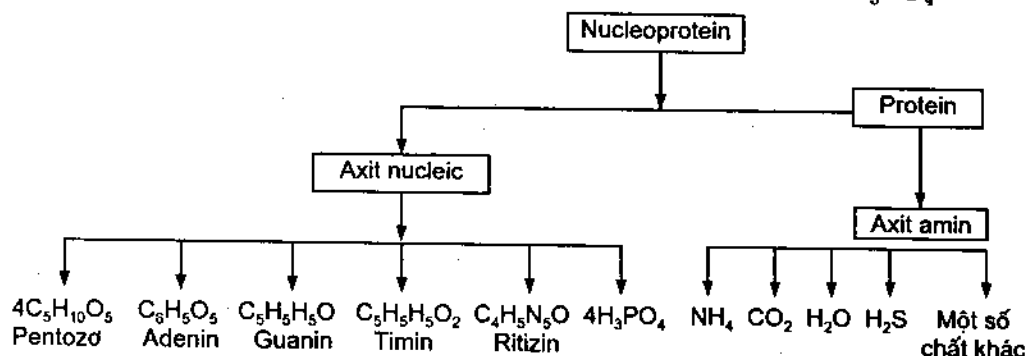


Năm 1911, J.Stoklasa đã dùng axit nucleic làm nguồn P và N duy nhất trong môi trường, cấy vi khuẩn *Bac.mycoides*, *B.subtilis*, *Proteus vulgaris*. Ông nhận thấy lượng lân được phân giải là 23,3; 37,7 và 42%. Đến năm 1949, vấn đề này mới được chú ý đến.

Năm 1952, Menkina đã phân lập từ hai loại vi khuẩn có khả năng vô cơ hoá hợp chất lân là *Bacillus megaterium* var. *phosphaticum*, *Serratia carrollera*.

Sau đó nhiều công trình nghiên cứu khác đã nhận thấy có rất nhiều loại VSV có thể tiến hành quá trình này. Quá trình có thể tổng quát theo sơ đồ sau:

Nucleoprotit $\rightarrow$ nuclein $\rightarrow$ axit nucleic $\rightarrow$ nucleotit $\rightarrow$ H_3PO_4



2.3. QUÁ TRÌNH CHUYỂN HOÁ SẮT

2.3.1. Các dạng sắt trong đất

Trong tự nhiên, sắt tồn tại dưới 3 dạng sau:

- Dạng khó tan cây trồng không đồng hoá được.
- Dạng vô cơ di động cây trồng dễ đồng hoá.
- Dạng hữu cơ trong xác của sinh vật cây trồng cũng không đồng hoá trực tiếp được.

2.3.2. Quá trình oxy hoá sắt

2.3.2.1. Vi sinh vật chuyển hoá sắt

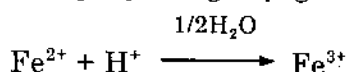
Vi sinh vật oxy hoá Fe^{2+} làm cho Fe^{2+} chuyển thành Fe^{3+} và Fe^{3+} được kết tủa dạng $Fe(OH)_3$ xung quanh tế bào, thường là kết tủa ở giáp mạc hoặc ở bao. Những vi sinh vật này phát triển tốt trong nước nghèo chất hữu cơ dễ tan, giàu O_2 và có muối Fe^{2+} hoặc muối Mn.

Những giống vi sinh vật thường gặp là: *Gallionella*, *Leptothrix*, *Sphaerotilus*, *Crenothrix*, *Thiobacillus* và *Ferrobacillus*.

Trong những vi sinh vật trên người ta có thể phân biệt:

a) Vi sinh vật hoá năng dinh dưỡng

Gallionella ferruginea, *Thiobacillus ferrooxidans*, *Ferrobacillus ferrooxidans*. Chúng lấy năng lượng theo phản ứng sau:



Năng lượng có được do phản ứng trên không là bao, những vi khuẩn oxy hoá Fe^{2+} muốn có năng lượng phải oxy hoá một lượng lớn Fe^{2+} .

Ferrobacillus ferrooxidans có thể oxy hoá Fe^{2+} ở một pH rất axit (2,0 – 6,5). *Ferrobacillus ferrooxidans* giống *Thiobacillus ferrooxidans*.

b) Vi sinh vật có khả năng dinh dưỡng không bắt buộc

Leptothrix ochracea và những vi sinh vật hoá năng dinh dưỡng không bắt buộc có thể dùng năng lượng từ oxy hoá Fe^{2+} cũng như năng lượng oxy hoá một số hợp chất hữu cơ.

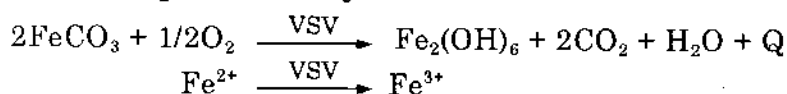
Những vi khuẩn oxy hoá Fe^{2+} thành Fe^{3+} là những vi khuẩn sống ở nước, là những vi sinh vật đáng chú ý vì chúng là nguyên nhân làm lắng đọng sắt trong những ống dẫn nước tưới ruộng (Specer và cộng tác viên, 1963).

Vi sinh vật chuyển hoá Fe^{2+} cũng có trong đất (Molezie, 1962). Ví dụ giống *Sphaerotilus* đã được phân lập trong đất podzol được tưới nước.

BẢNG 5.2. VI SINH VẬT CHUYỂN HOÁ SẮT
(Alexander, 1961)

Order (Bộ)	Họ	Đặc tính chủ yếu		Giống chủ yếu
Pseudomonadales (proparte)	Caulobacteriaceae	Gram âm, hình que, chủ yếu sống ở nước, không có hình sợi, bám vào cơ chất bởi một bộ phận phụ (nơi có tích tụ hydroxyt sắt) hay trôi nổi trên mặt nước.		<i>Caulobacter</i> <i>Gallionella</i> <i>Siderophacus</i>
	Siderocapsaceae	Vi khuẩn Gram âm, hình que, cầu hay trứng.	Capsules chứa muối sắt hay muối mangan.	<i>Siderocapsa</i> <i>Siderophaera</i> <i>Ferrobacterium</i> <i>Naumaniella</i>
			Không có giáp mạc.	<i>Ochrobium</i> <i>Sideromonas</i> <i>Sideronema</i>
Chlamydomacteriales (vi khuẩn sắt hình sợi)	Chlamydobacteriaceae	Vi sinh vật hình sợi, có bao và thường có các hạt muối sắt hoặc muối mangan giống như tảo.		<i>Lepthorix</i> <i>Sphaerotilus</i> <i>Toxothrix</i>
	Crenothrichaceae	Họ rất gần với Chlamydobacteriaceae		<i>Crenothrix</i> <i>Clonothrix</i>

2.3.2.2. Cơ chế quá trình oxy hoá sắt



2.3.3. Khử sắt (fer – ferrique) và hoà tan sắt

2.3.3.1. Sự khử sinh học gián tiếp

Đây là quá trình khử Fe^{3+} được thực hiện nhờ những hợp chất hữu cơ do vi sinh vật tổng hợp được.

Trong đất quá trình này thường không rõ.

2.3.3.2. Sự khử sinh học trực tiếp

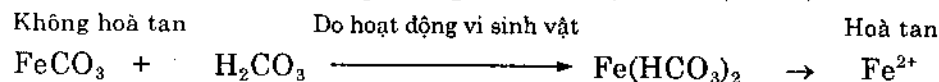
Nhiều thí nghiệm được thực hiện với dòng vi khuẩn thuần.

Trong thí nghiệm có vi khuẩn, số lượng hydroxit sắt bị khử nhiều hơn gấp 5 lần so với thí nghiệm không có vi khuẩn. Sự sinh trưởng, phát triển của vi khuẩn tỷ lệ với lượng Fe^{3+} được khử thành Fe^{2+} .

Như vậy có một sự liên quan chặt chẽ giữa sự khử Fe^{3+} và sự chuyển hoá các chất của vi sinh vật. Trong đất, quá trình khử sinh học trực tiếp thường là quá trình chủ yếu.

2.3.3.3. Hoà tan gián tiếp sắt

Những vi khuẩn nitrat hoá và sunfat hoá tích lũy trong môi trường HNO_3 , H_2SO_4 làm cho môi trường trở nên chua, giúp cho quá trình hoà tan hợp chất sắt. Hoạt động của vi sinh vật trong đất tích lũy CO_2 cũng có khả năng hoà tan sắt theo phương trình sau (Mandal, 1961):



2.4. QUÁ TRÌNH CHUYỂN HOÁ KALI TRONG ĐẤT

2.4.1. Các dạng kali trong đất

2.4.1.1. Dạng vô cơ

Trong đất dạng vô cơ của K^+ có thể kể như sau:

- Ion K^+ trong dung dịch đất.
- Ion K^+ hấp thụ trên mặt ngoài bề mặt các bản mỏng phyllosilicat, có thể trao đổi.
- Ion K^+ không trao đổi nằm trên bề mặt trong các bản mỏng phyllosilicat.

– Ion K^+ nằm trong cấu trúc một số khoáng sản như muscovit, biotit, fenspat, allit.

2.4.1.2. Dạng hữu cơ

Dạng K^+ hữu cơ thường gặp trong đất như sau:

K^+ trong các tàn dư thực vật. Một phần lớn K^+ ở dạng hoà tan trong nước (Chaminade, 1955). Gần 1/3 số còn lại có thể trở thành hoà tan dưới tác dụng khoáng hoá sinh học.

2.4.2. Sự hoà tan K trong đất

K^+ không thể đồng hoá có thể chuyển hoá theo hai quá trình sinh học sau:

- Sự biến đổi sinh học của những khoáng chứa K.
- Sự chuyển hoá giữa 2 dạng K^+ không trao đổi và K^+ trao đổi.

2.4.2.1. Sự biến đổi sinh học những khoáng chứa K

Nhiều khoáng chất trong đất có thể bị biến đổi dưới tác dụng của những sản phẩm trao đổi chất của vi sinh vật và giải phóng ra K^+ . Ví dụ: biotit, muscovit, glauconit, microlin, nephelin, leucit, orthoclase,...

a) Vi sinh vật

– Vi sinh vật có tác dụng biến đổi các chất khoáng chứa K để giải phóng K^+ , có thể kể ra như sau:

Bacillus mucilaginosus var. *siliceus* thuộc những vi khuẩn có khả năng hoà tan một số silicat (kali silicat,...).

Bacillus muciginosus là vi khuẩn ưa nước (oligonitrophile).

Một số dòng có thể cố định N_2 . Cấy vi khuẩn vào các silicat có thể hoà tan các silicat và từ đấy cây trồng có thể lấy chất dinh dưỡng cho mình (Alexsandrov, 1958; Pacewiczowa, 1962).

Theo Kulai (1962) vi khuẩn phân giải silicat có vai trò quan trọng trong dinh dưỡng K của cây trồng như thông, bouleau.

Nấm có khả năng phân giải các silicat để cho K không nhiều.

– Nấm *Aspergillus niger* có khả năng này và đã được Eno và Reuzser (1955) nghiên cứu.

b) Cơ chế phân giải

Vi sinh vật trong quá trình sống của mình sản sinh một số axit

như H_2CO_3 , HNO_3 , hay H_2SO_4 , hay axit hữu cơ. Các axit này giúp quá trình hoà tan các silicat và giải phóng K^+ cho cây trồng.

2.4.2.2. Sự chuyển hoá cân bằng giữa K^+ trao đổi và K^+ cố định

Cân bằng K^+ không trao đổi $\rightleftharpoons$ K^+ trao đổi

Có thể chuyển dịch theo hướng sang phải khi yêu cầu về K^+ trao đổi tăng lên do hoạt động của vi sinh vật (sự cố định).

K^+ đưa vào trong tế bào vi sinh vật sau này có thể được giải phóng khi những tế bào này bị phân giải và từ đây K^+ có thể cung cấp cho cây trồng.

Tóm lại:

– K^+ trong tàn dư thực vật một phần lớn tan trong nước và cây trồng có thể trực tiếp đồng hoá. Vai trò vi sinh vật ở đây là chúng tiếp tục phân giải phần chưa hoà tan còn lại của tàn dư thực vật và tiếp tục giải phóng K^+ cho cây trồng.

Ở những nơi đất cát, ít nước, nhiều khoáng chứa K, tác dụng của vi sinh vật ở chỗ có thể phân giải các silicat giải phóng K.

– Bên cạnh đó, trong những trường hợp nhất định, vi sinh vật có thể cố định K^+ trong tế bào của mình, và ở đây, trong mức độ nhất định có sự tranh chấp tạm thời về K giữa vi sinh vật và cây trồng. Khi vi sinh vật chết đi, K trong tế bào vi sinh vật được giải phóng cho cây trồng.

Như vậy ở điều kiện nào vi sinh vật cũng có tác dụng tích cực trong quá trình chuyển hoá K^+ cấp dinh dưỡng cho cây trồng.

2.5. QUÁ TRÌNH CHUYỂN HOÁ MANGAN

2.5.1. Các dạng Mn trong đất

2.5.1.1. Dạng có thể trao đổi được

Mn^{2+} hấp thụ trên các keo đất có khả năng tham gia các quá trình trao đổi như những cation khác.

2.5.1.2. Dạng không tan

Dạng không tan thường là MnO_2 , Mn_2O_3 và Mn_3O_4 .

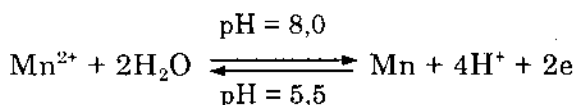
2.5.1.3. Dạng phức hợp trong cơ thể thực vật hoặc vi sinh vật

– Những hợp chất phức hợp này có thể là các hợp chất mùn, hoặc các hợp chất đơn giản hơn. Ví dụ các dẫn xuất phenol hay các axit béo.

– Cây trồng đồng hoá Mn dưới dạng Mn^{2+} và dưới dạng oxy hoá nhiều hơn như Mn_3O_4 , hoặc có thể ở dạng phức hợp. Những dạng khó hoà tan cho cây không sử dụng được và nếu hàm lượng Mn trong đất cao sẽ gây ngộ độc cho cây.

– Trong đất, tỷ lệ ion Mn^{2+} và Mn^{4+} phụ thuộc vào quá trình hoá học hay sinh học. Hai quá trình này cùng tồn tại và thể hiện khác nhau tùy trường hợp.

+ Khi pH cao hơn 8,0 hoặc nhỏ hơn 5,5 thì quá trình hoá học được biểu diễn ra như sau:



+ pH dưới 5,5, dạng Mn^{2+} là chủ yếu.

+ pH trên 8,0, dạng Mn^{4+} chiếm chủ yếu.

pH trong khoảng 5,5 – 8,0, quá trình sinh học chiếm ưu thế và chi phối quá trình oxy hoá Mn trong đất (Alexander, 1961).

Tuy nhiên người ta cũng đã chứng minh rằng, ở pH nhỏ hơn 5,5 cũng có hoạt động của vi sinh vật ở đất mùn rừng miền Đông nước Pháp (Vallec, 1967).

2.5.2. Oxy hoá sinh học Mn trong đất

2.5.2.1. Vi sinh vật

– Những giống vi sinh vật chuyển hoá Mn:

Aerobacter, *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Pseudomonas*, *Spherotilus*, *Hyphomicrobium*.

– Nấm mốc: Những giống chính là: *Cuvularia*, *Periconia*, *Cephalosporium*, *Helminthosporium*, *Cladosporium*, *Coniothyrium*.

– Xạ khuẩn: *Nocardia*, *Streptomyces* (Timonin, 1950; Bromimella, Skerman, 1950).

2.5.2.2. Cơ chế của quá trình oxy hoá sinh học Mn

a) Oxy hoá Mn^{2+} do sự sản sinh hydroxit thành môi trường kiềm hay kiềm hoá môi trường chứa hydroxit

Người ta đã chứng minh rằng ở môi trường kiềm, hydroxyaxit, axit xitric, tartaric, lactic, malic, gluconic, Mn dạng khử oxy hoá theo

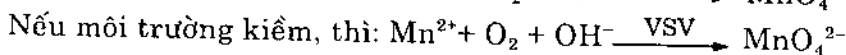
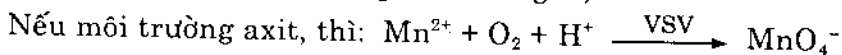
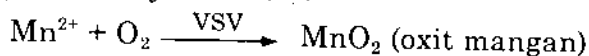
quá trình hoá học. Những điều kiện này thuận lợi cho quá trình tự oxy hoá Mn theo quá trình hoá học.

– Vi sinh vật tổng hợp nên những hydroxit từ các hydratecarbon thành môi trường kiềm.

– Vi sinh vật làm kiềm hoá môi trường trước đó đã có những hydroxyaxit.

b) Oxy hoá Mn^{2+} do enzyme peroxydaza

Trong đất, vi sinh vật có thể sản sinh H_2O_2 do enzyme peroxydaza. H_2O_2 có thể oxy hoá Mn^{2+} .



2.5.3. Điều kiện ngoại cảnh

Điều kiện ngoại cảnh ảnh hưởng quá trình oxy hoá sinh học, có thể như sau:

– Độ pH: gần trung tính từ 6,0 – 7,5.

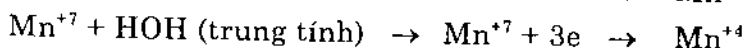
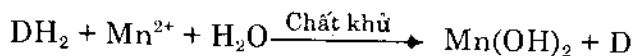
– Hệ rễ: Hệ rễ cây trồng kích thích quá trình oxy hoá Mn. Quá trình oxy hoá này dẫn đến sự giảm bớt quá trình đồng hoá Mn của cây. Tuy trường hợp, quá trình này có hại hơn là có lợi cho cây.

2.5.4. Khử sinh học Mn

Ngoài quá trình oxy hoá hoá học và oxy hoá sinh học, trong đất còn có thể xảy ra quá trình khử Mn sinh học.

Quá trình có thể tiến hành theo 3 hướng:

a) Khử trực tiếp: Trong điều kiện yếm khí, có sự hiện diện của hợp chất hữu cơ có thể đồng hoá được, Mn^{2+} đảm nhận vai trò chất nhận electron:



b) Khử gián tiếp do quá trình axit hoá: Trong điều kiện axit, Mn có xu hướng khử. Ví dụ quá trình nitrat hoá hay SO_4^{2-} hoá, môi trường trở nên chua, Mn có xu hướng khử. Hoặc do quá trình khử nitrat hay khử sulfat.

Chương VI

ĐỘNG THÁI VÀ SỰ PHÂN BỐ CỦA VI SINH VẬT ĐẤT TRÊN MỘT SỐ LOẠI ĐẤT CHÍNH VIỆT NAM

I- ĐỘNG THÁI CỦA VI SINH VẬT

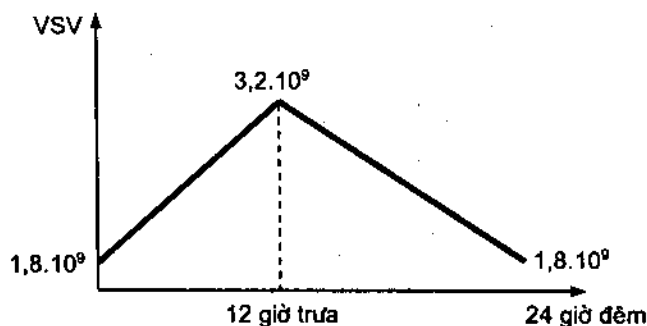
Một trong những đặc tính của vi sinh vật trong đất là tính mẫn cảm đối với môi trường sống, bởi vậy những thay đổi của môi trường sống đều ảnh hưởng đến quá trình hoạt động sống của vi sinh vật đất.

Thành phần và số lượng vi sinh vật trong đất diễn biến rất phức tạp nó phụ thuộc nhiều yếu tố khác nhau như nhiệt độ, độ ẩm đất, độ ẩm không khí, theo địa hình, độ sâu của loại đất, thành phần cơ giới đất,...

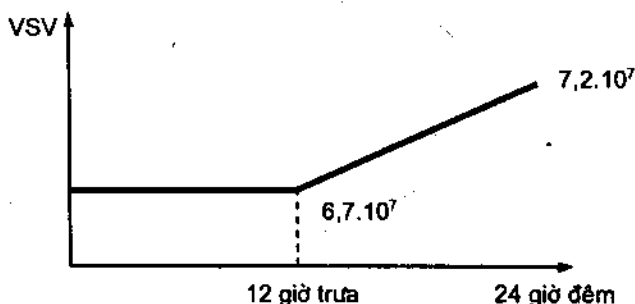
1.1. ĐỘNG THÁI CỦA VI SINH VẬT THEO NGÀY, THÁNG, NĂM

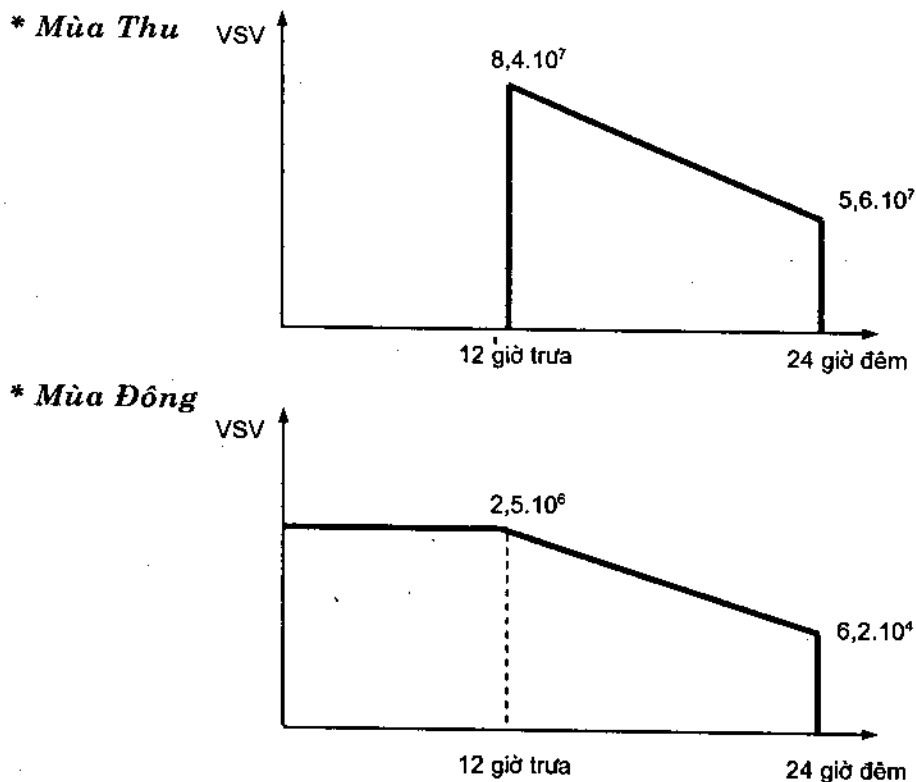
– Động thái của vi sinh vật theo ngày:

* *Mùa Xuân*



* *Mùa Hạ*





Hình 6.1. Động thái VSV theo ngày

– Động thái của vi sinh vật giao động rất lớn trong ngày, giờ, phụ thuộc vào từng mùa khác nhau mà khác nhau. Thậm chí trong một mùa, mỗi ngày giao động cũng rất khác nhau, trong một giờ của ngày giao động cũng rất khác nhau.

– Động thái vi sinh vật phụ thuộc nhiều vào khí hậu, thời tiết, cụ thể vào: nhiệt độ, độ ẩm, môi trường sống khác nhau cho mật độ vi sinh vật rất khác nhau.

Kết quả phân tích cho thấy: Vào mùa xuân, mật độ vi sinh vật ở ban ngày nhiều hơn là ở ban đêm. Vào mùa hạ, mật độ vi sinh vật ở ban ngày thấp hơn ở ban đêm. Vào mùa thu, mật độ vi sinh vật ở ban ngày cho cao hơn ở ban đêm. Vào mùa đông, mật độ vi sinh vật ở ban ngày cao hơn nhiều ở ban đêm.

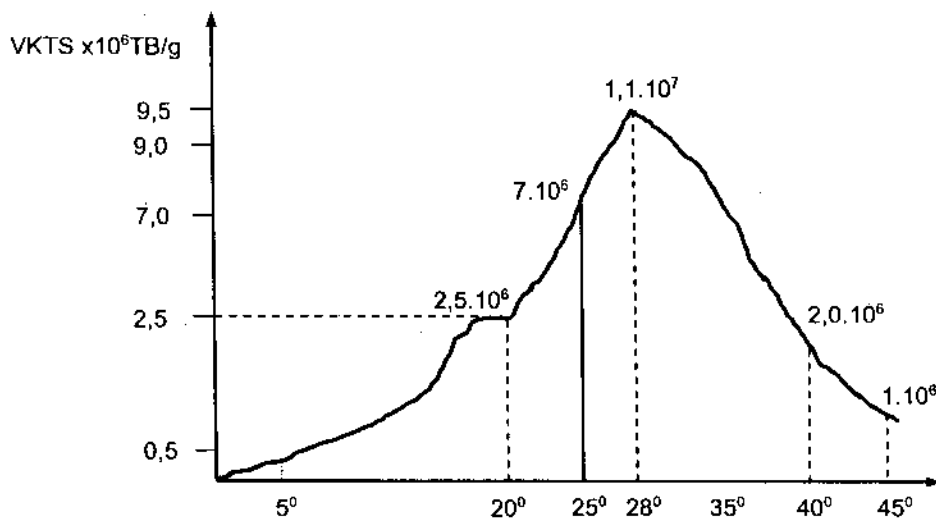
VSV tổng số $10^7 - 10^9$ TB/g đất vào tháng 3 đến tháng 5 (mùa xuân), nhiệt độ không khí đạt $25 - 28^\circ\text{C}$ (lúc này nhiệt độ trong đất khoảng $23 - 25^\circ\text{C}$). Ở trong đất, nhiệt độ này rất thích hợp cho VSV phát triển, khi nhiệt độ trong đất tăng, sẽ tăng hoạt động sống của

VSV làm cho quá trình khoáng hoá sẽ tăng theo, đồng thời cũng làm tăng sự hoà tan của các chất khoáng. Sản phẩm cuối cùng của quá trình phân huỷ, chuyển hoá trên cho rất nhiều chất dinh dưỡng, cung cấp cho VSV phát triển mạnh, dẫn đến số lượng VSV đất đạt cực đại. Khi nhiệt độ không khí tăng quá 30°C ; trời khô hanh, nóng bức không thích hợp cho sinh trưởng, phát triển của VSV, nhất là trên đất xám bạc màu, khô hạn thì càng ảnh hưởng xấu đến VSV. Điều này cũng rất phù hợp với thang chia nhóm VSV theo nhiệt độ của UTUHH (1980). Đó là VSV phát triển mạnh nhất, nhiều nhất là nhóm VSV ưa ẩm thích hợp ở nhiệt độ từ $25 - 30^{\circ}\text{C}$. Nhiệt độ quá cao hay quá thấp cũng ảnh hưởng đến VSV, dẫn đến số lượng VSV vào mùa hè (tháng 7, 8) thấp hơn ở chính giữa mùa xuân.

Vào mùa thu, tiết trời dịu mát, không nắng gay gắt như ở mùa hè làm cho hoạt động sống của vi sinh vật cũng có phần được cải thiện, dẫn đến số lượng vi sinh vật ở mùa thu cao hơn chút ít so với ở mùa hè. Vào mùa đông, tiết trời lạnh, ảnh hưởng rất xấu đến hoạt động sống của vi sinh vật, dẫn đến số lượng vi sinh vật ở mùa đông thấp nhất trong năm, ở trên một số loại đất, cho kết quả phân tích chỉ đạt $10^4 - 10^5$ TB/g đất khô.

Kết quả nghiên cứu của các tác giả khác cũng cho tương tự, ngoài ra số lượng VSV đất còn phụ thuộc cả vào tính chất đất khác nhau mà khác nhau.

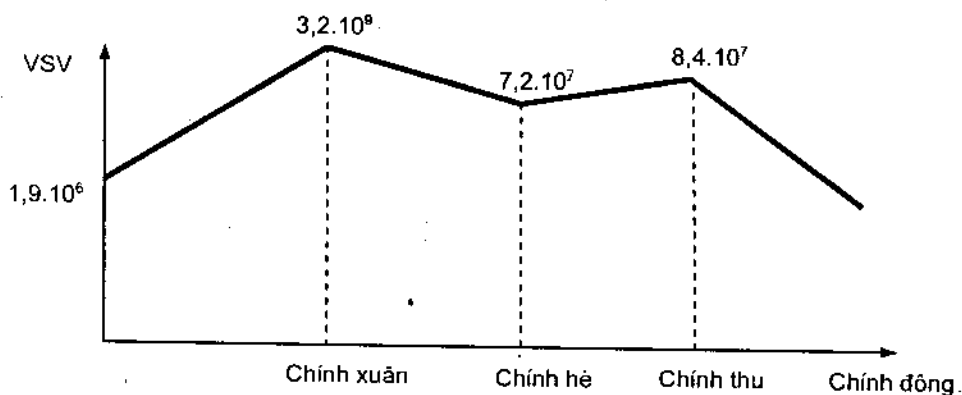
1.2. ĐỘNG THÁI CỦA VI SINH VẬT THEO NHIỆT ĐỘ



Hình 6.2. Động thái VSV theo nhiệt độ

Động thái của vi sinh vật theo nhiệt độ giao động rất lớn, đa số vi sinh vật hoạt động mạnh ở nhiệt độ từ 22°C đến 30°C . Nằm ngoài khoảng nhiệt độ đó đều ảnh hưởng xấu đến vi sinh vật.

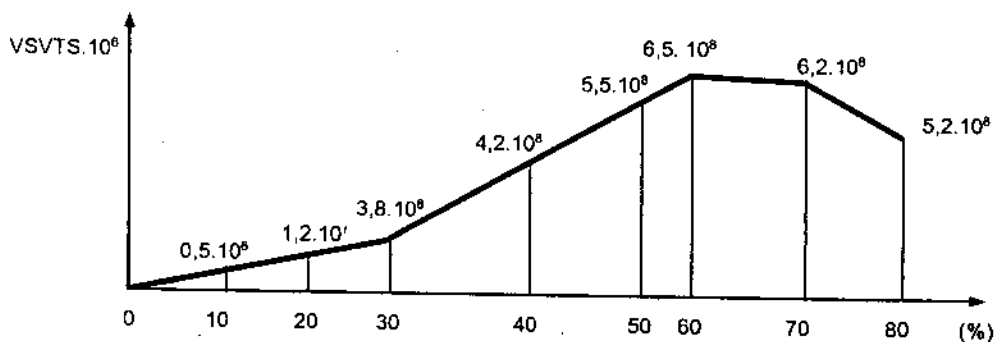
1.3. ĐỘNG THÁI CỦA VI SINH VẬT THEO MÙA TRONG NĂM



Hình 6.3. Động thái VSV theo mùa

Thành phần và số lượng vi sinh vật đất đạt cực đại vào chính mùa xuân, khoảng tháng 3, 4; sau đó giảm chút ít theo mùa hè và tiếp tục tăng dần theo mùa thu và đạt cực tiểu vào chính đông. Lý do của sự tăng giảm này là do thời tiết, khí hậu, như: nhiệt độ và độ ẩm trong đất; ngoài ra phụ thuộc rất lớn vào quá trình khoáng hoá trong đất.

1.4. ĐỘNG THÁI CỦA VI SINH VẬT THEO ĐỘ ẨM



Hình 6.4. Động thái VSV theo độ ẩm

Động thái của vi sinh vật giao động rất lớn theo độ ẩm không khí và độ ẩm môi trường đất, vi sinh vật phát triển mạnh ở độ ẩm môi

trường khoảng từ 50 – 70%, nằm ngoài khoảng độ ẩm này đều ảnh hưởng xấu đến hoạt động sống của vi sinh vật.

II- SỰ PHÂN BỐ CỦA VI SINH VẬT TRÊN CÁC LOẠI ĐẤT

2.1. SỰ PHÂN BỐ CỦA VI SINH VẬT TRONG ĐẤT

2.1.1. Đất là môi trường sống tốt nhất cho vi sinh vật

Trong đất có đầy đủ những điều kiện tối thiểu cho vi sinh vật tồn tại và phát triển. Ngay từ khi Trái Đất được hình thành, người ta đã kết luận rằng, sự sống đầu tiên trên Trái Đất đó là vi sinh vật.

– Nhiệt độ trong đất rất thích hợp cho sinh vật đất nói chung và vi sinh vật đất nói riêng, nhiệt độ luôn luôn giao động từ 23 – 28°C (như trong Giáo trình Vi sinh vật đại cương, chúng ta đã biết là, đa số vi sinh vật hoạt động mạnh ở nhiệt độ 25 – 28°C).

– Độ ẩm trong đất cũng rất phù hợp với vi sinh vật, thường trong khoảng từ 30 – 85% (vi sinh vật hoạt động tốt ở độ ẩm khoảng 4 – 75%).

– Trong đất có đầy đủ các nguyên tố hoá dinh dưỡng đa lượng và vi lượng, như: N, P, K, Na, Ca, Fe, Mn, S, Mo, Bo, Cu, Zn,... Ngoài ra trong đất còn tồn tại nhiều loại enzym phù hợp cho hoạt động sống của vi sinh vật.

Chính vì vậy, theo Kranhixnhicop.N.A, trong 1 gam đất có chứa tới 100 triệu tế bào vi khuẩn, 10 triệu tế bào xạ khuẩn, 10 vạn đến 1 triệu tế bào nấm, 1 vạn đến 10 vạn tế bào tảo.

Tuy nhiên tùy từng vùng sinh thái khác nhau, tùy từng loại đất khác nhau mà có thành phần và số lượng vi sinh vật đất khác nhau.

Công trình của Phedorov và Khudianov nghiên cứu về quy luật phân bố của vi sinh vật ở đất Podzol cho rằng, các quá trình hoạt động của vi sinh vật cũng như số lượng của chúng tập trung chủ yếu ở lớp mặt, giảm dần theo độ sâu của phẫu diện và càng xuống sâu hầu như không phát hiện thấy vi sinh vật. Nhận xét này cũng phù hợp với kết quả nghiên cứu của các tác giả Việt Nam.

+ Độ dày của tầng đất:

Vi sinh vật tập trung ở tầng đất canh tác và giảm dần theo độ sâu của phẫu diện đất. Đặc biệt là vi sinh vật hiếu khí giảm mạnh, vi khuẩn kỵ khí phân bố chủ yếu ở độ sâu 30 – 50cm.

Nói chung vi sinh vật ở đất trồng trọt, đất rừng, đồng cỏ thường tập trung ở độ sâu 0 – 30cm thuộc lớp trên cùng.

+ Đặc điểm và tính chất của đất: đó là tính chất vật lý, hoá học của đất; đặc điểm địa hình bằng phẳng hay dốc đứng.

Vi sinh vật ở đất giàu dinh dưỡng, tơi xốp có độ ẩm và độ pH thích hợp thì phát triển tốt, dẫn đến số lượng nhiều. Ngược lại ở đất nghèo dinh dưỡng, kết cấu đất chặt, khô cằn hay bị chua, mặn thì có số lượng ít. Có thể thấy: đất vùng đồng bằng do tác động lâu đời của con người nên có số lượng vi sinh vật đất cao hơn ở đất trung du, miền núi; vùng gò đồi do phá rừng bị rửa trôi, xói mòn mạnh, đất nghèo dinh dưỡng, vi sinh vật ít; vùng đất trũng ngập nước tuy dinh dưỡng nhiều nhưng độ thoáng khí kém, sự lên men kỵ khí sinh nhiều chất có hại nên sự phát triển của vi sinh vật cũng kém.

2.1.2. Tác dụng của vi sinh vật trong đất

– Tổng hợp các chất cần thiết cho sự phát triển của cây trồng và tăng nguồn dinh dưỡng cho đất như tổng hợp các chất đạm hữu cơ từ nitơ của khí quyển nhờ vi khuẩn nốt sần sống cộng sinh với cây họ đậu, góp phần cung cấp chất dinh dưỡng N hữu cơ cho cây và vi khuẩn cố định đạm *Azotobacterium*, giúp tăng hợp chất N hữu cơ, vô cơ trong đất.

– Tăng cường sự phân giải các hợp chất hữu cơ trong đất góp phần hình thành chất mùn trong đất để tăng độ phì trong đất.

– Tăng cường sự chuyển hoá các hợp chất vô cơ trong đất:

+ Vi sinh vật mà trong đó phần lớn là vi khuẩn có tác dụng chuyển hoá các hợp chất có chứa N và không chứa N, như vi khuẩn nitrat hoá tạo thành các muối nitrit và nitrat trong đất từ NH_3 và O_2 . Sự chuyển hoá này do vi khuẩn *Nitrosomonas* và *Nitrobacter* thực hiện.

+ Các hợp chất chứa lưu huỳnh được một số nhóm vi khuẩn, như vi khuẩn tự dưỡng không nha bào chuyển hoá thành axit sunfuric, sau đó sẽ phản ứng với các bazơ ở đất tạo thành sunfat. Các vi khuẩn còn tham gia vào các phản ứng chuyển hoá khác như chuyển hoá sắt.

Tác dụng chuyển hoá trên có lợi rất lớn cho sự hấp thụ của cây, vì vi sinh vật đã tạo nên các hợp chất trong đất để cây dễ dàng hấp thụ, đó là các muối nitrat, các muối sunfat. Tác dụng chuyển hoá này cũng tạo nên những biến đổi về mặt lý, hoá của đất như độ pH, độ thoáng khí.

– Đất là môi trường tồn giữ các vi sinh vật gây bệnh cho người và gia súc:

Đất dễ bị nhiễm bởi các vi sinh vật gây bệnh từ nguồn chất thải nước của người và động vật. Khi vi sinh vật gây bệnh vào đất, phần lớn bị tiêu diệt nhưng vẫn còn một số bộ phận tồn tại trong một thời gian như trực khuẩn lao sống trong đất 5 tháng, trực khuẩn thương hàn 3 tháng, cầu khuẩn mưng mủ 2 tháng, trực khuẩn *Pasteurella* 14 ngày, trực khuẩn *Bracella* hơn 3 tháng, virus dịch tả lợn 5 ngày. Nếu vi khuẩn gây bệnh có nha bào thì khả năng tồn tại trong đất lâu hơn nhiều, như nha bào nhiệt thán có thể tồn tại hơn 18 năm. Do vậy đất là môi trường truyền bệnh quan trọng, nếu như không có biện pháp xử lý ngăn ngừa.

– Vi sinh vật đất phụ thuộc vào tính chất của từng loại đất, vào quá trình hình thành đất, vào độ cao và độ sâu tầng đất, vì vậy sự phân bố của chúng trong đất cũng rất khác nhau, tuy nhiên về cơ bản cũng tuân theo một quy luật chung nhưng đôi khi có những trường hợp ngoại lệ.

+ Phân bố vi sinh vật đất theo độ cao: Ở trên núi có độ cao 4.000m (Panmia), một số nhà nghiên cứu phát hiện nhóm vi khuẩn hoại sinh tham gia vào quá trình phân huỷ các khoáng vật silicat. Các nhà khoa học đã xác định được trực khuẩn *Bacillus extorpuens*, vi khuẩn nitrat hoá, vi khuẩn butyrat có khả năng phân huỷ các khoáng vật aluminosilicat, apatit và mica,...

Theo Nguyễn Kim Vũ thì trong điều kiện nhiệt đới ẩm ở Việt Nam, số lượng vi sinh vật cũng tăng theo chiều cao địa hình và đạt chỉ số cực đại ở độ cao 100m, sau đó giảm dần, vi khuẩn và xạ khuẩn phát triển theo quy luật trên, riêng nấm tăng theo độ cao của địa hình ứng với lượng vật chất hữu cơ tích lũy.

+ Phân bố vi sinh vật đất theo độ sâu: theo đặc thù của quá trình tạo nên các loại đất mà có những ý kiến khác nhau về sự phân bố vi sinh vật đất theo độ sâu. Tuy nhiên những công trình của Phedorov và của Khudianov nghiên cứu về quy luật phân bố của vi sinh vật ở đất Podzol cho rằng, các quá trình hoạt động của vi sinh vật cũng như số lượng của chúng tập trung chủ yếu ở lớp mặt, giảm dần theo độ sâu của phẫu diện và càng xuống sâu hầu như không phát hiện thấy vi sinh vật.

Kết quả nghiên cứu của Hoàng Lương Việt, Ngô Thế Dân, Nguyễn Đậu về quy luật phân bố của vi sinh vật theo độ cao cũng đưa ra nhận xét các quá trình hoạt động của vi sinh vật, số lượng của chúng tập trung nhiều ở bề mặt và giảm dần theo độ sâu của tầng đất.

2.2. SỰ PHÂN BỐ CỦA VI SINH VẬT TRÊN CÁC LOẠI ĐẤT

2.2.1. Thành phần và số lượng vi sinh vật trên 3 loại đất chính ở Liên Xô

BẢNG 6.1. SỐ LƯỢNG VI SINH VẬT TRÊN MỘT SỐ LOẠI ĐẤT CHÍNH Ở LIÊN XÔ
(Tropkin, 1976)

Loại đất	VSV tổng số ($\times 10^6$)	Vi khuẩn TS (%)	Nấm TS (%)	Xạ khuẩn TS (%)
Đất podzol trống cỏ	441	70,7	28,2	1,1
Đất xám bạc màu	1.925	89,3	8,1	2,6
Đất đen	3.500	73,8	15,4	10,8

Theo Viện sĩ Tropkin (1976) khi nghiên cứu về số lượng, thành phần vi sinh vật đất trên một số loại đất chính của Liên Xô cho thấy: đối với các loại đất khác nhau thì thành phần và số lượng vi sinh vật đất cũng rất khác nhau. Trên đất podzol trống cỏ, vi sinh vật đất tổng số là 441×10^6 tế bào/1g đất. Ở đất xám bạc màu là 1.925×10^6 tế bào/1g đất, còn đất đen là 3.500×10^6 tế bào/1g đất, tăng gấp 7,9 lần so với đất podzol. Như vậy ở đất đen có thành phần dinh dưỡng cao, độ ẩm thích hợp, các điều kiện khoáng hoá tốt, thành phần cơ giới đất tối xốp,... thì số lượng vi sinh vật đất nhiều hơn. Ngược lại ở đất podzol, nghèo dinh dưỡng, đất có thành phần cơ giới nặng, điều kiện độ ẩm, thoáng khí kém thì số lượng vi sinh vật ít.

2.2.2. Thành phần và số lượng vi sinh vật trên một số nhóm đất chính ở Việt Nam

2.2.2.1. Thành phần và số lượng vi sinh vật trên một số nhóm đất chính

– Đến nay ở nước ta đã có nhiều nhà khoa học nghiên cứu về thành phần và số lượng vi sinh vật đất.

**BẢNG 6.2. THÀNH PHẦN VÀ SỐ LƯỢNG VSV
TRÊN MỘT SỐ LOẠI ĐẤT CHÍNH VIỆT NAM**

(Nguyễn Thị Thanh Phụng, 1982. Nguyễn Đường,
Nguyễn Xuân Thành, 1996)

Loại đất	Cây trồng	VSVTS (10 ⁶ TB/g)	Vi khuẩn TS %	Nấm TS %	Xạ khuẩn TS %
Đất đỏ bazan (Đồng Nai)	Cao su	213,4	95,5	1,8	2,7
Đất phù sa sông Cửu Long (Cần Thơ)	Lúa – Mè	24,6	90,3	3,6	6,1
Đất đỏ vàng trên đá sét (Vĩnh Phúc)	CM	29,4	76,8	12,2	11,0
Đất cát biển (Nghệ An)	CM	9,7	83,5	11,0	5,5
Đất phèn ngoại ô Thành phố Hồ Chí Minh	CM	7,9	59,6	24,5	15,9
Đất phù sa sông Hồng (Hà Nội)	2 Lúa	186,6	96,9	1,4	1,7
Đất phù sa Tiền Hải, (sông Thái Bình)	2 Lúa	113,2	97,6	1,4	1,0
Đất bạc màu (Bắc Giang)	Lúa - Mè	98,7	92,6	3,4	4,2
Đất đồi Feralit trên đá vôi (Thanh Hoá)	CM	108,0	92,0	4,8	3,2
Đất cát biển Hậu Lộc, Thanh Hoá	CM	18,9	85,6	10,5	3,9
Đất vàng trên đá biến chất, Hà Giang	Sắn	11,8	87,0	8,0	5,0

(CM: Chuyên màu)

– Qua số liệu từ kết quả nghiên cứu, nhận thấy:

+ Thành phần và số lượng vi sinh vật ở các loại đất khác nhau cũng rất khác nhau: đất càng tốt thì vi sinh vật tổng số càng cao; đất càng xấu, dinh dưỡng thấp, điều kiện môi trường sống kém chất lượng, vi sinh vật càng ít.

Đất đỏ bazan có số lượng vi sinh vật tổng số đạt $213,4 \times 10^6$ TB/1g đất khô (đất phèn ở ngoại ô thành phố Hồ Chí Minh chỉ đạt $7,9 \times 10^6$ TB/1g đất khô).

– Thành phần vi sinh vật trên mỗi loại đất cũng rất khác nhau: trên đất bazan vi khuẩn tổng số chiếm 95,5%, nấm 1,8%, xạ khuẩn 2,7%; còn trên đất phèn vi khuẩn tổng số chỉ chiếm 59,6%, nấm tổng

số 24,5%, xạ khuẩn 15,9%. Điều này cho thấy, đất phèn hoặc đất chua rất thích hợp cho nấm phát triển.

2.2.2.2. Thành phần và số lượng vi sinh vật trên nhóm đất phù sa

a) Sự phân bố của vi sinh vật trên nhóm đất phù sa

BẢNG 6.3. THÀNH PHẦN VÀ SỐ LƯỢNG VSV TRÊN MỘT SỐ LOẠI ĐẤT PHÙ SA

(Nguyễn Đường, Nguyễn Xuân Thành, 1998)

((0 – 20cm).10³TB/g đất khô)

	Phù sa sông Hồng		Phù sa sông Thái Bình		Phù sa sông Mã	
	Số mẫu phân tích	Số lượng VSV	Số mẫu phân tích	Số lượng VSV	Số mẫu phân tích	Số lượng VSV
VKTSHK	50	55040	20	47560	20	37010
VKTSYK	50	59560	20	61120	20	69720
Nấm TS	50	410	20	380	20	370
Xạ khuẩn TS	50	230	20	171	20	158
Vi khuẩn amôn hoá	25	5510	15	3820	15	2853
Vi khuẩn nitrat hoá	25	3000	15	3800	15	4580
Vi khuẩn phản nitrat hoá	25	2160	15	3400	15	4260
Vi khuẩn <i>Azotobacter</i>	25	236	15	104	15	65
Thành phần cơ giới đất	300	d	50	e	100	e
pH _{KCl}	300	6,8	50	5,4	100	4,1
Mùn %	300	2,12	50	2,60	100	5,16
Lân %	300	0,095	50	0,100	100	0,110
P ₂ O ₅ dễ tiêu (mg/100g đất)	300	15,1	50	9,5	100	4,5
K ₂ O trao đổi (mg/100g đất)	300	16,8	50	22,5	100	19,3
Năng suất lúa (tạ/ha)	500 hộ	42,81	150	39,20	500 hộ	37,52

(VKTSHK: Vi khuẩn tổng số hiếu khí; VKTSYK: Vi khuẩn tổng số yếm khí)

Số liệu ở bảng 6.3 cho thấy:

– Đất phù sa sông Hồng có số lượng vi khuẩn tổng số hiếu khí cao hơn ở đất phù sa sông Thái Bình và sông Mã. Trên đất phù sa ngập nước yếm khí cho tỷ lệ vi khuẩn tổng số yếm khí trên vi khuẩn tổng số hiếu khí luôn luôn nhỏ hơn 1. Tỷ lệ vi khuẩn hiếu khí/ vi khuẩn yếm khí ở đất phù sa sông Hồng là 0,93, ở đất phù sa sông Thái Bình là 0,77 và ở đất phù sa sông Mã là 0,54.

– Kết quả còn cho thấy thành phần và số lượng vi sinh vật đất còn có mối quan hệ rất chặt với tính chất nông hoá, thổ nhưỡng đất. Ở đâu có tính chất đất tốt, thì ở đó số lượng vi sinh vật hữu ích nhiều và quá trình sinh trưởng, phát triển của cây trồng tốt và kết quả sẽ cho năng suất cây trồng cao và ngược lại.

Xét về mối quan hệ hữu cơ 3 chiều: đất – vi sinh vật và cây trồng, thì ở đất phù sa sông Hồng cho các chỉ tiêu tốt hơn và đạt năng suất lúa cao nhất, tiếp theo là ở đất phù sa sông Thái Bình và xấu nhất là đất phù sa sông Mã.

b) Khu hệ vi sinh vật đất lúa nước

– Các tầng chính trong phẫu diện đất lúa nước:

+ Tình trạng ngập nước của đất trồng lúa đã làm thay đổi sâu sắc tính chất hoá học, lý học và vi sinh vật của đất. Chế độ nước trong đất có vai trò quyết định, làm thay đổi chế độ không khí, chế độ nhiệt của đất, tạo nên hình thái phẫu diện đặc biệt của đất lúa. Phẫu diện đất lúa thường phân ra: tầng canh tác, tầng đế cày, tầng loang lổ, tầng glây. Ngay trong tầng canh tác cũng phân thành 2 lớp rõ rệt. Lớp đất mỏng vài ba phân trên cùng thể hiện tính chất oxy hoá, còn các lớp dưới có tính chất khử mạnh dần lên. Theo Greene (1970) thì các lớp của ruộng lúa trong pha ngập nước được chia làm 5 lớp.

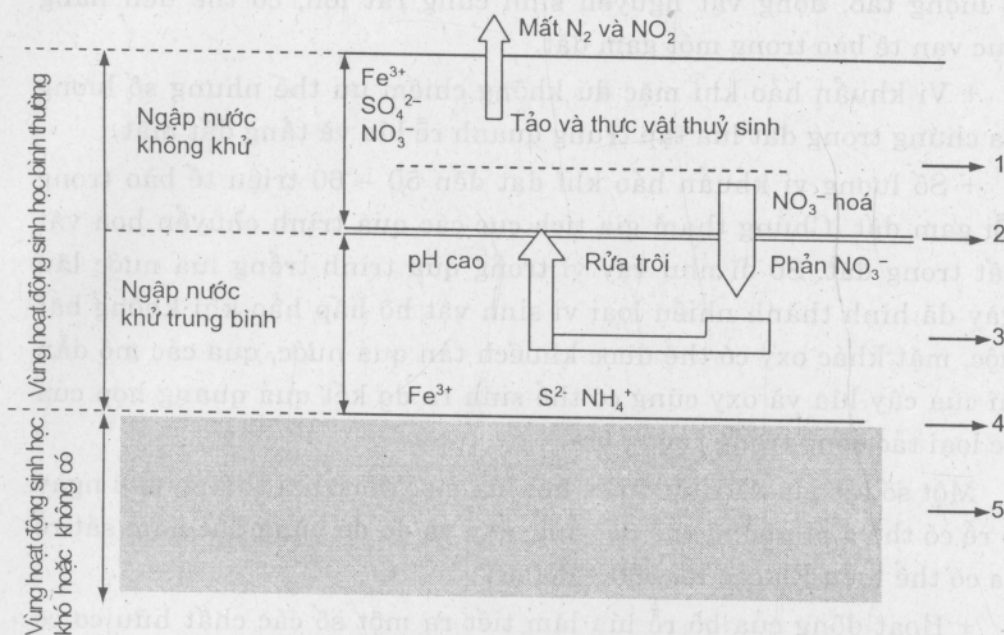
Lớp thứ 1: Lớp bề mặt tiếp xúc ngay dưới mặt nước, một mặt phẳng màu nâu mỏng. Đây là phần có oxy khuếch tán từ không khí vào và oxy thải ra từ thực vật thủy sinh.

Lớp thứ 2: Dưới sát tầng 1, có độ dày 0,5mm, có hydroxit sắt kết tủa do quá trình oxy hoá chất Fe^{2+} . Đây là lớp từ tầng khử mạnh xanh xám chuyển dần lên.

Lớp thứ 3: Phần khử mạnh. Vì khử mạnh nên các quá trình phản NO_3^- , quá trình khử Mn^{4+} thành Mn^{2+} , khử Fe^{3+} thành Fe^{2+} hoạt động.

Lớp thứ 4: Lớp này không dày, có nhiều Fe và Mn.

Lớp thứ 5: Lớp bị oxy hoá, đây là tầng đất cái.



Hình 6.5. Sơ đồ đất ruộng lúa ngập nước (theo Green, 1970)

Trong cùng một lớp có sự thể hiện đồng thời 2 quá trình oxy hoá và khử ngược nhau. Thật vậy trong tầng oxy hoá: NH_4^+ được chuyển thành NO_3^- , NO_3^- lại chuyển vào tầng khử để cho N_2 , làm đất mất đạm.

Chúng ta thấy ở đây theo chiều thẳng đứng có một lớp khử nằm kẹp giữa 2 lớp oxy hoá.

+ Bên cạnh sự xen kẽ phức tạp theo chiều thẳng đứng còn có sự xen kẽ phức tạp theo chiều ngang, trong vùng rễ có một quá trình ngược nhau:

* Quá trình đồng hoá O_2 và thải CO_2 của rễ.

* Quá trình khuếch tán O_2 do sự vận chuyển O_2 từ những phần trên mặt đất của cây xuống rễ [Jeffery (1961), Barber và cộng sự (1962), Valorat và Latery (1966)].

– Vi sinh vật trong đất lúa nước:

+ Nét sai khác lớn nhất so với đất trồng màu là tình trạng kỵ khí đã ức chế một phần các vi sinh vật hiếu khí, kích thích sự phát triển của các loại kỵ khí, kỵ khí không bắt buộc. Các trực khuẩn có bào tử,

vi sinh vật amôn hoá, vi khuẩn lưu huỳnh, vi khuẩn phản NO_3^- , vi khuẩn cố định N, yếm khí phát triển mạnh hơn so với đất trồng màu. Số lượng tảo, động vật nguyên sinh cũng rất lớn, có thể đến hàng chục vạn tế bào trong một gam đất.

+ Vi khuẩn hảo khí mặc dù không chiếm ưu thế nhưng số lượng của chúng trong đất lúa tập trung quanh rễ lúa và tầng đất mặt.

+ Số lượng vi khuẩn hảo khí đạt đến 50 – 60 triệu tế bào trong mỗi gam đất. Chúng tham gia tích cực các quá trình chuyển hoá vật chất trong đất. Sở dĩ như vậy vì trong quá trình trồng lúa nước lâu ngày đã hình thành nhiều loại vi sinh vật hô hấp hảo khí không bắt buộc, mặt khác oxy có thể được khuếch tán qua nước, qua các mô dẫn khí của cây lúa và oxy cũng có thể sinh ra do kết quả quang hợp của các loại tảo sống trong ruộng lúa.

Một số tác giả đã tính được, khi lúa mọc được hai tháng, mỗi ngày bộ rễ có thể giải phóng vào đất 3mg oxy và do đó vùng đất nằm sát rễ lúa có thể hiệu Eh cao tới 500 – 600mV.

+ Hoạt động của bộ rễ lúa làm tiết ra một số các chất hữu cơ có tác dụng thu hút vi sinh vật. Vi khuẩn dị dưỡng, vi khuẩn hảo khí không sinh bào tử và *Azotobacter* tập trung nhiều trên các rễ lúa còn non. Trong khi đó vi khuẩn phân giải xenlulo và xạ khuẩn ở xa rễ hơn. Một số nấm và vi khuẩn còn cư trú ở biểu bì của rễ hoặc trên thân trên lá, trên bông lúa.

+ Khu hệ sinh vật đất lúa cũng biến đổi sau khi có ngập nước có thể chia làm 2 giai đoạn. *Giai đoạn đầu* ngay sau khi ngập nước, khi đó có hiện tượng tiêu hao oxy và khử các chất nitrat, sunfat, sắt hoá trị ba,... Giai đoạn này kéo dài hai, ba ngày tùy thuộc vào lượng oxit sắt có trong đất. Lúc bấy giờ tổng số sinh vật tăng lên rõ rệt và quá trình NO_3^- hoá, sunfat hoá, cố định N_2 và phân huỷ xenlulo được xúc tiến.

Giai đoạn tiếp theo sẽ tăng cường quá trình lên men hydro, lên men metan. Khi đó có sự thay đổi số lượng vi sinh vật và thay đổi tỷ lệ giữa các nhóm hảo khí. Đáng chú ý lúc mới ngập nước, không những chỉ thấy sự tăng số lượng các vi sinh vật kỵ khí mà các loại hảo khí cũng tăng lên mạnh mẽ. Về sau vi sinh vật hảo khí do thiếu oxy nên giảm xuống nhưng vẫn tồn tại với số lượng tương đối lớn trong suốt cả quá trình phát triển của lúa.

+ Động thái diễn biến về số lượng của các nhóm vi sinh vật theo thời kỳ sinh trưởng và phát triển của cây lúa khá phức tạp và không giống nhau. Đặc điểm mùa vụ, chế độ trồng trọt tác động một cách tổng hợp lên khu hệ vi sinh vật đất và tạo ra những sự sai khác đáng kể. Trong điều kiện ở miền Bắc nước ta, vụ lúa chiêm xuân gieo trồng vào tháng có nhiệt độ thấp và thu hoạch vào tháng 5, 6 nên lúc đầu vi sinh vật tăng chậm, rồi đạt tới cực đại từ lúc đẻ rộ đến lúc lúa làm đòng. Thời kỳ thu hoạch, số lượng vi sinh vật vẫn còn lớn. Vụ lúa mùa có nhiệt độ cao, sự hoạt động của vi sinh vật tăng nhanh ngay từ đầu nhưng vào cuối vụ, số lượng giảm mạnh so với lúa đông xuân.

Những chân đất được phơi ải hoặc luân canh lúa màu có ảnh hưởng tốt đến vi sinh vật đất. Các nhóm vi sinh vật cũng phát triển mạnh mẽ và thay đổi tùy theo từng giai đoạn phát triển của cây lúa. Nhóm sinh vật amôn hoá (bao gồm vi khuẩn, nấm, xạ khuẩn) ở đất lúa phát triển hơn so với đất màu. Số lượng cao nhất ở thời kỳ lúa đẻ nhánh, có thể đạt đến hàng chục triệu tế bào trong 1 gam đất. Các loại vi khuẩn amôn hoá, như: *Bac. mycoides*, *Bac. magaterium*, *Bac. mesentenricus*, *Bac. subtilis*,... phân bố ở tầng mặt và tầng sâu.

+ Vi khuẩn phân giải xenlulo trong đất lúa có nhóm hảo khí và kỵ khí. Thời kỳ đất khô hay đất mới ngập nước, nấm tham gia tích cực vào quá trình phân giải xenlulo. Nhưng sau khi ngập nước 10 – 15 ngày thì tác động chủ yếu lại là vi khuẩn.

Sự phân giải xenlulo xảy ra mạnh mẽ nhất ở tầng đất 0,5cm. Ở các lớp đất trên 10cm, quá trình phân giải xenlulo xảy ra chậm. Nhiều thí nghiệm của Mixutin đã chỉ rõ, cày vùi rơm rạ vào đất sau một tháng thì thấy xenlulo bị phân giải chỉ ở tầng đất 0,5cm và 0 – 8cm. Các lớp đất sâu hơn thì hầu như rất ít bị phân giải.

+ Trong đất lúa, đạm vô cơ chủ yếu ở dạng NH_4^+ , đạm NO_3^- chỉ thấy có ở thời kỳ đầu mới ngập nước. Ở đây quá trình nitrat hoá xảy ra chủ yếu và vi khuẩn nitrat hoá thường tập trung thành từng đám ở gần rễ lúa trong lớp đất mặt. Ở tầng đất sâu, số lượng vi khuẩn nitrat hoá, sunfat hoá có mặt thường xuyên trong đất lúa với số lượng lớn; vi khuẩn phản NO_3^- hoạt động rất mạnh. Đây là một trong những nguyên nhân quan trọng làm mất đạm ở đất lúa. Để

hạn chế quá trình này, khi bón đạm ở dạng nitrat cần kết hợp với làm cỏ, sục bùn.

+ Ở những chân đất chua, đất bạc màu, đất lầy thụt, vi khuẩn phân NO_3^- tập trung nhiều ở tầng mặt. Ở những chân ruộng bón phân khoáng liên tục, hoặc những ruộng không chủ động được nước, sự úng, hạn có tác động tăng cường quá trình phân NO_3^- hoá.

+ Vi khuẩn phân sunfat hoá có quan hệ chặt chẽ trong đất. Sau thời kỳ lúa đứng cái, số lượng vi khuẩn phân sunfat hoá rất lớn cho nên các hợp chất lưu huỳnh chủ yếu ở dạng khử. Các hợp chất mangan cũng được oxy hoá và khử trong đất lúa do một số loại xạ khuẩn và vi khuẩn.

+ Vi khuẩn phân giải lân tập trung nhiều xung quanh rễ lúa. Hoạt động của vi khuẩn kỵ khí làm chuyển phần lớn lân khó tan thành dạng dễ tan cung cấp cho cây trồng. Tính chất ngập nước của đất lúa đã làm tăng khả năng hoà tan lân của một số vi khuẩn trong đất lúa (thấy trước khi tưới nước chỉ có 1 chủng có khả năng hoà tan lân, sau khi tưới nước tăng lên 9 chủng có khả năng hoà tan lân). Các chủng này được tăng hoạt lực khi cho thêm vào môi trường fructo và gluco, còn các dạng khác thường ảnh hưởng không tốt đến hoạt tính của chúng.

+ Các loại vi khuẩn sống tự do có khả năng cố định đạm như *Azotobacter*, *Clostridium pasteurianum* cũng có mặt trong đất lúa. Hai loại này có đặc điểm sinh lý khác nhau. *Azotobacter* đòi hỏi phải có oxy phân tử, ưa môi trường trung tính, có đầy đủ lân canxi, magiê và chất hữu cơ. Vì vậy trong đất lúa ở nhiều vùng không phát hiện thấy *Azotobacter*. Trái lại trong đất lúa phù sa sông Hồng phát hiện *Azotobacter* phân bố ở tầng đất canh tác và tầng đất sâu. Số lượng của chúng có thể đạt tới vài vạn tế bào trong mỗi gam đất. Trên những chân đất chua, nghèo dinh dưỡng nhưng được bón phân chuồng kết hợp bón vôi, bón lân liên tục trong ba bốn vụ đã thấy xuất hiện *Azotobacter*.

Vi khuẩn *Clostridium pasteurianum* phân bố nhiều trong đất lúa và hầu hết các đất lúa đều phát hiện thấy vi khuẩn này. Số lượng của

chúng tới hàng vạn tế bào trong mỗi gam đất. Chúng đã góp phần tích cực trong việc làm giàu đạm cho đất.

+ Nấm và xạ khuẩn cũng phát triển trong đất lúa và có vai trò quan trọng trong quá trình chuyển hoá vật chất cung cấp chất dinh dưỡng cho cây trồng. Số lượng nấm tăng lên, lúc lúa đẻ nhánh có thể đạt tới vài triệu tế bào trong 1 gam đất. Chúng tham gia quá trình phân giải xenlulo, amôn hoá đạm hữu cơ, tổng hợp chất mùn, tổng hợp một số kích thích tố. Một số loại nấm sống ở rễ, thân, lá, hạt có thể dẫn đến các bệnh hại lúa và giảm năng suất lúa. Các giống nấm thường gặp là *Penicillium*, *Aspergillus*, *Mucor*, *Alternaria*, *Fusarium*, *Verticillium*, *Cephaeosporium*, *Chaetomium*.

Xạ khuẩn thường phân bố tập trung gần rễ lúa. Chúng tham gia vào quá trình amôn hoá, tổng hợp mùn. Số lượng tăng lên ở giai đoạn lúa làm đồng, nhưng nói chung động thái số lượng của xạ khuẩn ít thay đổi trong suốt quá trình phát triển của lúa. Số lượng của chúng thường đạt từ nửa triệu đến ba triệu tế bào trong 1 gam đất. Các nhóm *Actinomyces albus*, *Act. viridis*, *Act. griseus*, *Act. globisporus* luôn gặp trong các loại đất lúa nước.

Tảo là một nhóm vi sinh vật rất phổ biến trong đất lúa nước. Chúng gồm tảo lam, tảo lục, tảo silic và số lượng có thể đạt tới vài chục triệu tế bào trong gam đất. Tảo thường phát triển ngay trong lớp nước trên mặt ruộng hay trên lớp đất mặt.

Một số tảo có thể sống ở lớp đất sâu. Tảo làm giàu chất hữu cơ cho đất, một số có thể cố định N_2 . Hơn 40 loài tảo lam có khả năng cố định nitơ phân tử và lượng N_2 cố định có thể đạt từ 25 – 60kg nitơ/ha. Nhiều loại tảo đã được sử dụng làm phân bón cho lúa và có tác dụng tăng năng suất lúa. Nhiều thí nghiệm đã cho thấy ở đất phù sa sông Hồng trung tính có số lượng tảo rất lớn, còn ở đất phù sa chua, chua mặn, bạc màu số lượng của chúng ít hơn hẳn. Tảo lam cố định nitơ ở đất lúa đáng chú ý là *Anabaena*, *Nostoc*,... Chúng có thể tăng lượng N trong môi trường 3 – 8% sau 30 ngày nuôi cấy. Các loại tảo cố định nitơ ở ruộng lúa là đối tượng cần được nghiên cứu để góp phần tăng năng suất lúa.

2.2.2.3. Thành phần và số lượng vi sinh vật trên nhóm đất bạc màu nghèo dinh dưỡng

**BẢNG 6.4. THÀNH PHẦN VÀ SỐ LƯỢNG VSV
TRÊN MỘT SỐ LOẠI ĐẤT BẠC MÀU NGHÈO DINH DƯỠNG**

(Nguyễn Đường, Nguyễn Xuân Thành, 1998) ((0 – 20cm) x 10³ TB/g đất khô)

Chỉ tiêu	Bạc màu		Đất Feralit		Cát biển	
	Số mẫu phân tích	Số lượng VSV	Số mẫu phân tích	Số lượng VSV	Số mẫu phân tích	Số lượng VSV
VKTSHK	20	31620	15	11200	20	15720
VKTSYK	20	12570	15	1800	20	2980
Nấm TS	20	234	15	32	20	78
Xạ khuẩn TS	20	124	15	16	20	54
Vi khuẩn amôn hoá	20	1350	15	393	20	972
Vi khuẩn nitrat hoá	20	1850	15	530	20	780
Vi khuẩn phản nitrat hoá	20	85	15	95	20	80
Vikhuẩn <i>Azotobacter</i>	20	18	15	0,3	20	9
Vikhuẩn <i>Rhizobium</i>	20	8,0	15	0,3	20	4,2
Thành phần cơ giới đất	200	b	50	d	200	b
pH _{KCl}	200	5,4	50	4,8	200	5,8
Mùn %	200	0,62	50	0,31	200	0,50
Lân %	200	0,061	50	0,03	200	0,05
P ₂ O ₅ dễ tiêu (mg/100g đất)	200	4,6	50	Vết	200	4,5
K ₂ O trao đổi (mg/100g đất)	200	13,2	50	4,0	200	8,3
Năng suất lúa (tạ/ha)	400	46,8	200	38,6	400	40,5

(VKTSHK: Vi khuẩn tổng số hiếu khí; VKTSYK: Vi khuẩn tổng số yếm khí)

Qua bảng trên, nhận thấy:

– Đất bạc màu, đất feralit và đất cát biển có số lượng vi sinh vật đất rất ít, nhỏ hơn 10 lần so với các nhóm đất phù sa. Ở các loại đất này nấm tổng số và xạ khuẩn tổng số có tỷ lệ % cao hơn ở đất phù sa chuyên canh 2 lúa.

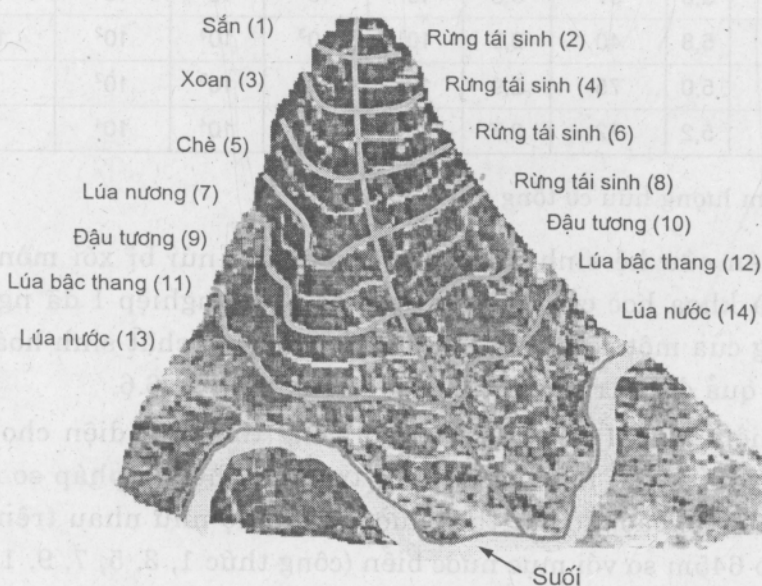
– VSV đất và tính chất nông hoá, thổ nhưỡng của đất bạc màu đều cho cao hơn so với đất cát biển và đất đồi feralit (Fr).

– Đặc biệt là vi khuẩn tổng số hiếu khí trong đất bạc màu gấp 2,07 lần ở đất cát biển và gấp 2,82 lần ở đất đồi feralit. Loại vi khuẩn cố định N_2 tự do *Azotobacter* ở đất bạc màu đạt $1,8 \times 10^4$ tế bào/1g đất, gấp 6 lần ở đất feralit và gấp 2 lần ở đất cát biển. Loại vi khuẩn cố định nitơ cộng sinh (*Rhizobium*) cho ở đất bạc màu là 8×10^3 tế bào/1g đất, gấp 1,9 lần ở đất cát biển và gấp gần 27 lần ở đất đồi feralit.

– Thành phần và số lượng vi sinh vật trên nhóm đất bạc màu nghèo dinh dưỡng này cũng tuân theo quy luật giống như trên các nhóm đất khác, đó là có mối quan hệ hữu cơ chặt với tính chất nông hoá thổ nhưỡng đất và quá trình sinh trưởng, phát triển của cây trồng.

2.2.2.4. Thành phần và số lượng vi sinh vật trên nhóm đất đồi núi

a) Trên đất đồi Đà Bắc, tỉnh Hoà Bình



Hình 6.6. Sự phân bố của sinh vật đất trên đất đồi núi với các loại hình sử dụng đất khác nhau ở huyện Đà Bắc, tỉnh Hoà Bình
(Ảnh của Phan Văn Khuê, 2007)

**BẢNG 6.5. ĐỘNG THÁI CỦA VI SINH VẬT Ở CÁC LOẠI HÌNH SỬ DỤNG ĐẤT ĐỔI
Ở ĐÀ BẮC, TỈNH HOÀ BÌNH**

(Nguyễn Xuân Thành, 2003)

Chỉ tiêu Công thức TN	pH	Độ ẩm (%)	OM (%)	VK TSHK	VK TSYK	Nấm TS	Xạ khuẩn TS	Giun con/m ²
1. Sẵn	4,3	30	0,6	10 ²	0	10 ¹	0	2
2. Rừng	4,8	45	0,9	10 ⁶	10 ²	10 ²	10 ¹	8
3. Xoan	4,0	20	0,3	10 ¹	0	0	0	0
4. Rừng	4,7	41	0,5	10 ⁴	10 ¹	10 ²	0	0
5. Chè	4,1	27	0,5	10 ²	0	0	0	0
6. Rừng	4,9	43	0,6	10 ⁵	10 ¹	10 ²	0	11
7. Lúa nương	4,2	21	0,3	10 ¹	0	0	0	0
8. Rừng	5,1	46	1,1	10 ⁸	10 ³	10 ⁴	10 ³	35
9. Lúa bậc thang	4,5	35	0,6	10 ⁵	10 ²	10 ²	10 ¹	5
10. Lúa bậc thang	5,2	38	0,7	10 ⁷	10 ³	10 ³	10 ²	9
11. Đậu tương	5,6	37	0,8	10 ⁷	10 ³	10 ³	10 ²	10
12. Đậu tương	5,8	40	0,9	10 ⁸	10 ³	10 ³	10 ²	15
13. Lúa nước	5,0	75	2,9	10 ⁷	10 ⁴	10 ³	10 ²	-
14. Lúa nước	5,2	72	2,7	10 ⁸	10 ⁴	10 ⁴	10 ⁴	-

(OM: Hàm lượng hữu cơ tổng số trong đất)

Để nghiên cứu hệ sinh vật đất trên đất đồi núi bị xói mòn rửa trôi, các nhà khoa học của trường Đại học Nông nghiệp I đã nghiên cứu tác động của một số kiểu sử dụng đất đến tính chất sinh hoá học của đất, kết quả được trình bày ở bảng số 6.5, hình số 6.6.

Thí nghiệm gồm 14 công thức (mỗi công thức đại diện cho một kiểu sử dụng đất). Thí nghiệm được bố trí theo phương pháp so sánh trực tiếp, cùng độ cao, độ dốc theo đường bình độ như nhau trên quả đồi có độ cao 645m so với mực nước biển (công thức 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 là những khu đất rừng bị phá để canh tác nương rẫy; công thức 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 là những khu đất không bị chặt phá rừng hay có rừng che phủ đất).

Ở công thức 1 (trồng sắn) cho kết quả phân tích, như sau: các chỉ tiêu phân tích theo dõi đều thấp hơn nhiều so với ở công thức 2 (rừng tái sinh, không bị chặt phá rừng). Kết quả cũng cho tương tự như vậy ở công thức 3 (trồng xoan) so với công thức 4, ở công thức 5 (trồng chè) so với công thức 6, ở công thức 7 (trồng lúa nương) so với công thức 8, ở công thức 9 (trồng đậu tương) so với công thức 10, ở công thức 11 (trồng lúa nước ruộng bậc thang) so với công thức 12, ở công thức 13 (trồng lúa nước) so với công thức 14.

Tóm lại: Ở các công thức số chắn được rừng che chắn dẫn đến cho kết quả số liệu phân tích luôn luôn cao hơn ở các công thức không được rừng bảo vệ. Đặc biệt là số lượng vi khuẩn hảo khí, nấm, xạ khuẩn và giun đất ở các công thức có rừng bảo vệ cho cao hơn rất nhiều so với phía bị chặt phá rừng. Điều này cũng cần quảng bá rằng, vai trò của rừng không chỉ bảo vệ môi trường không khí, mà còn có tác dụng rất lớn đến tính chất sinh hoá học của đất, hạn chế quá trình xói mòn, rửa trôi đất ở vùng trung du, miền núi.

Ngoài ra, trong các kiểu sử dụng đất thì, trồng lúa nương có tác hại xấu nhất đến vi sinh vật đất và tính chất đất. Cụ thể, kết quả cho thấy: Ở công thức 7, có VKTSHK chỉ đạt 10^1 tế bào/gam đất khô, số giun đất không thấy có, trong khi đó ở công thức 8, số lượng VKTSHK đạt 10^8 tế bào, giun đất cho 35 con/ $1m^2$ đất.

Ở loại hình sử dụng đất khác nhau cho số lượng sinh vật đất cũng rất khác nhau, ngoài địa hình phân cắt mạnh theo độ dốc thì ở công thức trồng xoan và trồng lúa nương đều cho số lượng sinh vật đất thấp hơn ở các loại hình sử dụng đất trồng sắn hay trồng đậu tương.

Như vậy, để bảo vệ đất và cải thiện hệ sinh vật đất, chống xói mòn rửa trôi ở đất rừng núi, cần phải cân nhắc sao cho phù hợp khi đưa ra phương thức canh tác.

b) Thành phần và số lượng vi sinh vật trên đất đồi núi khác

Kết quả nghiên cứu của Ngô Thế Dân và Hoàng Lương Việt (1982) về thành phần và số lượng vi sinh vật trên đất đồi núi của nước ta ở tầng đất từ 0 – 10cm cho thấy số lượng vi sinh vật trong đất đồi núi không lớn, chỉ từ 20,4 đến 31,7 x 10^6 tế bào/g đất khô. Số lượng vi sinh vật phụ thuộc vào hàm lượng chất hữu cơ trong đất. Trong các loại đất giàu chất hữu cơ và chua thì nấm và xạ khuẩn tăng lên (thể hiện ở bảng 6.6).

BẢNG 6.6. THÀNH PHẦN VÀ SỐ LƯỢNG VI SINH VẬT TRONG ĐẤT ĐỒI NÚI
(Tầng 0 – 10cm)

Loại đất	VSVTS (10 ⁶ TB/1g đất)	VKTS (10 ⁶ TB/1g đất)	Nấm TS (10 ⁶ .TB/1g đất)	Xạ khuẩn (10 ⁶ TB/1g đất)
Đất feralit trên đá vôi (Thuận Châu, Sơn La)*	20,4	18,0	0,8	1,6
Đất feralit trên bazan	31,7	22,3	4,2	5,2
Đất feralit trên phiến thạch	19,3	12,6	2,2	4,5
Đất mùn alit trên núi (Thuận Châu, Sơn La)*	25,5	20,0	5,0	0,5

**Nguồn: Ngô Thế Dân, Hoàng Lương Việt, 1982.*

So với đất ở đồng bằng thì tổng số vi sinh vật trong đất đồi núi không lớn, chỉ đạt từ 19,3 – 31,7.10⁶ tế bào/g đất. Số lượng vi sinh vật phụ thuộc rất rõ vào độ ẩm đất và hàm lượng chất hữu cơ.

Kết quả nghiên cứu của Ngô Thế Dân, Hoàng Lương Việt và một số tác giả khác về cường độ hoạt động vi sinh vật trong một số đất đồi núi, thể hiện ở bảng 6.7.

BẢNG 6.7. CƯỜNG ĐỘ HOẠT ĐỘNG VI SINH VẬT
TRONG MỘT SỐ ĐẤT ĐỒI NÚI

(Tầng (0 – 12cm). 10⁶ tế bào/1g đất khô)

Loại đất	Cường độ hô hấp (mg CO ₂ /100g/24 h)	Amôn hoá (mg NH ₄ */100 g đất)	Nitrát hoá (mg NO ₂ /100g đất)
Đất feralit trên đá vôi *	18,0	1,6	0,8
Đất feralit trên ba zan	22,3	5,2	4,2
Đất feralit trên phiến thạch	12,6	4,5	2,2
Đất mùn alit trên núi *	20,0	0,5	5,0

**Nguồn: Ngô Thế Dân, Hoàng Lương Việt, 1982.*

Nhận xét:

Từ những kết quả nghiên cứu về thành phần và số lượng vi sinh vật đất trên các loại đất khác nhau ở trong và ngoài nước, có nhận xét như sau:

– Thành phần và số lượng vi sinh vật trên mỗi loại đất khác nhau rất khác nhau. Ở chỗ nào có điều kiện canh tác tốt, tưới tiêu chủ động, thành phần cơ giới đất tốt, độ thoáng khí tốt, chế độ thâm canh cây trồng cao, có dinh dưỡng đất tốt phù hợp với môi trường sống của vi sinh vật, thì ở đó đất có hệ vi sinh vật đất cao và ngược lại.

– Số lượng vi sinh vật trên các nền canh tác khác nhau cũng cho kết quả rất khác nhau.

– Số lượng vi sinh vật đất có liên quan chặt đến tính chất nông hoá đất và điều kiện canh tác, đặc biệt là pH môi trường sống. Ở đâu có môi trường thoáng khí, chế độ tưới tiêu hợp lý, điều kiện sinh thái tốt sẽ tạo điều kiện tốt cho hoạt động của các vi sinh vật.

Chương VII

ẢNH HƯỞNG CỦA BIỆN PHÁP CANH TÁC ĐẾN SINH VẬT ĐẤT

I- MỐI QUAN HỆ HỮU CƠ GIỮA ĐẤT - SINH VẬT ĐẤT VÀ CÂY TRỒNG

1.1. MỐI QUAN HỆ HỮU CƠ GIỮA VI SINH VẬT ĐẤT VÀ ĐẤT TRỒNG TRỌT

– Nhiều loại vi sinh vật như vi khuẩn, rong tảo, địa y tham gia vào quá trình hình thành đất. Vi khuẩn nitrat hoá có tác dụng phá huỷ đá rất mạnh. Trên núi Pamia cao 4.000m có vòng đai nitrat hoá trên mặt đá, nhất là đối với núi đá granit. Sự phong hoá xảy ra nhanh chóng làm cho đá tơi xốp, chứa nhiều axit nitric và lớp đất được hình thành có nhiều muối nitrat. Nhận xét này chứng tỏ vi khuẩn tự dưỡng nitrat hoá trong quá trình oxy hoá amoniac thành axit nitơ và axit nitric đã có tác dụng xúc tiến sự phá huỷ đá thành đất và các chất có thể làm chất dinh dưỡng cho cây.

– Các loại vi khuẩn butyric, vi khuẩn nitrat, vi khuẩn có nha bào *Bacillus oxitroquens* có đủ năng lượng để phá huỷ alumino silicat, apatit và mica. Các tế bào của chúng tập hợp thành khuẩn giao đoàn và những màng nhày bao bọc cả những phân tử khoáng. Sau đó các phân tử khoáng này bị tác dụng tiếp của các loại vi sinh vật và các yếu tố vật lý, hoá học trở thành những dạng dinh dưỡng cây trồng.

– Nhiều loại vi khuẩn hoại sinh phát triển trên môi trường hydrat carbon tiết ra khí CO_2 , axit hữu cơ. Các axit H_2CO_3 , axit hữu cơ phá huỷ alumino silicat, đặc biệt là phenopat và kaolinit. Kết quả hoạt động của chúng tạo ra nhiều axit silic và alumino trong môi trường.

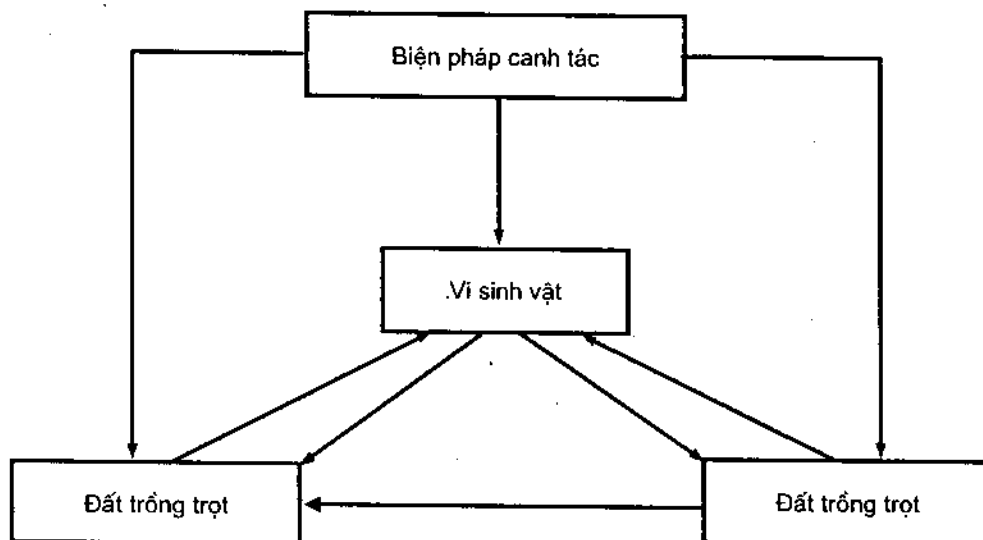
– Các loại thanh tảo, lục tảo có khả năng phá huỷ bề mặt đá tương đối mạnh. Khuê tảo phá huỷ alumino silicat để lấy silic xây

dụng vỏ cứng tế bào của chúng. Tinh thể nitrit khoáng kaolinit dưới tác dụng của khuê tảo Navacula, Nitschia sẽ bị trương lên và hoà tan dần. Trong dung dịch nuôi cấy khuê tảo thấy xuất hiện nhôm.

– Các tinh thể alumino silicat thứ sinh trong đất một phần quan trọng do hoạt động sống của vi khuẩn và nấm tạo thành.

– Đáng kể nhất là trong nhóm vi sinh vật phá huỷ đá là địa y. Chúng không những sản sinh ra khí CO_2 , các axit hữu cơ để phá huỷ đá bằng con đường hoá học mà còn phá huỷ đá bằng tác động cơ giới của các sợi nấm. Kết quả phát triển của địa y đã tích lũy trong môi trường các nguyên tố S, P, K, chất hữu cơ. Đây là những nguyên tố dinh dưỡng cần thiết đối với vi sinh vật. Đồng thời ở những chỗ có địa y mọc xuất hiện khoáng monmorilonit và các yếu tố cần thiết cho sự phát triển của rong rêu và những cây có rễ mọc trên đá.

Trải qua một quá trình lâu dài, dưới tác dụng của vi sinh vật và các yếu tố lý, hoá học, lớp đất mặt hình thành dần, tạo điều kiện cho thế giới thực vật lan rộng và phong phú như ngày nay.



Hình 7.1. Mối quan hệ hữu cơ giữa đất – sinh vật đất và cây trồng

1.2. MỐI QUAN HỆ HỮU CƠ GIỮA VI SINH VẬT ĐẤT VÀ CÂY TRỒNG

1.2.1. Vi sinh vật vùng rễ

Theo Viện sĩ Protocob.A.I, vi sinh vật vùng rễ cây được phân thành 3 nhóm chính sau:

a) Vi sinh vật bề mặt rễ: nhóm này có thành phần và số lượng đồng nhất, nhiều nhất, có thể chiếm tới 65 – 70% tổng số vi sinh vật vùng rễ cây.

b) Vi sinh vật sát rễ: nhóm này có thành phần và số lượng ít hơn vi sinh vật bề mặt rễ, có thể chiếm khoảng 15 – 25% tổng số vi sinh vật vùng rễ cây.

c) Vi sinh vật xa rễ: nhóm này có thành phần và số lượng ít nhất, có thể chỉ chiếm tới 5 – 10% tổng số vi sinh vật vùng rễ cây.

BẢNG 7.1. TỶ LỆ VI SINH VẬT VÙNG RỄ CÂY TRỒNG KHÁC NHAU
(PROTOCOL.A.I, 1982)
(CFU/1g đất khô)

Loại cây	Bề mặt rễ (0 - 1 cm)	Sát rễ (1 - 5cm)	Xa rễ (5 - 20cm)	Ngoài vùng rễ (> 20cm)
Yến mạch	$9,2 \cdot 10^9$	$3 \cdot 10^7$	$6 \cdot 10^6$	$1,5 \cdot 10^6$
Thuốc lá	$3,6 \cdot 10^{10}$	$1,2 \cdot 10^8$	$5,6 \cdot 10^7$	$1,8 \cdot 10^7$

BẢNG 7.2. THÀNH PHẦN VÀ SỐ LƯỢNG VI SINH VẬT VÙNG RỄ CÂY
(PROTOCOL.A.I, 1982)

Cây non		Cây già	
Vi sinh vật	Tỷ lệ (%)	Vi sinh vật	Tỷ lệ (%)
<i>Pseudomonas</i>	40	<i>Pseudomonas</i>	15
<i>Mycobacterium</i>	20	<i>Mycobacterium</i>	10
<i>Chromobacterium</i>	10	<i>Chromobacterium</i>	5
<i>Micrococcus</i>	8	<i>Micrococcus</i>	3
<i>Mucor</i>	5	<i>Mucor</i>	2
<i>Bacillus</i>	3	<i>Bacillus</i>	30
<i>Asperillus</i>	6	<i>Asperillus</i>	18
Vi sinh vật khác	8	Vi sinh vật khác	17

Theo Viện sĩ Protocob.A.I thì ở giai đoạn cây còn non, những giống vi sinh vật không sinh nha bào chiếm ưu thế. Số liệu ở bảng 7.2 cho thấy: Ở giai đoạn cây còn non, vi khuẩn *Pseudomonas*, *Mycobacterium*, *Chromobacterium* chiếm ưu thế. Ngược lại khi cây già, các loại vi sinh

vật sinh nha bào, các giống có khả năng phân huỷ, chuyển hoá các chất hữu cơ bền vững, như xenlulo, hemixenlulo, lignhin, kitin chiếm ưu thế, như vi khuẩn: *Bacillus*, *Agrobacterium*, *Acetobacter*; nấm: *Asperillus*; xạ khuẩn: *Actinomyces*, *Streptomyces*.

1.2.2. Mối quan hệ giữa vi sinh vật và thực vật

1.2.2.1. Mối quan hệ trực tiếp (quan hệ cộng sinh, quan hệ ký sinh,... Những khái niệm này đã được trình bày trong Giáo trình Vi sinh vật đại cương).

1.2.2.2. Mối quan hệ gián tiếp (quan hệ tương hỗ, quan hệ hội sinh,... Những khái niệm này đã được trình bày trong Giáo trình Vi sinh vật đại cương).

1.2.2.3. Nhóm vi sinh vật hoại sinh: là những vi sinh vật tồn tại và hoạt động trong các cơ chất hữu cơ hay các xác sinh vật đã chết.

1.2.2.4. Nhóm vi sinh vật bán hoại sinh: là những vi sinh vật tồn tại và hoạt động trong các cơ chất hữu cơ hay các cơ thể ký chủ bị bệnh.

1.2.2.5. Nhóm vi sinh vật ký sinh: là những vi sinh vật tồn tại và hoạt động trong cơ thể sinh vật sống, chúng lợi dụng tế bào sống làm nguồn cung cấp dinh dưỡng cho bản thân, loại vi sinh vật này gây bệnh cho ký chủ.

1.2.2.6. Nhóm vi sinh vật bán ký sinh: là những vi sinh vật chủ yếu sống trong các cơ thể sống, nhưng cũng có thể hoạt động được trong các cơ thể sinh vật ốm yếu, hoặc xác của các sinh vật đã chết.

1.2.3. Vi sinh vật trong dinh dưỡng cây trồng

Trong quá trình hình thành, phát triển và biến đổi của đất, vai trò của vi sinh vật rất quan trọng. Chúng tham gia vào việc tổng hợp mùn tạo thành kết cấu của đất, phân giải và chuyển hoá các hợp chất hữu cơ, vô cơ khó tan trong đất để cung cấp chất dinh dưỡng cho thực vật nói chung và cây trồng nói riêng.

Các hợp chất hữu cơ và vô cơ phức tạp trong đất sẽ được chuyển hoá thành các chất đơn giản dưới tác động của quần thể vi sinh vật. Nhiều loại nấm, vi khuẩn, niêm vi khuẩn đã phân giải các hợp chất hữu cơ phức tạp như xenlulo, pectin, lignhin, chất nhựa, sáp, chất béo, thành axit hữu cơ, rượu, đường và cuối cùng thành CO_2 và H_2O . Các sản phẩm được tạo thành là thức ăn cho các nhóm vi sinh vật,

làm cho các chu trình chuyển hoá vật chất trong đất xảy ra mạnh mẽ. Các dạng lân khó tan như apatit, phosphorit, phosphat canxi khó tan được vì sinh vật chuyển hoá trực tiếp hay gián tiếp thành axit phosphoric và các dạng lân dễ tiêu cung cấp cho cây trồng.

Những vi sinh vật cố định nitơ như *Azotobacter*, *Rhizobium*, *Clostridium pasteurianum*, thanh tảo và nấm hàng năm làm giàu cho đất một lượng nitơ mà cây trồng yêu cầu. Hoạt động của quần thể vi sinh vật còn oxy hoá các hợp chất có hại cho cây trồng, biến những chất có hại này thành những sản phẩm khác, hoặc có lợi cho cây trồng.

Vi sinh vật trong quá trình sống của mình còn sản sinh các chất kích thích, các vitamin có lợi cho cây.

Đặc biệt quá trình hô hấp và phân giải hữu cơ của vi sinh vật đã sản sinh ra một khối lượng lớn CO_2 (7 triệu lit/ha/năm) bù đắp lại sự hao hụt CO_2 trong khí quyển, khép kín vòng tuần hoàn cacbon trong tự nhiên, đảm bảo duy trì sự sống trên Trái Đất.

Vi sinh vật có vai trò quan trọng trong việc hình thành và cải thiện kết cấu đất, cải thiện chế độ nước, không khí trong đất, làm cho cây phát triển tốt hơn. Theo Oatxman (1940), các loại nấm *Trichoderma*, *Mucor sartirella* và một số nấm khác có tác dụng rõ trong việc cải thiện kết cấu đất.

a) Vi sinh vật biểu sinh

– Tất cả những vi sinh vật phân bố trên bề mặt thực vật được gọi là vi sinh vật biểu sinh. Chúng phát triển chủ yếu dựa vào các sản phẩm bài tiết của cây và các chất bám trên cây.

Do môi trường nghèo dinh dưỡng và các điều kiện khác không thuận lợi nên quần thể vi sinh vật có số lượng và thành phần kém hơn vi sinh vật vùng rễ. Ở đây gặp nhiều nhất là vi sinh vật *Pseudomonas herbicola sureum*. Chúng có thể chiếm tới 80% tổng số vi sinh vật biểu sinh.

– Khi nuôi cấy trên môi trường nước thường gặp nhất là nấm *Penicillium*, *Fusarium*, *Mucor*. Chúng ta cũng có thể phát hiện trong số vi sinh vật biểu sinh những loại ký sinh và bán ký sinh. Chúng phá hoại tế bào biểu bì, xâm nhập vào cơ thể thực vật và gây ra bệnh hại.

b) Sự tồn tại của vi sinh vật biểu sinh trên cây

Sự tồn tại của vi sinh vật biểu sinh trên cây có quan hệ chặt chẽ với điều kiện khí hậu. Khi thời tiết ẩm, số lượng chúng tăng lên. Ngược

lại trong điều kiện khô hạn, số lượng của chúng giảm xuống. Ở vùng nhiệt đới khí hậu ẩm, trên bề mặt lá có thể phát hiện *Azotobacter*, *Beijerinckia*, nấm men, địa y và cả nguyên sinh động vật.

– Ngoài vi sinh vật ở thân lá và các bộ phận khác trên mặt đất của cây, vi sinh vật còn có nhiều ở trên quả, hạt. Ở những hạt có vỏ cứng hay những hạt được bao bọc trong vỏ quả vững chắc thì ít vi sinh vật. Số lượng vi sinh vật trên hạt còn liên quan đến cách thu hoạch hạt và điều kiện môi trường.

BẢNG 7.3. SỐ LƯỢNG VI SINH VẬT BIỂU SINH TRONG 1g CHẤT KHÔ CỦA LÚA MỸ Ở THỜI KỲ KHÁC NHAU

Bộ phận cây	Trở bông		Chín sữa		Chín hoàn toàn	
	Tổng số	Bông bạc	Tổng số	Bông bạc	Tổng số	Bông bạc
Lá	600	30	19.300	280	55.880	83
Thân	160	10	11.500	150	17.600	53
Bông	300	40	1.300	166	1.700	80
Hạt (đã làm sạch)					1.300	3
Hạt (đập tay)					5.400	20
Hạt (đập bằng máy)					5.350	23

Khi hạt chín hoàn toàn, số lượng vi sinh vật biểu sinh tăng lên mạnh nhưng vi khuẩn có nha bào ít hơn thời kỳ chín sữa.

Hạt cất trữ trong kho cũng chứa nhiều vi sinh vật. Số lượng vi sinh vật thay đổi theo loại hạt, điều kiện cất trữ.

Hạt mạch đen: 1.500.000 VSV/g hạt.

Hạt lúa mì: 1.500.000 VSV/g hạt.

Hạt yến mạch (không còn mày hoa): 700.000 VSV/g hạt.

Hạt lúa nước (không còn mày hoa): 200.000 VSV/g hạt.

Hạt đậu Hà Lan: 40.000 VSV/g hạt.

Hạt ngô: 20.000 VSV/g hạt.

Hạt kê: 20.000 VSV/g hạt.

Những hạt có bề mặt nhám, khả năng tích lũy bụi bẩn và vi sinh vật trên bề mặt hạt nhiều hơn. Nhìn chung hạt của những cây họ hoà

thảo có nhiều vi sinh vật hơn hạt của một số cây lấy dầu và cây họ đậu có bề mặt nhẵn.

Phần lớn vi sinh vật trên hạt và vi khuẩn không có nha bào, thành phần ưu thế là vi khuẩn *Pseudomonas herbicola* sureum.

– Số lượng nấm trên hạt thường biến động trong giới hạn một vài tế bào trên mỗi gam hạt. Trong đó bao gồm các nấm *Mucor*, *Penicillium*, *Aspergillus* và một số nấm khác.

Trên hạt ngô mới thu hoạch gặp nấm *Cladosporium*, *Fusarium*. Khi cất trữ hạt ở trong kho một cách chu đáo thì số lượng vi sinh vật giảm xuống, nhưng khi gặp điều kiện ẩm ướt các tế bào nấm, trong đó có nấm ký sinh (*Helminthosporium*, *Alternaria*,...) tái sinh nhanh chóng. Đây là một trong những nguyên nhân làm giảm khả năng sống của hạt, làm giảm năng suất cây trồng.

– Xạ khuẩn ít gặp trong tập đoàn vi sinh vật trên hạt và thành phần của chúng chưa được chú ý nghiên cứu.

c) Tác động của vi sinh vật biểu sinh đến cây trồng

– Tác động của vi sinh vật biểu sinh đến cây trồng phụ thuộc vào điều kiện ngoại cảnh. Trong giai đoạn đầu, lúc hạt nảy mầm, vi sinh vật biểu sinh bắt đầu sinh sản, chuyển đến rễ và mầm. Gặp lạnh, các loại nấm chịu lạnh phát triển mạnh, trong đó có những nấm ký sinh. Vì vậy độ nảy mầm của hạt giảm xuống một cách rõ rệt. Thí nghiệm của Kraxinhicop cho thấy, xử lý hạt giống ngô cho kết quả lớn nhất, trong điều kiện khí hậu lạnh, vì lúc này cây có tính miễn dịch thấp và có thể bị phá hại ngay với cả những vi sinh vật hoại sinh.

Nhiều thí nghiệm đã xác nhận những cây con trong vườn ươm bị bệnh nặng khi gặp lạnh và trong đất có nhiều vi sinh vật.

– Những chân đất bỏ hoá một vụ, cây ít bị bệnh và khả năng chịu lạnh tốt hơn. Điều này giải thích bằng sự tiêu diệt nấm và một phần vi khuẩn trong những vụ không có cây trồng phát triển.

Trong số vi sinh vật biểu sinh cũng gặp những nấm bán ký sinh. Ví dụ nấm *Alternaria* có khả năng gây bệnh cho cây.

– Trong điều kiện nhất định, vi sinh vật biểu sinh có thể có lợi đối với thực vật. Chúng tạo thành "hàng rào" sinh học ngăn ngừa sự xâm nhập vi sinh vật ký sinh vào mô tế bào. Với khả năng sản sinh mạnh, vi sinh vật biểu sinh có thể tăng hoạt động đối kháng của chúng với vi

sinh vật gây bệnh. Người ta đã quan sát thấy vi sinh vật biểu sinh làm yếu sự phát triển của nấm gây bệnh như *Clototrichum saliyum*, *Alternaria solani*. Nhiều vi sinh vật biểu sinh làm giảm hoạt tính của vi khuẩn *Erwinia amylovorus* gây bệnh cháy râm lá cây ăn quả, nấm *Hypoxylon prurinaturn* gây bệnh ung thư ở cây gỗ và những nấm ký sinh khác.

– Hoạt động của vi sinh vật biểu sinh sản sinh ra trên cây trồng nhiều loại vật chất khác nhau, trong đó có chất kích thích sự nảy mầm của hạt, sinh trưởng của rễ và làm cho năng suất cây trồng tăng lên. Vozomakovakaia khảo sát 525 khuẩn lạc cho thấy khoảng 15% có khả năng kích thích sinh trưởng cây trồng.

Tác dụng của vi sinh vật lên cây trồng phụ thuộc vào khả năng sản xuất ra vitamin và chất heteroauxin của chúng. Trong số 35 loại vi khuẩn có khả năng kích thích sinh trưởng của cây trồng mà tác giả khảo sát, có 20 loại tổng hợp được thiamin, 19 loại tổng hợp được pirodixin, 18 loại tổng hợp được axit nicotinic, 18 loại tổng hợp được biotin, 20 loại tổng hợp được axitpentotinic, 10 loại tổng hợp được vitamin B12. Tất cả các loại vitamin trên đều thuộc nhóm B. Đặc biệt vi khuẩn *Pseudomonas liquefaciens* tổng hợp được rất nhiều vitamin B12.

1.2.4. Rễ nấm và ảnh hưởng của chúng đến thực vật

Giữa vi sinh vật và cây trồng có một số trường hợp sống cộng sinh như: rễ nấm và vi khuẩn nốt sần cây họ đậu. Về sự cộng sinh giữa vi khuẩn nốt sần trên cây họ đậu được trình bày trong chương “Vi sinh vật và tuần hoàn”. Ở phần này chúng ta nghiên cứu riêng về rễ nấm.

Rễ nấm là một danh từ chỉ sự cộng sinh giữa nấm và rễ cây. Hiện tượng này rất phổ biến trong tự nhiên. Đại bộ phận cây gỗ và cây hoà thảo mọc trên cạn ở vùng ôn đới và nhiệt đới có quan hệ cộng sinh với các loại nấm khác nhau. Ở vùng khí hậu lạnh, nhiều loại cây không hình thành rễ nấm, hoặc cấu trúc rễ nấm không điển hình. Tất cả những cây mọc ở dưới nước không thấy hình thành rễ nấm.

1.2.4.1. Rễ nấm ngoại sinh

Căn cứ vào hình thái mối quan hệ cộng sinh, chúng ta có thể chia rễ nấm ra hai loại: Rễ nấm ngoại sinh và rễ nấm nội sinh. Rễ nấm ngoại sinh phân bố rộng rãi, đặc biệt là ở những cây gỗ. Rễ nấm phân chia tạo thành những mấu lồi, phân nhánh hình san hô bao phủ dày

đặc xung quanh bề mặt rễ cây. Những mấu lồi đó có thể màu trắng, màu nâu hay màu đen, bề mặt có thể nhẵn hay có các sợi cắm vào đất. Các sợi nấm ngoại sinh chỉ sống trong thời gian ngắn, phát triển mạnh trong vụ xuân hè và sau đó tàn lụi dần. Nếu gặp điều kiện thuận lợi chúng tái sinh phát nhanh chóng. Màng nấm dày bao phủ phần non của rễ và lông hút. Lông hút bị biến mất dần và lúc bấy giờ chức năng hút nước và chất dinh dưỡng từ đất lên là nhờ vào hệ sợi nấm.

1.2.4.2. Rễ nấm nội sinh

Rễ nấm nội sinh ăn sâu vào trong tế bào nhu mô và tế bào biểu bì của rễ. Tuy vậy một số sợi nấm phân nhánh, hình thành mấu lồi, có thể đâm sâu vào đất. Trong tế bào rễ, rễ nấm nội sinh phân chia, tạo thành những túi dự trữ thức ăn và có trường hợp tạo nốt sần.

Trên rễ cây có rễ nấm nội sinh, lông hút vẫn tồn tại bình thường và trong nội bì có số lượng lớn tế bào thẩm thấu nên khả năng hút dinh dưỡng của cây khá mạnh. Rễ nấm nội sinh là một hiện tượng có tính chất đặc trưng của cây hoà thảo. Ngoài ra, có những loại rễ nấm trung gian. Chúng mang cả đặc tính của rễ nấm ngoại sinh và nội sinh. Trong những trường hợp này, nấm và rễ cây không có mối quan hệ cộng sinh chặt chẽ. Tất cả những cây có rễ nấm cộng sinh có khả năng đồng hoá dinh dưỡng tốt hơn, sự phát triển bộ rễ cũng như phần cây trên mặt đất được tăng cường. Tuy vậy, mức độ quan hệ của thực vật thượng đẳng và rễ nấm khác nhau, có thể chia thành 3 loại:

a) Những cây cộng sinh bắt buộc, chúng không phát triển khi không tạo thành rễ nấm. Loại cây này không nhiều lắm. Ví dụ cây *Monotrophypotitos* và cây họ lan *Orchidaceae*.

b) Những cây rễ nấm có tác dụng kích thích sự sinh trưởng, phát triển của chúng. Thuộc nhóm này có các cây bộ tùng bách, cây sồi.

c) Những cây phát triển không cần rễ nấm. Trong nhóm này bao gồm những cây mọc dưới nước và cây bụi (cây nguyệt quế đại, cây vẹ mao,...).

Sự hình thành rễ nấm ở cây gỗ và đặc biệt là cây hoà thảo chưa được nghiên cứu đầy đủ. Người ta cũng đã phát hiện được nhiều loại nấm cộng sinh như nấm *Phycomycetes*, *Ascpaucetes* và *Basidiomycetes*. Rễ nấm ở một số cây cũng có thể được tạo thành bằng nhiều loại nấm khác nhau. Và ngược lại từ một số loại nấm nhất định có thể tạo thành

rễ nấm ở các cây khác nhau. Tuy vậy cũng có một số loại nấm cộng sinh chuyên tính, nghĩa là chỉ hình thành rễ nấm ở một loại cây hay một nhóm cây nhất định. Hiện tượng này thấy rõ ở thành phần nấm *Basidiomycetes* trong rừng. Chúng bao gồm nhiều loại khác nhau tương ứng với các loại cây gỗ có rễ nấm.

1.2.4.3. Điều kiện ngoại cảnh đến nấm rễ

Quá trình hình thành rễ nấm chịu sự chi phối của điều kiện ngoại cảnh. Tất cả những điều kiện có lợi cho sự phát triển của thực vật thì nói chung thích hợp cho việc tạo thành rễ nấm.

- Các loại phân tử hữu cơ hoặc vô cơ có tác dụng kích thích việc hình thành rễ nấm. Cường độ ánh sáng kích thích quá trình hình thành rễ nấm. Giảm cường độ ánh sáng thì sự xâm nhập của nấm bị cản trở.

- Hàm lượng đường gluco dễ tan của rễ là nhân tố quan trọng điều hoà tự nhiên hình thành rễ nấm. Khả năng xâm nhập của nấm phụ thuộc vào sự có mặt trong rễ cây một lượng đường hoà tan dư thừa. Do đó nhân tố ảnh hưởng đến sự chuyển hoá cacbon của cây chủ như ánh sáng, hàm lượng thức ăn dễ tiêu, đặc biệt là N, P có tác động gián tiếp đến sự xâm nhiễm. Hàm lượng vitamin trong đất, phản ứng của môi trường cũng có ảnh hưởng đến sự phân bố và tạo thành rễ nấm.

- Bản thân nấm cũng tiết ra các hợp chất như axit indon – axetic, axit indon–propionic, axit indon–butyric có ảnh hưởng tốt đến sự tạo thành rễ nấm ở nồng độ thấp và ảnh hưởng ngược lại khi ở nồng độ cao.

Rễ nấm có ý nghĩa đối với quá trình sinh trưởng, phát triển của thực vật. Hệ rễ nấm bao xung quanh rễ cây làm tăng thêm bề mặt hoạt động của bộ rễ. Nhờ vậy hệ thống rễ của thực vật hút nước và chất dinh dưỡng thuận lợi hơn. Thí nghiệm dùng nguyên tố phóng xạ P^{32} đã phát hiện thấy ở những loài cây có rễ nấm có khả năng đồng hoá lân nhanh hơn và mạnh hơn cây không có rễ nấm. Đồng thời hoạt động của bộ rễ giúp cây chịu hạn tốt hơn. Nhiều hợp chất hữu cơ có thể được khoáng hoá bởi hệ rễ nấm. Một số loại nấm còn khoáng hoá mùn cung cấp chất dinh dưỡng cho cây. Rễ nấm có khả năng tổng hợp được nhiều loại vitamin và chất sinh trưởng, có tác dụng xúc tiến quá trình sinh trưởng của thực vật. Tuyệt đại bộ phận rễ nấm không có khả năng cố định nitơ phân tử, trừ nấm *Phormotium* cộng sinh với cây *Vesca* và một số loại nấm cộng sinh ở cây thông là có khả năng đồng hoá nitơ khí quyển.

– Sự tạo thành rễ nấm chỉ có khả năng thực hiện khi ở đất có những loại nấm tương ứng. Nhưng trong một số trường hợp, ví dụ: rừng thảo nguyên không có hoặc ít có loại nấm cộng sinh với cây gỗ nên biện pháp chăm bón hợp lý, hoặc bón vào đất những loại nấm có ích là cần thiết.

1.3. MỐI QUAN HỆ HỮU CƠ GIỮA ĐẤT VÀ CÂY TRỒNG (BÀI CA TÌNH CÂY VÀ ĐẤT)

1.3.1. Đất không có cây

Cây có vai trò rất lớn trong việc bảo vệ đất, chống xói mòn, rửa trôi, chống bạc màu hoá, làm cho đất tơi xốp, giữ ẩm cho đất. Mỗi năm cây để lại cho đất lượng hữu cơ rất lớn từ bộ rễ và thân lá cây. Đất không có cây coi như là đất chết.

1.3.2. Cây không có đất

Cũng như vi sinh vật, cây không có đất thì không thể tồn tại được. Đất có đầy đủ những điều kiện để cho cây sinh trưởng và phát triển. Cũng cần nói thêm rằng, đã có những đề tài nghiên cứu trồng cây trong dung dịch, hoặc trồng cây không đất. Những đề tài đó chỉ đi đến kết quả nghiên cứu cơ bản để xây dựng thang chuẩn cho dinh dưỡng cây trồng ngoài thực địa, chứ không thể nuôi sống cả loài người với những nông sản ít ỏi như một số kết luận không mang tính thực tiễn toàn cầu.

II- ẢNH HƯỞNG CỦA BIỆN PHÁP CANH TÁC ĐẾN VI SINH VẬT ĐẤT

– Khu hệ vi sinh vật đất phong phú và phức tạp, có những đặc điểm và sinh thái rất khác nhau. Chúng bao gồm vi khuẩn, xạ khuẩn, nấm, tảo, nguyên sinh động vật. Riêng về vi khuẩn đã rất phong phú. Chúng bao gồm vi khuẩn hiếu khí, kỵ khí, vi khuẩn tự dưỡng, vi khuẩn dị dưỡng, vi khuẩn dị dưỡng cacbon, vi khuẩn cố định N_2 ,... Vi sinh vật sống thành quần thể, giữa loại này và loại khác có tác động qua lại lẫn nhau. Theo tài liệu của Kraxinhicop N.A thì trong một gam đất có khoảng một trăm triệu vi khuẩn, mười vạn tế bào tảo và động vật nguyên sinh. Số lượng và kết cấu của khu hệ này thường xuyên biến đổi theo loại đất, khu vực địa lý tầng đất, thời vụ, chế độ canh tác,...

– Vi sinh vật có mặt trong tất cả các loại đất nhưng ở những chân đất có đầy đủ chất dinh dưỡng có kết cấu thành phần cơ giới tốt, có độ

ấm và môi trường thích hợp thì vi sinh vật phát triển nhiều và phong phú về thành phần. Trên những chân đất nghèo chất dinh dưỡng, chua, mặn, nhiều chất độc, hoặc trên những chân đất khô hạn, lầy thụt, sự phát triển của vi sinh vật bị hạn chế rõ rệt và tạo thành một khu hệ vi sinh vật đặc biệt.

Điều kiện bất lợi và sự bất lợi ấy kéo dài sẽ hình thành ở đấy các loại hình vi sinh vật thích ứng như vi sinh vật chịu mặn, vi sinh vật chịu chua, vi sinh vật có khả năng phát triển trong môi trường nhiều những chất độc hại,...

– Có thể nói, số lượng và thành phần vi sinh vật phản ánh độ phì nhiêu của đất và có quan hệ mật thiết với sự sinh trưởng, phát triển của cây trồng. Vì vậy, khi đánh giá độ phì nhiêu của đất phải kết hợp đánh giá về tính chất lý, hoá học và sinh vật học của đất. Nếu chỉ nhấn mạnh về mặt hàm lượng các chất dinh dưỡng trong đất thì sẽ khó giải thích tại sao trên các chân đất lầy thụt, chiêm trũng, giàu chất hữu cơ, tỷ lệ mùn, lân khá cao mà cây trồng vẫn phát triển kém, năng suất thấp. Ở đây tình trạng kỵ khí đã kìm hãm sự hoạt động của các vi sinh vật hảo khí, tích lũy nhiều chất có hại cho cây trồng. Các kết quả điều tra ở nước ta cho thấy, vùng đồng bằng do tác động trồng trọt lâu đời của con người nên số lượng vi sinh vật trong đất thường lớn hơn nhiều so với đất miền núi và trung du. Trên những đồi gò, cây cối bị tàn phá, tình trạng rửa trôi, xói mòn mạnh đã gây ảnh hưởng xấu đến vi sinh vật, số lượng của chúng trong đất ít.

– Quần thể vi sinh vật đất thường tập trung nhiều ở tầng canh tác, nơi tập trung nhiều rễ cây, được bổ sung nhiều chất dinh dưỡng và có chế độ nhiệt, chế độ không khí thích hợp cho vi sinh vật phát triển. Các loại vi sinh vật hảo khí giảm xuống theo chiều sâu tầng đất. Còn vi khuẩn yếm khí phát triển mạnh ở tầng đất sâu 40 – 60cm. Và trong điều kiện đất thoát nước mạnh, giàu chất dinh dưỡng như đất, đá Mộc Châu, đất macgalit Hòn Én thì độ sâu 100cm vi sinh vật vẫn phát triển mạnh.

– Thời tiết, khí hậu cũng chi phối rất mạnh quần thể vi sinh vật đất. Những tháng nóng ẩm có mưa rào, mưa phùn, cây cối phát triển tốt cũng là thời gian vi sinh vật sinh trưởng và phát triển mạnh. Những tháng khô hạn, nhiệt độ thấp hay tháng nóng hạn, cây cối phát triển kém có ảnh hưởng không tốt đến vi sinh vật. Ở điều kiện

nước ta vào những tháng cuối xuân đầu hè và những tháng mùa thu, số lượng vi sinh vật đất tăng. Tháng giêng, hai, trời quá rét, hanh khô làm giảm số lượng vi sinh vật. Trên các đồi trọc về mùa hè nắng gắt, các tia sáng mặt trời tiêu diệt nhiều vi sinh vật lớp đất mặt.

– Nói chung đặc điểm khí hậu nhiệt đới nóng ẩm của nước ta không những làm cho cây trồng và động vật phát triển mạnh mà còn làm vi sinh vật cũng sinh sôi nảy nở nhanh chóng, hoạt động mạnh. Các quá trình khoáng hoá hữu cơ phân huỷ các chất khoáng xảy ra nhanh chóng. Nhờ đó có thể rút ngắn được thời gian ủ phân, phân giải rơm rạ, phân giải phân xanh; đồng thời nếu bón phân với liều lượng cao, các sản phẩm độc hại ít để lại trong đất. Nhưng quá trình khoáng hoá mạnh đã dẫn đến tỷ lệ mùn trong đất thấp, hiện tượng rửa trôi, xói mòn xảy ra mạnh.

– Vi sinh vật đất, đặc biệt là vi sinh vật vùng rễ có mối quan hệ mật thiết với cây trồng. Quy luật chung là số lượng vi sinh vật đạt đến cực đại lúc cây có hoạt động sinh lý mạnh nhất. Thời kỳ cây ra hoa, bộ rễ hoạt động mạnh tiết ra nhiều chất dinh dưỡng đã có tác dụng kích thích vi sinh vật phát triển. Trong ruộng lúa, vi sinh vật tổng số tăng lên khi lúa đẻ nhánh đến làm đồng và sau đó giảm xuống. Thời kỳ lúa chín, số lượng vi sinh vật trong đất ít nhất.

– Tuy nhiên động thái diễn biến về số lượng giữa các nhóm vi sinh vật khác nhau không giống nhau. Vi khuẩn kỵ khí tăng lên theo thời gian ngập nước, đạt cực đại lúc lúa trở bông. Trái lại vi khuẩn hiếu khí tăng ngay từ đầu và về sau giảm. Xạ khuẩn có mức độ thay đổi ít hơn trong quá trình sinh trưởng và phát triển của lúa.

– Vùng rễ những cây họ đậu có khả năng thu hút nhiều loại vi khuẩn nốt sần, vi khuẩn khoáng hoá lân, vi khuẩn cố định N_2 . Những cây nhiều rễ con hay rễ chùm thu hút nhiều loại nấm hoại sinh, vi khuẩn phân giải xenlulo, vi khuẩn phân giải nitrat hoá.

– Điều kiện địa hình, khu vực địa lý cũng ảnh hưởng không nhỏ đối với vi sinh vật đất. Những chân đất dốc, đồi gò, vi sinh vật tăng lên ở phía dưới sườn dốc. Mức độ chênh lệch này tương quan với mức độ rửa trôi, xói mòn của đất.

– Điều kiện tự nhiên của các vùng có đặc điểm sinh thái, địa lý khác nhau đã hình thành nên những khu hệ vi sinh vật thích ứng với các vùng đó như vi sinh vật ưa lạnh, vi sinh vật ưa ẩm, vi sinh vật ưa

nóng. Ngay trong một vùng địa lý, số lượng và thành phần vi sinh vật thay đổi rõ rệt tùy theo từng loại đất, tùy theo kinh độ, vĩ độ, sườn dốc phía đông, phía tây. Có thể nói là, điều kiện sinh thái thích hợp với cây trồng thì cũng thích hợp với sự phát triển của vi sinh vật đất.

– Sự tác động của con người thông qua việc khai phá đất đai, thâm canh tăng năng suất cây trồng chỉ phối rất mạnh đối với khu hệ vi sinh vật đất. Việc cày bừa, xới xáo đất, bón phân, làm ải, tưới tiêu hợp lý đã xúc tiến mạnh mẽ sự phát triển của vi sinh vật, làm tăng độ phì nhiêu của đất và tăng năng suất cây trồng.

2.1. ẢNH HƯỞNG CỦA PHƯƠNG THỨC LÀM ĐẤT ĐẾN VI SINH VẬT ĐẤT

Phương thức làm đất tùy thuộc vào điều kiện tự nhiên, kinh tế xã hội, tiểu vùng sinh thái, loại đất, địa hình,... mà có các phương thức làm đất thích hợp cho mỗi quốc gia, mỗi vùng, mỗi địa phương khác nhau.

Tùy từng biện pháp làm đất khác nhau mà có những ảnh hưởng tới vi sinh vật đất khác nhau.

Thí nghiệm của Mixustin và Niacop theo 4 phương thức làm đất sau:

- 1) Xới lớp đất mặt 0 – 5cm.
- 2) Xới lớp đất canh tác (0 – 20cm) nhưng không xáo trộn.
- 3) Xới lớp đất canh tác (0 – 20cm) có xáo trộn.
- 4) Cày sâu 30cm không xáo trộn.

BẢNG 7.4. ẢNH HƯỞNG CỦA PHƯƠNG THỨC LÀM ĐẤT KHÁC NHAU ĐẾN VI SINH VẬT

(Mixustin và Niacop, 1978)

Chỉ tiêu	Phương thức làm đất			
	1	2	3	4
Số lượng VKTSHK (%)	100	118,3	171,6	125,2
Số lượng VKTSYK (%)	100	103,0	100,7	111,2
Số lượng vi khuẩn amôn hoá (%)	100	122,1	186,5	143,9
Số lượng vi khuẩn hoại sinh (%)	100	113,2	161,1	150,2
Cường độ NO_3^- (%)	100	109,4	105,2	124,5
Cường độ phát triển xenlulo (%)	100	130,3	235,2	169,7
Năng suất cây trồng (tạ/ha)	11,9	17,8	32,6	20,2

(VKTSHK: Vi khuẩn tổng số hảo khí; VKTSYK: Vi khuẩn tổng số yếm khí)

BẢNG 7.5. ẢNH HƯỞNG CỦA ĐỘ CÀNG SÂU ĐẾN SỐ LƯỢNG VI SINH VẬT(x 10³ TB/g đất, Mixustin, 1978)

Độ sâu	Hào khí và yếm khí tùy tiện	Yếm khí	Xạ khuẩn	Nấm	VK nitrat hoá
<i>Cày sâu bình thường 27cm</i>					
0 – 10	3.832	1.220	179	50	1.000
10 – 20	3.680	1.460	130	62	1.100
20 – 27	2.330	1.870	127	26	560
30 – 40	875	190	112	11	421
40 – 50	303	142	70	2	100
<i>Cày sâu 50 cm không xáo trộn</i>					
0 – 10	3.375	1.340	142	45	860
10 – 20	3.163	1.950	105	53	930
20 – 30	1.860	1.700	60	26	865
30 – 40	612	1.100	31	21	540
40 – 50	279	185	15	7	142

– Sau khi làm đất 30 ngày, lấy mẫu phân tích vi sinh vật theo phương pháp thạch bằng. Kết quả phân tích cho thấy rằng: Xới lớp đất mặt chỉ tăng cường phát triển vi sinh vật ở lớp đất 0,5cm. Tổng số vi sinh vật hoại sinh ở lớp đất này nhiều gấp 3 – 4 lần so với lớp đất khác. Xới lớp đất cày không lật mặc dù có động viên được khu hệ sinh vật, song sự hoạt động của chúng tăng lên không đáng kể. Trái lại xới đất có lật, hoặc cày sâu 20cm tăng cường rõ rệt số lượng và hoạt tính của sinh vật ở tầng mặt cũng như tầng sâu. Cường độ quá trình sinh học trong đất được tăng cường đặc biệt là quá trình nitrat hoá. Nếu tính cường độ nitrat hoá ở lớp đất canh tác chỉ có xới trên mặt là 100% thì lớp đất xới không lật 102,4%, còn lớp đất xới có lật đạt tới 158,9% (bảng 7.4; 7.5).

Những số liệu này chỉ rõ hiệu quả của việc xáo trộn đất đã làm tăng quá trình khoáng hoá chất hữu cơ tích lũy ở các tầng sâu, giải phóng nhiều chất dinh dưỡng cung cấp cho cây trồng sinh trưởng, phát triển tốt, cho năng suất cao.

– Cày bừa xới xáo đất có ý nghĩa tăng cường điện thế oxy hoá khử, xúc tiến quá trình oxy hoá, hạn chế quá trình khử oxy, làm giảm độ chua và chất độc trong đất, tạo điều kiện thích hợp cho sự phát triển của vi khuẩn hảo khí, xạ khuẩn, nấm. Tuy nhiên ở những chân

đất bí chặt, ngập nước, tác dụng của việc làm đất đến các quá trình sinh học ở trong đất mạnh hơn các chân đất khác. Một số trường hợp đặc biệt như đất cát nhẹ bị khô hạn, có thể làm giảm số lượng vi sinh vật (xói xáo đất không hợp lý trong mùa hanh khô), hoặc đất đồi núi dốc dễ xói mòn, phá huỷ đất, cũng có thể làm giảm vi sinh vật (khi cây bừa, xói xáo đất trong mùa mưa).

– Trong công tác làm đất cần đặc biệt chú ý cây sâu hợp lý đối với từng loại đất và đồng thời ứng dụng việc cây sâu với tăng cường phân bón. Qua theo dõi việc làm đất ở vùng đồng bằng (đất phù sa sông Hồng trung tính ở Gia Lâm, Hà Nội) và đất đỏ (đất phù sa ở Ba Vì, Hà Tây) của bộ môn Vi sinh vật Trường Đại học Nông nghiệp I cho thấy: ở đất phù sa sông Hồng, cây sâu có tác động làm tăng tổng số vi sinh vật từ 10 đến 50% so với đất chỉ cuốc xới trên mặt đất; còn đất đồi gò trung du cây sâu 15 – 20cm chỉ làm tăng số lượng vi sinh vật trong trường hợp bón thêm phân hữu cơ và phân khoáng. Trên đồi trồng dứa, cuốc xới đất vào mùa mưa làm giảm số lượng vi sinh vật hơn 30% so với công thức không cuốc xới đất.

– Trên những chân đất chua, chua mặn, gầy hoặc đất có kết vón đá ong, tầng đất mỏng, cây sâu để làm giảm số lượng vi sinh vật có ích, ảnh hưởng không tốt đến độ phì của đất và năng suất cây trồng. Làm đất phải kèm theo phân bón, thuỷ lợi, cải tạo đất, chống xói mòn thì có thể phát huy hiệu quả nhiều đối với sự sinh trưởng, phát triển của cây trồng và khu vệ sinh vật đất.

BẢNG 7.6. ẢNH HƯỞNG CỦA CÂY SÂU ĐẾN VI SINH VẬT ĐẤT

(x 10^3 TB/1g đất. DHNNI, 1976)

Cày độ sâu	25cm	50cm
VK tổng số	179	263
Nấm tổng số	33,8	38,6
Xạ khuẩn tổng số	7,1	6,2
VK phân giải xenlulo	1,0	6,8

Khi cày ở độ sâu 50cm thì lượng vi khuẩn tổng số tăng 1,5 lần so với cày nông 25cm. Nấm tổng số cũng tăng lên 6,8 lần.

Tóm lại: Phương thức làm đất phụ thuộc nhiều vào điều kiện tự nhiên, kinh tế xã hội, thậm chí phụ thuộc vào tiểu vùng khác nhau

(loại đất, thành phần cơ giới đất, địa hình, trình độ canh tác, trình độ dân trí, điều kiện kinh tế,...) mà khác nhau. Không thể áp dụng máy móc là dùng phương thức làm đất tối ưu ở vùng này hay quốc gia này áp dụng cho vùng kia, hoặc quốc gia kia.

Đất vùng bán sơn địa, trung du miền núi, hay đất glây hoá mạnh, hoặc feralit hoá mạnh phải có phương thức làm đất riêng cho từng loại. Thậm chí còn phụ thuộc vào cả cơ cấu cây trồng, thời vụ gieo trồng,....

2.2. ẢNH HƯỞNG CỦA LUÂN CANH ĐẾN VI SINH VẬT ĐẤT

Quan hệ giữa vi sinh vật đất và cây trồng là mối quan hệ tương hỗ, có tác động qua lại lẫn nhau. Mỗi loại cây trồng có số lượng và thành phần vi sinh vật vùng rễ nhất định. Vì vậy thay đổi cây trồng, *thay đổi chế độ luân canh* sẽ dẫn đến sự thay đổi quần thể vi sinh vật.

– Trên đất có trồng cây họ đậu gặp nhiều vi khuẩn nốt sần *Rhizobium*, vi khuẩn phân giải lân. Đất trồng chè có số lượng nấm, nhất là nấm rễ phát triển mạnh nhưng vi khuẩn hảo khí và xạ khuẩn bị hạn chế. Đất trồng các loại rau màu, mức độ thâm canh cao và khối lượng chất hữu cơ bổ sung cho đất nhiều nên các loại vi khuẩn hoại sinh phát triển mạnh, tổng số vi sinh vật trong đất rất lớn. Trong đất lúa nước, vi khuẩn yếm khí đạt số lượng lớn và có vai trò quan trọng trong quá trình chuyển hoá vật chất hữu cơ và vô cơ. Ở đây vi khuẩn amôn hoá, vi khuẩn nitrat, các loại rong tảo, nguyên sinh động vật có số lượng lớn hơn so với đất trồng cạn.

– Sự phân bố vi sinh vật có tính chất đặc trưng cho từng loại cây trồng là cơ sở khoa học để bố trí luân canh cây trồng một cách thích hợp, vừa đạt được yêu cầu tăng năng suất các cây trồng trong chu kỳ luân canh, vừa có tác động tăng cường độ phì của đất và hạn chế tác hại của sâu, bệnh.

– Một vấn đề có tính phổ biến ở vùng đồng bằng là đất đai thường được sử dụng theo ba hình thức: chuyên trồng màu, chuyên trồng lúa và luân canh lúa, màu. Do tính chất canh tác khác nhau đã làm thay đổi một cách sâu sắc lý, hoá tính đất và chế độ nước, chế độ không khí, chế độ nhiệt,... dẫn đến sự thay đổi lớn quần thể vi sinh vật đất. Những chân đất chuyên trồng lúa, vi khuẩn yếm khí và vi khuẩn amôn hoá phát triển mạnh. Trái lại vi khuẩn hảo khí, nấm, xạ khuẩn, vi khuẩn nitrat hoá phát triển tương đối mạnh, còn vi khuẩn amôn hoá và vi khuẩn phản NO_2^- phát triển yếu. Tính chất ưu việt

của luân canh lúa, màu thể hiện rất rõ. Ở hầu hết các loại luân canh, vi sinh vật phát triển mạnh hơn ở hai loại đất chuyên canh nói trên và do đó tổng số vi sinh vật đạt ở mức lớn nhất.

- Nếu xét tỷ lệ giữa vi khuẩn hảo khí và yếm khí thì ở đất chuyên trồng lúa luôn luôn < 1 , có trường hợp tỷ lệ này $< 0,7$. Trong đất trồng màu, tỷ lệ vi khuẩn hảo khí trên vi khuẩn yếm khí luôn luôn > 1 , nhiều loại đất tỷ lệ này gấp 2 – 5 lần và có trường hợp đạt đến 10 (đất cát), còn trong đất luân canh lúa – màu thì 2 loại hình vi sinh vật hảo khí và yếm khí phát triển cân đối, luôn luôn > 1 . Những loại đất có thành phần cơ giới nhẹ (đất bạc màu, đất ven biển) đối với đất lúa và đất màu có sự chênh lệch rất lớn về vi khuẩn hảo khí, yếm khí và xạ khuẩn. Những chân đất chua, chua mặn, chiêm trũng, lầy thụt có tỷ lệ vi khuẩn hảo khí, yếm khí thường giao động từ 0,5 đến 0,7 lần và hình thức luân canh lúa màu càng thể hiện tính chất ưu việt của nó.

- Ở một số nước, như Liên Xô, các nước châu Âu, có điều kiện đất đai rộng, kinh tế xã hội phát triển, thì thường là kết thúc chu kỳ luân canh là 10 năm. Họ thường sử dụng công thức luân canh như sau:

+ Kiểu luân canh = 3: 7 (3 năm trồng cây họ đậu để cải tạo đất, 7 năm trồng cây lúa mì):

Họ tính được rằng cứ 3 năm trồng cây họ đậu sẽ tích lũy được đầy đủ các hợp chất hữu cơ, các chất dinh dưỡng trong đất để cung cấp cho 7 năm trồng lúa mì, không cần hoặc có đầu tư phân bón cho lúa mì trong 7 năm thâm canh là không đáng kể. Đặc biệt kiểu luân canh này có tác dụng rất tốt để giữ cho độ phì của đất ổn định.

+ Kiểu luân canh = 2: 3: 2: 3 (2 năm trồng cây họ đậu, 3 năm trồng cây ngô hạt, 2 năm quay lại trồng cây họ đậu và tiếp sau 3 năm trồng ngô lấy hạt):

Kiểu luân canh này chu kỳ vẫn là 10 năm, nhưng áp dụng cho các loại cây trồng có nhu cầu dinh dưỡng cao.

Như vậy, cũng như biện pháp làm đất, luân canh cũng phụ thuộc nhiều vào điều kiện sinh thái, tiểu vùng khí hậu, địa hình, loại đất, trình độ dân trí, nghĩa là phụ thuộc vào điều kiện tự nhiên, kinh tế, xã hội của mỗi vùng. Mỗi quốc gia khác nhau xây dựng hệ thống luân canh khác nhau, chứ không giống nhau. Phải xem xét rất cụ thể của từng cơ sở sản xuất để xây dựng luân canh sao cho phù hợp nhằm đạt hiệu quả và bền vững.

**BẢNG 7.7. ẢNH HƯỞNG CỦA LOẠI HÌNH SỬ DỤNG ĐẤT
ĐẾN VI SINH VẬT ĐẤT**
(Kết quả của Tropkin, 1968)

Chỉ tiêu	VKTS	Nấm TS	Xạ khuẩn TS	Năng suất (tạ/ha)	Tỷ lệ sâu, bệnh (%)
Nền thâm canh					
Chuyên canh (%)	100	100	100	100	100
Luân canh (%)	143	218	115	119	24,4

Kết quả nghiên cứu của Viện sĩ Tropkin, cho thấy: Nền luân canh, có tác dụng tăng số lượng vi sinh vật đất, tăng năng suất cây trồng và giảm mạnh tỷ lệ sâu, bệnh trong thâm canh.

**BẢNG 7.8. VI SINH VẬT Ở CÁC LOẠI HÌNH SỬ DỤNG ĐẤT
TRÊN ĐẤT ĐỒI NÚI SƠN LA**

(Nguyễn Đường – Nguyễn Xuân Thành. ĐHNLI, 1990)
(x 10³ CFU/g đất khô)

Số TT	Loại hình sử dụng đất	Chuyên lúa (2 vụ lúa)	Chuyên màu (3 vụ màu)	Luân canh (2 vụ màu + 1 vụ lúa)
	Chỉ tiêu			
1	VKTSHK	40140	36280	42650
2	VKTSYK	43190	13570	14320
3	Nấm TS	64	72	61
4	Xạ khuẩn TS	129	141	155
5	VK amôn hoá	845	760	966
6	VK nitrat hoá	468	435	386
7	VK phản nitrat hoá	314	268	287
8	<i>Azotobacter</i>	108	119	153
9	<i>Rhizobium</i>	-	92	105
10	Thành phần cơ giới đất	e	b	b
11	pH _{KCL}	4,8	5,2	5,6
12	OM (%)	3,16	0,74	1,31
13	P ₂ O ₅ (%)	0,130	0,058	0,089
14	K ₂ O (%)	0,187	0,072	0,095
15	P ₂ O ₅ dễ tiêu (mg/100g đất)	8,6	10,3	13,4
16	K ₂ O trao đổi (mg/100g đất)	15,3	18,1	22,5
17	Năng suất quy thóc (tấn/ha)	3,8	4,6	5,2

(VKTSHK: Vi khuẩn tổng số hảo khí; VKTSYK: Vi khuẩn tổng số yếm khí)

Kết quả cho thấy: Ở loại hình sử dụng đất 2 màu + 1 lúa cho số lượng vi sinh vật đất cao hơn ở loại hình sử dụng đất chuyên lúa và chuyên màu. Luân canh còn có tác dụng làm tăng hàm lượng dinh dưỡng tổng số và dễ tiêu trong đất, tăng năng suất cây trồng quy thóc so với ở công thức chuyên canh.

BẢNG 7.9. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VỀ LUÂN CANH TRÊN ĐẤT PHÙ SA SÔNG HỒNG VÀ ĐẤT BẠC MÀU BẮC GIANG

(Nguyễn Đường – Nguyễn Xuân Thành ĐHNH, 1992).

(Đơn vị: 10^6 /g đất)

Công thức Chỉ tiêu theo dõi	Đất chuyên lúa	Đất chuyên màu	Đất lúa - màu
Đất phù sa Gia Lâm			
Vi khuẩn hảo khí	55,04	63,84	68,20
Vi khuẩn yếm khí	59,56	41,36	54,62
Tỷ lệ hảo khí/yếm khí (lần)	0,92	1,54	1,25
Nấm tổng số	0,41	3,15	4,20
Vi khuẩn amôn	55,1	48,75	61,02
Xạ khuẩn	2,30	2,53	4,20
Vi khuẩn NO_3^-	3,80	3,65	3,21
Vi khuẩn phản NO_3^-	7,16	8,50	6,40
Đất bạc màu Hà Bắc			
Vi khuẩn hảo khí	10,88	23,28	33,20
Vi khuẩn yếm khí	13,28	6,6	23,20
Tỷ lệ hảo khí/yếm khí	0,82	5,00	1,43
Nấm tổng số	1,37	5,55	4,50
Xạ khuẩn	2,71	3,80	5,68
Vi khuẩn amôn	10,20	7,10	13,20
Vi khuẩn NO_3^-	1,92	2,74	1,69
Vi khuẩn phản NO_3^-	2,04	1,42	1,65

Kết quả nghiên cứu cho thấy:

– Tùy từng loại hình luân canh hay chuyên canh khác nhau, cho thành phần và số lượng vi sinh vật đất khác nhau.

– Ở nền được luân canh lúa – màu có tác dụng làm tăng số lượng của vi sinh vật hữu ích, giảm số lượng của vi sinh vật có hại.

– Trên đất phù sa sông Hồng ở cùng công thức luân canh hoặc xen canh như nhau, nhưng số lượng vi sinh vật đất luôn luôn cho cao hơn ở trên đất bạc màu Bắc Giang.

BẢNG 7.10. VI SINH VẬT ĐẤT TRONG CÁC LOẠI HÌNH SỬ DỤNG ĐẤT TRÊN ĐẤT PHÙ SA SÔNG HỒNG

(Nguyễn Đường – Nguyễn Xuân Thành, ĐHNHI, 2001)

(x 10³ CFU/g đất khô)

Số TT	Loại hình sử dụng đất Chỉ tiêu	Chuyên lúa (2 vụ lúa)	Chuyên màu (3 vụ màu)	Luân canh (2 vụ màu + 1 vụ lúa)
1	VKTSHK	61.243	74.786	78.560
2	VKTSYK	62.645	68.327	72.125
3	Nấm TS	165	342	386
4	Xạ khuẩn TS	240	215	502
5	VK amôn hoá	968	680	1024
6	VK nitrat hoá	328	465	270
7	VK phản nitrat hoá	202	242	158
8	<i>Azotobacter</i>	690	812	1122
9	<i>Rhizobium</i>	0	348	582
10	Thành phần cơ giới đất	e	d	c
11	pH _{KCl}	6,2	5,8	6,7
12	OM (%)	2,13	1,68	1,85
13	P ₂ O ₅ (%)	0,110	0,086	0,092
14	K ₂ O (%)	0,125	0,098	0,100
15	P ₂ O ₅ dễ tan (mg/100g đất)	15,4	17,3	18,8
16	K ₂ O trao đổi (mg/100g đất)	21,4	22,5	19,6
17	Năng suất quy thóc (tạ/ha)	53,3	68,5	71,6

(VKTSHK: Vi khuẩn tổng số hiếu khí; VKTSYK: Vi khuẩn tổng số yếm khí)

**BẢNG 7.11. VI SINH VẬT Ở CÁC LOẠI HÌNH SỬ DỤNG ĐẤT
TRÊN ĐẤT BẠC MÀU BẮC GIANG**

(Nguyễn Xuân Thành – Ninh Minh Phương, ĐHNHI, 2005)

(x 10³ CFU/g đất khô)

Số TT	Loại hình sử dụng đất Chỉ tiêu	Chuyên lúa (2 vụ lúa)	Chuyên màu (3 vụ màu)	Luân canh (2 vụ màu + 1 vụ lúa)
1	VKTSHK	44500	38650	47890
2	VKTSYK	46580	21700	27802
3	Nấm TS	84	135	186
4	Xạ khuẩn TS	97	94	125
5	VK amôn hoá	654	520	738
6	VK nitrat hoá	364	480	320
7	VK phản nitrat hoá	265	214	208
8	<i>Azotobacter</i>	31	25	42
9	<i>Rhizobium</i>	-	56	68
10	Thành phần cơ giới đất	e	b	b
11	pH _{KCL}	4,6	4,8	5,2
12	OM (%)	2,62	1,04	1,25
13	P ₂ O ₅ (%)	0,120	0,063	0,092
14	K ₂ O (%)	0,132	0,085	0,078
15	P ₂ O ₅ dễ tan (mg/100g đất)	5,8	8,7	12,3
16	K ₂ O trao đổi (mg/100g đất)	17,5	19,5	16,9
17	Năng suất quy thóc (tấn/ha/năm)	9,4	11,6	13,8

(VKTSHK: Vi khuẩn tổng số hảo khí; VKTSYK: Vi khuẩn tổng số yếm khí)

Kết quả nghiên cứu về luân canh của các nhà khoa học trong và ngoài nước cho thấy:

– Tùy từng vùng sinh thái khác nhau, loại đất khác nhau mà xây dựng công thức luân canh sao cho phù hợp và bền vững, nó phụ thuộc vào trình độ khoa học kỹ thuật và điều kiện phát triển kinh tế ở mỗi vùng, mỗi quốc gia khác nhau mà định ra công thức luân canh khác nhau.

– Luân canh còn có tác dụng cải thiện quá trình khoáng hoá và quá trình mùn hoá trong đất, tăng số lượng vi sinh vật hữu ích trong đất, tăng hệ số sử dụng đất và tăng độ phì của đất, giảm tỷ lệ sâu, bệnh dẫn đến tăng năng suất và chất lượng nông sản phẩm.

2.3. ẢNH HƯỞNG CỦA TƯỚI, TIÊU ĐẾN HỆ SINH VẬT ĐẤT

– Đất lúa ngập nước lâu ngày làm cho hoạt động của vi sinh vật phân giải xenlulo và nấm *Basidiomycetes* giảm (Sehacfer, 1966). Đất ngập nước khử mạnh, nhất là đối với nơi vừa ngập nước vừa có nhiều chất hữu cơ dễ lên men như Saccharo, amidon, xenlulo, axit pecric,... thường dẫn đến sự tích lũy các axit hữu cơ. Axit hữu cơ tích lũy đến mức độ nhất định thì dừng lại và chuyển thành những chất khác như C_2H_4 , H_2S (Yamano và Sato 1963).

– Về đạm mà nói thì đất ngập nước, đất ruộng lúa, tảo lam có vai trò quan trọng trong việc cố định đạm. Ở ruộng ngập nước, tảo có khả năng cung cấp 20 – 50kgN/ha. (Subrahmanyam và cộng tác viên, 1964...; Okuda và Yamaguchi, 1955; Watanabe, 1954; De và Mandal, 1956).

Trong điều kiện ngập nước, vi sinh vật cố định N_2 sống tự do thường gặp là *Chlostridium pasteurianum*. Giống *Azotobacter* hoạt động trong điều kiện hảo khí. Trong điều kiện yếm khí nó không hoạt động. Tuy nhiên theo Parker (1954), cũng có một vài loài có khả năng sống và cố định N_2 được trong điều kiện có 4% oxy. Cố định N_2 chủ yếu là do *Cl.pasteurianum*.

– Quá trình amôn hoá hoạt động bình thường trong điều kiện ngập nước của ruộng lúa. NH_4^+ hình thành một phần được cây trồng sử dụng, một phần được tích lũy trong đất. Quá trình amôn hoá tiến hành với mức độ bình thường trong ruộng lúa vì vi sinh vật amôn hoá bao gồm nhiều loại hình: hảo khí, yếm khí và vi hảo khí.

– Quá trình phản NO_3^- được thể hiện ngay khi Eh vẫn còn ở trị số cao, mức độ 350mV (Patrick, 1960) và khi có NO_3^- cùng nhiều hợp chất hữu cơ. Vậy trong điều kiện ngập nước làm thế nào để có NO_3^- . NO_3^- xuất hiện ở giai đoạn xen kẽ giữa nước và mực nước cũ (exonadatron).

– Trong điều kiện ngập ú nước Mn^{4+} chuyển thành Mn^{2+} . Sự khử này được bắt đầu khi Eh thấp hơn Eh của quá trình phản NO_3^- . Và nếu Eh tiếp tục hạ thấp thì xuất hiện quá trình khử Fe^{3+} . Sự khử

$\text{Fe}^{3+} \rightarrow \text{Fe}^{2+}$ được thể hiện rõ khi Eh xuống dưới 0,2V (Taki và Kamura, 1966).

Khi Eh xuống đến giữa khoảng 0 – 200mV thì SO_4^{2-} sẽ bị khử để biến thành H_2S . H_2S độc đối với vi khuẩn cũng như đối với lúa (Vamos, 1959; Vamos & Ando, 1960). Nhưng người ta lại thấy H_2S được kết tủa dưới dạng FeS mà được oxy hoá trở lại nhờ các loại vi sinh vật SO_4^{2-} hoá, nhờ vậy nó giảm bớt được độ độc.

– Đất úng nước được thoát nước, đất bị hạn được tưới nước là biện pháp canh tác có ý nghĩa đối với việc cải tạo lý, hoá tính đất, làm thay đổi chế độ thoáng khí, phản ứng môi trường, điện thế hoá – khử trong đất. Do đó tạo điều kiện thuận lợi cho cây trồng và vi sinh vật phát triển.

– Đại bộ phận các loại vi khuẩn có ích như vi khuẩn cố định N, vi khuẩn nitrat hoá, vi khuẩn amôn hoá ure, vi khuẩn phân giải xenlulo, vi khuẩn phân giải các hợp chất hữu cơ,... phát triển mạnh ở độ ẩm 60 – 80%. Độ ẩm đất quá thấp (<10%), hoặc quá cao (bão hoà) đều không có lợi cho hoạt động của chúng. Rút nước phơi ruộng, làm ải có tác động kích thích nhiều loại vi sinh vật phát triển, cân đối được tỷ lệ giữa vi sinh vật hiếu khí và yếm khí, hạn chế một phần vi khuẩn làm lên men chất hữu cơ gây ra phản ứng chua và tích lũy nhiều chất độc.

Fêdôrop đã so sánh số lượng vi sinh vật ở đất ú nước và đất thoát nước, kết quả cho thấy ở đất thoát nước các loại hình vi sinh vật phát triển mạnh hơn nhiều so với đất đọng nước.

BẢNG 7.12. ẢNH HƯỞNG CỦA TƯỚI TIÊU ĐẾN VI SINH VẬT ĐẤT

(Protocov.A.I. 1982 ($\times 10^3/\text{g}$ đất))

Loại đất	Tổng số vi khuẩn	Cầu khuẩn	Trực khuẩn	<i>Azotobacter</i>
Đất đọng nước	1415,3	1352,3	23,9	3,69
Đất thoát nước	3669,1	1523,7	66,5	7,99

Kết quả của Viện sĩ Protocov.A.I. (1982) cho thấy: Ở chân ruộng được tưới, tiêu chủ động, số lượng vi khuẩn tổng số, cầu khuẩn, trực khuẩn và vi khuẩn *Azotobacter* cho cao hơn nhiều so với ở chân ruộng úng nước.

– Trường hợp đất lầy thụt, chiêm trũng, đất bị gầy mạnh, việc hạ thấp mực nước ngầm có tác động làm tăng số lượng vi khuẩn nitrat, xạ khuẩn, nấm mốc và nhiều loại vi sinh vật hiếu khí khác. Theo kết quả nghiên cứu của các nhà khoa học cho thấy: Chân ruộng trũng úng có mực nước ngầm 30cm, số lượng vi sinh vật đất được tính là 100%; khi hạ mực nước ngầm xuống 60cm, số lượng vi sinh vật đất tăng lên 113% (tăng 13%); khi hạ mực nước ngầm xuống 120cm, số lượng vi sinh vật tăng lên 128% (tăng 28%).

– Ảnh hưởng của chế độ nước trong đất đối với vi sinh vật còn thể hiện rất rõ khi áp dụng phương thức làm ải. Người dân ở nhiều tỉnh Thái Bình, Nam Định, Hà Nam, Hải Dương, Hưng Yên, Thanh Hoá, Hà Tĩnh,... có tập quán làm ải. Đó là biện pháp làm đất tốt. Sau khi cày ải, số lượng vi sinh vật hiếu khí đạt 15% so với làm dầm, vi khuẩn NO_3^- hoá, vi khuẩn phân giải xenlulo, *Azotobacter* tăng lên nhanh chóng, có thể tăng lên hàng chục lần so với làm dầm.

Cày để ải không chỉ cải thiện hệ vi sinh vật hữu ích trong đất, mà còn tăng quá trình khoáng hoá trong đất, khử độ chua của đất, khử các độc tố trong đất (khử CH_4 , H_2S , Al^{3+} , Fe^{2+} , ... Khi cày để ải phải tính sao cho thời gian để ải phải đủ, tránh ải ương, ải xác sẽ không tốt.

BẢNG 7.13. ẢNH HƯỞNG CỦA TƯỚI TIÊU ĐẾN SINH VẬT ĐẤT TRÊN ĐẤT BẠC MÀU HIỆP HOÀ – BẮC GIANG

(Nguyễn Xuân Thành – Ninh Minh Phương, 2005)

Chỉ tiêu theo dõi	Luân canh		3 vụ màu		2 vụ màu + 1 vụ lúa	
	Chế độ tưới		Không chủ động	Chủ động	Không chủ động	Chủ động
Vi khuẩn tổng số hiếu khí (%)			100	217	100	234
Nấm tổng số (%)			100	326	100	351
Xạ khuẩn tổng số (%)			100	183	100	218
Giun (con/ m ²)			12	25	16	37
Hiệu quả kinh tế (triệu đồng/ha/ năm)			18,6	23,7	21,8	28,5

– Kết quả nghiên cứu cho thấy, vai trò của tưới nước trong thâm canh cây trồng và cải thiện hệ sinh vật trong đất bạc màu. Ở loại hình sử dụng đất 3 vụ chuyên màu cho số lượng sinh vật đất thấp hơn

ở loại hình sử dụng đất 2 vụ màu + 1 vụ lúa. Ở công thức được tưới chủ động cho số lượng vi sinh vật tổng số cao hơn nhiều lần so với ở công thức không chủ động tưới.

Ở công thức tưới chủ động cho số lượng giun cao hơn gấp trên 2 lần so với ở công thức không chủ động tưới. Hiệu quả kinh tế của việc tưới tiêu chủ động cho tăng 5,1 triệu đồng/ha/năm ở loại hình sử dụng đất chuyên màu đến 6,7 triệu đồng/ha/năm ở loại hình sử dụng đất lúa màu.

2.4. ẢNH HƯỞNG CỦA PHÂN BÓN ĐẾN HỆ SINH VẬT ĐẤT

Bón các loại phân hữu cơ và vô cơ vào đất sẽ phát huy tác dụng nhanh hay chậm, nhiều hay ít phụ thuộc chủ yếu vào quá trình hoạt động chuyển hoá của vi sinh vật đất. Ngược lại, phân bón có tác dụng tốt tăng cường số lượng và hoạt tính vi sinh vật. Tùy theo loại phân, liều lượng bón và phương pháp bón khác nhau mà ảnh hưởng đến vi sinh vật ở những mức độ khác nhau.

2.4.1. Ảnh hưởng của phân hữu cơ đến vi sinh vật đất

– Các loại phân hữu cơ như phân chuồng, phân xanh, bùn ao, rơm rạ,... là nguồn dinh dưỡng đối với cây trồng và là nhân tố có ảnh hưởng tốt đến thành phần cơ giới, kết cấu, độ ẩm, chế độ nhiệt, chế độ không khí trong đất. Ngoài ra trong phân hữu cơ chứa sẵn một khối lượng rất lớn vi sinh vật (hàng chục tỷ tế bào trong một gam phân). Vì vậy những chân đất được bón phân hữu cơ, số lượng và cường độ hoạt động của nhiều loại vi sinh vật tăng lên một cách đáng kể.

Một số tài liệu của Liên Xô cho biết, đất được bón 50 tấn phân chuồng liên tục nhiều năm, làm tăng tổng số vi sinh vật đất lên hai lần. Phân chuồng làm tăng số lượng của nhiều loại vi khuẩn, nấm, xạ khuẩn, rong tảo và nguyên sinh động vật.

– Nhiều tác giả đã nghiên cứu ảnh hưởng các loại phân hữu cơ khác nhau đến sinh vật. Những thí nghiệm tiến hành năm 1957 tại Viện Thổ nhưỡng và Trường Đại học CacMác đã cho thấy bón phân chuồng, phân xanh làm tăng vi khuẩn nitrat hoá, vi khuẩn xenlulo, vi khuẩn phân giải protein, khuẩn có nha bào, nguyên sinh động vật, Riêng vi khuẩn yếm khí, xạ khuẩn bị ức chế khi sử dụng lượng phân xanh cao.

– Tác động khác đối với vi sinh vật của các phân hữu cơ chủ yếu

phụ thuộc vào tỷ lệ C/N của chúng. Những loại phân hữu cơ có tỷ lệ đạm cao như bèo dậu, cây phân xanh họ đậu, phân chuồng có tác dụng kích thích vi sinh vật phát triển mạnh. Trái lại những phân hữu cơ như rơm rạ, cỏ khô, tỷ lệ chất xơ cao, thời gian đầu có tác dụng ức chế vi sinh vật.

Thí nghiệm trên đất lúa Gia Lâm: Các loại vi sinh vật chuyên tính như *Azotobacter*, vi khuẩn amôn, vi khuẩn phân giải xenlulo đều được tăng từ 10 – 100% khi bón 10 tấn phân chuồng, phân xanh cho 1 ha lúa vụ mùa.

– Khảo sát tác động của phân chuồng, phân xanh: bón 30 tấn/ha ở đất bạc màu Hà Bắc, đất chua mặn Kiến An, đất phù sa chua ở Hải Dương – Hưng Yên, đều thấy vi sinh vật tổng số cũng như nhiều loại hình chuyên tính tăng lên rõ rệt. Riêng xạ khuẩn có trường hợp giảm xuống khi bón phân xanh cho đất chua mặn. Giữa các loại đất khác nhau, phân hữu cơ phát huy tác động nhanh, chậm khác nhau. Ở đất bạc màu, tổng số vi sinh vật cực đại khi bón phân chuồng 15 ngày, bón phân xanh sau 20 ngày. Còn đất chua mặn đạt cực đại chậm hơn 10 – 20 ngày so với đất bạc màu.

BẢNG 7.14. ẢNH HƯỞNG CỦA CÁC LOẠI PHÂN HỮU CƠ ĐẾN VI SINH VẬT ĐẤT (%)

(Thí nghiệm ở đất lúa Gia Lâm – Hà Nội, 1970)

Công thức	Vi sinh vật tổng số		Vi khuẩn hảo khí	Vi khuẩn yếm khí	Nấm	Xạ khuẩn
	Sau bón 30 ngày	Sau bón 20 ngày	Sau bón 30 ngày	Sau bón 30 ngày	Sau bón 30 ngày	Sau bón 30 ngày
Không bón phân	100	100	100	100	100	100
10 tấn phân chuồng/ha	150	130	121	125	350	189
10 tấn bèo hoa dâu/ha	170	180	125	120	405	157
10 tấn rơm rạ/ha	81	112	73	68	138	94

– Phân hữu cơ bón liều lượng khác nhau trong các điều kiện khác nhau sẽ ảnh hưởng đến vi sinh vật và cây trồng khác nhau.

Bón phân cho lúa vụ mùa và vụ chiêm ở đất phù sa sông Hồng chua và trung tính so với đối chứng không bón phân đã làm tăng số lượng vi sinh vật tổng số cũng như từng loại vi sinh vật một cách nhanh chóng. Dùng phân tươi bón cho lúa làm tăng mạnh vi khuẩn

yếm khí, nấm mốc ở giai đoạn đầu, nhưng sau khi bón 50 – 60 ngày, các loại hình vi sinh vật đất được phát triển cân đối.

Các loại phân hữu cơ như bèo dâu, cây phân xanh họ đậu, các loại lá xanh hoang dại đều làm tăng mạnh về số lượng vi sinh vật đất.

2.4.2. Ảnh hưởng của phân vô cơ đến vi sinh vật đất

– Bón phân hoá học một cách hợp lý có ảnh hưởng tốt đến sự phát triển vi sinh vật đất.

Các nguyên tố N, P, K, Ca, vi lượng rất cần thiết đối với vi sinh vật và chúng yêu cầu các nguyên tố theo một tỷ lệ nhất định. Cũng chính vì vậy bón phân phối hợp phân hữu cơ và vô cơ, hay bón cân đối các loại phân vô cơ có tác dụng kích thích sự phát triển của vi sinh vật mạnh hơn bón từng loại riêng rẽ.

**BẢNG 7.15. TÁC DỤNG CỦA BÓN PHỐI HỢP PHÂN N, P, K
ĐỐI VỚI CÁC LOẠI VI SINH VẬT**

(Mixutin, 1956)

Công thức	Vi khuẩn	Nấm	Xạ khuẩn	VK phân giải xenlulo
Không bón phân	100	100	100	100
$P_2O_5 + K_2O$	185	174	145	670
$P_2O_5 + K_2O + N$	210	130	195	840

(Trong đó lượng các chất như sau: P_2O_5 : 60 kg/ha; K_2O : 30kg/ha; N: 30kg/ha).

– Bón phối hợp phân vô cơ với phân chuồng và rơm rạ làm cho các loại hình vi sinh vật có ích như *Azotobacter*, vi khuẩn ôn hoà, nitrat hoá, phân giải xenlulo tăng hơn 3 – 4 lần so với bón phân khoáng đơn thuần. Phân chuồng và rơm rạ còn có tác động hạn chế vi khuẩn phản NO_3^- hoá, do đó hạn chế được sự mất đạm trong lúa.

– Khi trong đất chứa nhiều xác hữu cơ chưa phân giải, hoặc bón khối lượng lớn phân xanh thì tăng cường số lượng phân khoáng có tác động thúc đẩy hoạt động phân giải chất hữu cơ của vi sinh vật, loại trừ được hiện tượng tranh chấp đạm giữa vi sinh vật và cây trồng. Trường hợp đất chua, chua mặn, nghèo dinh dưỡng, nếu sử dụng phân khoáng liều cao một cách liên tục sẽ làm tăng độ chua,

tăng nồng độ muối, phá huỷ kết cấu đất nên số lượng vi sinh vật giảm xuống.

**BẢNG 7.16. ẢNH HƯỞNG CÁC LOẠI PHÂN BÓN
ĐẾN VI SINH VẬT ĐẤT ($10^3/g$ ĐẤT)**

(Mixutin và Fêđô rôp, 1960)

Loại phân	pH sau thí nghiệm	VSV tổng số	Xạ khuẩn	Nấm
Không bón phân	5,5	538	150	3
Bón vôi	6,1	640	360	10
Phân chuồng	5,9	1136	610	16
Vôi + phân chuồng	6,1	1397	650	17

Bón vôi có tác dụng cải thiện lý, hoá tính đất, tăng cường sự hoạt động của vi sinh vật một cách rõ rệt. Trên những đất chua bạc màu, chua mặn, lầy thụt và đất đồi núi bị xói mòn mạnh rất cần thiết bón vôi. Nó tạo điều kiện thuận lợi cho nhiều loại hình vi sinh vật, vi khuẩn cố định N_2 – *Azotobacter*, vi khuẩn nitrat hoá. Xạ khuẩn chỉ có thể phát triển dễ dàng khi đất chua nghèo dinh dưỡng được bón vôi nhiều vụ.

2.4.3. Ảnh hưởng của phân hữu cơ vi sinh vật đến tính chất sinh hoá học đất và năng suất cây trồng

BẢNG 7.17. ẢNH HƯỞNG CỦA CÁC LOẠI PHÂN BÓN KHÁC NHAU ĐẾN TÍNH CHẤT ĐẤT, SINH VẬT ĐẤT VÀ CÂY TRỒNG TRÊN ĐẤT BẠC MÀU HIỆP HOÀ, TỈNH BẮC GIANG

(Nguyễn Xuân Thành – Ninh Minh Phương, 2005)

Chỉ tiêu Công thức TN	pH	Mùn (%)	VKTS (%)	Nấm TS (%)	Xạ khuẩn TS (%)	Giun đất (con/m ²)	Năng suất (tạ/ha)
Đối chứng (không bón)	4,8	1,08	100	100	100	21	26,8
NPK	4,3	1,25	94,5	86,9	102,3	27	45,2
Vôi	6,5	1,13	103,5	78,5	113,1	29	32,1
Hữu cơ (HC)	5,6	1,76	218,6	421,2	146,8	68	39,6
Hữu cơ vi sinh (HCVS)	5,8	1,88	273,8	323,4	187,1	73	40,8
Vôi + HC + 1/2NPK	6,2	2,10	286,2	123,0	243,8	79	48,7
Vôi + HCVS + 1/2 NPK	6,5	2,23	310,5	453,6	285,1	88	50,2

- Phân bón ảnh hưởng rất lớn không chỉ đối với hệ vi sinh vật đất, mà còn có tác dụng cải tạo đất trồng trọt và làm tăng năng suất, chất lượng của cây trồng. Tuy nhiên cần phải xây dựng liều lượng bón và bón phân cân đối cho từng loại đất, từng giống cây trồng khác nhau.

- Nếu chỉ bón phân hoá học sẽ dẫn đến làm chai đất, làm thoái hoá đất, huỷ diệt hệ sinh vật trong đất và ô nhiễm môi trường đất. Trong thế kỷ XXI, để phát triển nông nghiệp hữu cơ, nông nghiệp sinh thái bền vững cần phải bón các loại phân sinh học, như: Phân chuồng, phân xanh và phân hữu cơ vi sinh vật để sản xuất nông nghiệp sạch cho hiệu quả và bền vững.

2.5. ẢNH HƯỞNG CỦA BÓN THUỐC TRỪ SÂU, TRỪ CỎ ĐẾN VI SINH VẬT ĐẤT

Trong những năm gần đây thuốc trừ cỏ dại, sâu bệnh được sử dụng nhiều và đã góp phần quan trọng trong việc bảo vệ cây trồng, đẩy mạnh sản xuất. Nhưng việc sử dụng thuốc hoá học với số lượng nhiều, liên tục đã biểu hiện mặt trái của nó: tiêu diệt nhiều thiên địch, nhiều loại vi sinh vật có ích, tích lũy chất độc trong nông sản,... Bởi vậy việc tìm hiểu về ảnh hưởng của thuốc hoá học đối với vi sinh vật nói chung và vi sinh vật đất nói riêng là cần thiết để có phương pháp sử dụng thuốc hoá học một cách hợp lý, vừa đạt được yêu cầu tiêu diệt cỏ dại, sâu bệnh, vừa để phòng được hậu quả tác hại của nó đối với đất, cây trồng và con người.

2.5.1. Phương pháp nghiên cứu

- Người ta có thể nghiên cứu độ độc của các hoá chất trừ cỏ dại và sâu, bệnh đối với thuốc. Đó là phương pháp dùng để bước đầu đánh giá độ độc, nhưng bất tiện ở chỗ nó chỉ được tiến hành trong những điều kiện hoàn cảnh nhân tạo.

Người ta có thể đo được lượng CO_2 thải ra, lượng NH_4 , NO_3 được hình thành, tỷ lệ xenlulo được phân giải trong đất có thuốc so với đối chứng.

Tuỳ theo phương pháp, tuỳ theo điều kiện nghiên cứu, các kết quả thường không giống nhau. Tuy nhiên với các phương pháp trên, người ta có thể bước đầu hiểu biết, đánh giá được loại thuốc đã hoặc sẽ sử dụng.

Khi một loại thuốc được đưa vào đất, người ta thường chú ý đến nồng độ cơ bản sau:

+ DL_{50} : Đây là nồng độ thuốc cần thiết để giết 50% quần thể vi sinh vật.

+ Nồng độ gây chết hoàn toàn vi sinh vật.

– Về thuốc trừ cỏ, nói chung thường dùng ở nồng độ rất thấp, với nồng độ (một số ppm) mà không gây ảnh hưởng đến vi sinh vật đất. Về thuốc trừ sâu, nồng độ thường dùng cao hơn thuốc trừ cỏ và trong đa số trường hợp vì sử dụng đối với bộ phận của cây trên mặt đất nên nó không gây độc hại đối với vi sinh vật đất.

– Chất sát trùng: Nói chung thường có thể tiêu diệt vi sinh vật và bay hơi. Thường sử dụng CS_2 , formon, bromua, metin, chlopocrin, alcol allytic, hydrocacbua halogic, thiram, captam, dithiocarbamat, thủy ngân hữu cơ.

2.5.2. Tác dụng của thuốc hoá học

Các loại thuốc trừ cỏ, trừ sâu bệnh có ảnh hưởng không giống nhau đối với vi sinh vật đất. Có loại ức chế, có loại kích thích, có loại lúc ban đầu ức chế nhưng sau lại kích thích vi sinh vật.

– Thuốc amonithioxianat, natriasênit, natriborat không có hại đối với vi sinh vật.

– Các loại thuốc amonithioxianat, natrichlorat làm giảm tổng số vi khuẩn, xạ khuẩn, vi khuẩn nitrat hoá nhưng lại kích thích sự phát triển của các loại nấm.

– Thuốc 2,4D nếu phun với nồng độ 1 – 100ppm không ảnh hưởng rõ đến tổng số vi khuẩn, xạ khuẩn, nấm, nguyên sinh động vật. Nhưng ở nồng độ 100ppm vi khuẩn amôn hoá và nitrat bị ức chế và sau 10 – 40 ngày mới được hồi phục. Khi phun với nồng độ 550ppm thì hai loại vi khuẩn này chỉ hồi phục được sau 90 ngày.

Vi khuẩn amôn hoá và vi khuẩn NO_3^- hoá là 2 loại vi khuẩn rất quan trọng đối với độ phì và chất dinh dưỡng đối với cây trồng.

+ Sivarithamparam (1969), Tu (1970); Bollen và Tu (1971), Endro (1982) nhận thấy khi sử dụng thuốc trừ cỏ, các vi sinh vật chịu nhiều tác động khác nhau. Riêng đối với quá trình amôn hoá với liều lượng thuốc trừ cỏ cao hơn thường lệ có lúc ức chế không đáng kể quá trình amôn hoá.

Raghu và Mac Rac (1971), Bollen và Tu (1971), sử dụng lindane, endrin với nồng độ cao hơn bình thường nhiều lần thấy không có ảnh hưởng đến vi sinh vật amôn hoá.

Naumann (1970) sử dụng methylparathion; Sivarithamparam (1970) sử dụng chlorpyrifos; Gupta và cộng sự (1975) sử dụng baygon; Sundaram và cộng sự (1977) sử dụng cacbofuran,... các tác giả đều nhận thấy có kích thích hoặc kích thích chậm đối với vi sinh vật amôn hoá.

+ Đối với vi khuẩn nitrat hoá kết quả thí nghiệm rất khác nhau, khó có thể có kết luận chung.

Chandra (1967) sử dụng diendrin và heptaclo hạn chế quá trình nitrat hoá ở đất sét nặng, đất nhiều mùn và đất cát đều trong 8 tuần. Sau đó độ độc của thuốc trừ sâu không còn nữa, quá trình nitrat tăng lên ở đất sét nặng và đất mùn miền núi. Quá trình ức chế giảm theo thời gian và nhiệt độ ở tất cả các loại đất.

Bardiyar và Gaur (1970) thấy có sự ức chế tạm thời quá trình NO_3^- hoá ở đất cát có mùn ở nồng độ 25ppm hay cao hơn nữa.

Tu (1972) thấy cacbofuran ở nồng độ 1ppm vô hại đối với vi khuẩn nitrat hoá, ở 5ppm thì kích thích.

Thí nghiệm của trường Đại học NNI cho thấy 2,4D phun ba lần, mỗi lần cách nhau 30 ngày với liều lượng 2kg/ha đã ức chế được vi khuẩn hảo khí, yếm khí, nấm, xạ khuẩn, vi khuẩn NO_3^- hoá. Nhưng sau lần phun thứ 3, vi khuẩn hảo khí, xạ khuẩn, *Azotobacter* và vi khuẩn nitrat đã tăng lên gần bằng, hoặc vượt với công thức không phun thuốc.

+ Về hệ men trong đất khi phun thuốc trừ cỏ, thuốc trừ sâu, bệnh cũng có nhiều ảnh hưởng.

Chandrayan và Setthunatthan (1980) sử dụng HCH với liều lượng 100µg/g làm ức chế men dehydrogenaza.

Tu (1981) sử dụng tuberfos 5 – 100µg/g ức chế men dehydrogenana. Lethbrigde và Đurus (1976) dùng accothion, malathion, thimet với nồng độ 50 – 200 – 1000ppm thì ức chế men ureaza.

Mishra và cộng tác viên (1985) dùng malathion ở nồng độ bình thường thấy amilaza tăng lên, invertaza hạ thấp và xenlulaza thì không ảnh hưởng.

BẢNG 7.18. ẢNH HƯỞNG CỦA THUỐC TRỪ CỎ ĐỐI VỚI VI SINH VẬT ĐẤT(Nguyễn Đường, ĐHNHI, 1979 (đơn vị 10^6 /gam đất khô kiệt))

Loại thuốc	Lần phun	VSV hào khí	VSV yếm khí	Nấm	Xạ khuẩn	<i>Azotobacter</i>	Vi khuẩn NO_3^-
2,4D	1	16,69	7,0	0,08	0,07	0,12	0,22
	2	51,20	7,0	0,08	0,09	0,15	0,38
	3	59,7	6,0	0,05	0,09	0,17	0,60
Dalaphon	1	53,20	3,0	0,07	0,10	0,14	0,03
	2	59,70	3,0	0,06	0,13	0,16	0,48
	3	68,30	3,0	0,04	0,10	0,17	0,60
Simazin	1	45,1	5,0	0,07	0,08	0,15	0,25
	2	42,8	4,0	0,07	0,08	0,12	0,21
	3	39,6	4,0	0,05	0,06	0,11	0,21
Không sử dụng thuốc (đối chứng)	0	66,70	8,0	0,08	0,13	0,16	0,33

– Ở trên, chúng ta đã trình bày thuốc trừ cỏ, trừ sâu, bệnh ức chế vi sinh vật đất. Sự ức chế này có lúc kéo dài hàng tháng, nhưng mặt khác chúng ta lại thấy một số thuốc vào đất làm độ độ ngày càng giảm đi. Vậy tại sao?

+ Một thí nghiệm cho thấy *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Achromobacter* có thể phân giải CIPC = Isoprophyl N (3-Chlorophenyl) carbamat với sự hình thành 3-Chloroanitin độc và chất này dần bị phân huỷ.

+ *Santhomonas*, *Sarcina*, *Bacillus* và một số nấm họ *Aspergilaceae* có khả năng phân giải monuron.

+ Dalapon, TCA dưới tác dụng của những vi khuẩn khác nhau, nấm và xạ khuẩn bị phân giải, giải phóng CI_2 , xeton axit, diaxit tương ứng (Jensen, 1963).

+ Những thuốc trừ sâu như aldrin được một số vi khuẩn dùng làm nguồn cacbon trong quá trình sinh trưởng, phát triển (Jonson và Fahreus, 1960); Chacko và cộng tác viên đã phân lập một số xạ khuẩn có khả năng phân giải DDT thành dẫn xuất DDD. Ở điều kiện yếm khí ngập nước DDT bị phân giải mạnh hơn (theo Geunri và Beard, 1967).

+ Một số chất sát trùng giảm độc nhanh do bốc hơi nhanh, hoặc do bị phân giải bởi con đường hoá học hoặc sinh học. Trong con đường sinh học có thể kể một số vi sinh vật tác động đến như *Pseudomonas*, *Nocardia*, *Trichoderma*. Một số chất hữu cơ thuỷ ngân cũng bị phân giải bởi *Bacillus* và *Aspergillus* (Spanis và cộng sự, 1962).

Thí nghiệm của Protocob. V. 1982, gồm 3 công thức 3 lần nhắc lại:

- 1) Đối chứng (không sử dụng thuốc).
- 2) Sử dụng loại Benzofooc (100 – 150 mg/lít).
- 3) Sử dụng loại Clorofooc (100 – 150 mg/lít).

BẢNG 7.19. ẢNH HƯỞNG CỦA THUỐC TRỪ SÂU ĐẾN VI SINH VẬT

(Protocob A.I, 1982 (Đơn vị tính %))

Công thức thí nghiệm Phân tích sau sử dụng	Đối chứng	Bón Benzofooc (100 – 150 mg/lít)	Bón Clorofooc (100 – 150 mg/lít)
Sau 5 ngày	100	108,8	76,2
Sau 10 ngày	100	123,1	81,7
Sau 20 ngày	100	145,5	88,2
Sau 30 ngày	100	132,5	92,4
Sau 60 ngày	100	103,1	108,9
Sau 90 ngày	100	91,3	116,2
Sau 120 ngày	100	84,2	125,8

2.5.3. Nhận xét chung

– Tóm lại các thuốc hoá học trừ sâu, bệnh, trừ cỏ dại có tác dụng rất khác nhau đối với vi sinh vật đất. Tác dụng ấy tùy thuộc:

- + Loại thuốc.
- + Nồng độ sử dụng.
- + Phương pháp sử dụng.

* Đối với thuốc trừ cỏ, thường ở nồng độ trừ được cỏ đều có tính chất ức chế hàng mấy tuần, có loại bị ức chế hàng 3 tháng hoặc hơn.

Thuốc trừ cỏ cũng ức chế các loại men thường gặp trong đất, do đó ảnh hưởng đến hoạt tính sinh học của đất.

* Thuốc trừ sâu, bệnh bám trên mặt đất, trên cây nên tác động đối với vi sinh vật đất không rõ.

– Các chất sát trùng do tính chất bốc hơi nhanh và thường dùng hạn chế ở một số trường hợp như tiêu độc ở một vài nơi nhất định, hoặc dùng khi giâm, chiết cành,... nên tác dụng của chúng không rõ đối với hệ sinh vật đất.

* Thuốc trừ cỏ nếu phun với nồng độ loãng hơn thì có thể kích thích sự sinh trưởng, phát triển của một số vi sinh vật, nhất là vi sinh vật amôn hoá.

– Trong lúc đại đa số bị ức chế bởi các thuốc trừ cỏ, trừ sâu, bệnh thì trong đất thường cũng có một số vi sinh vật có khả năng tiếp xúc và phân giải các chất độc và sử dụng, biến chúng thành những chất khác nhau và làm giảm độc của chúng.

PHẦN THỰC HÀNH

BÀI SỐ 1

TRANG THIẾT BỊ CẦN THIẾT TRONG NGHIÊN CỨU VI SINH VẬT

Mục đích yêu cầu

- Nắm được những máy móc, trang thiết bị cần thiết trong nghiên cứu về vi sinh vật.
- Biết sử dụng thành thạo một số máy móc thông dụng của phòng nghiên cứu.
- Hiểu được tầm quan trọng của công tác tiêu độc, khử trùng.
- Sử dụng thành thạo kính hiển vi.
- Phân biệt các dạng hình thái của vi sinh vật.

Nội dung

- Giới thiệu những trang thiết bị cần thiết trong phòng nghiên cứu vi sinh vật.
- Giới thiệu các dụng cụ và nguyên liệu cần thiết để nghiên cứu vi sinh vật: dụng cụ lọc, khử trùng, dụng cụ quang học, dụng cụ đo lường, môi trường nuôi cấy.
- Thao tác vận hành và sử dụng các trang thiết bị trong phòng nghiên cứu vi sinh vật.
- Cấu tạo và sử dụng, bảo quản kính hiển vi.
- Quan sát hình thái vi sinh vật.

I- MÁY MÓC

1.1. TỦ NUÔI CẤY VI SINH VẬT (INCUBATOR)

Tủ nuôi cấy hay còn gọi là tủ định ôn là thiết bị quan trọng dùng trong công tác nghiên cứu vi sinh vật, vì nhiệt độ trong tủ có thể thay

đổi từ 0°C – 90°C tùy theo ý muốn của người nghiên cứu và nhiệt độ trong tủ sau khi đã được xác định thì luôn luôn ở trạng thái ổn định trong suốt thời gian nuôi cấy.

1.1.1. Cấu tạo

– Cấu tạo vỏ tủ nuôi cấy có 2 lớp: lớp trong là kim loại dẫn nhiệt để giữ nhiệt độ bên trong của tủ, lớp ngoài là kim loại dày hơn và được bọc phía trong bởi một chất cách nhiệt (amiant). Giữa lớp trong và lớp ngoài là khoảng trống để giữ cho nhiệt độ trong tủ ít bị biến đổi.

– Trong tủ có bộ phận cảm nhiệt để báo nhiệt độ lên xuống cho role hoạt động và quạt gió được lắp ở phần giữa thân để điều hoà nhiệt độ bên trong.

– Phần ngoài tủ nuôi có hệ thống bảng điện tử để điều chỉnh nhiệt độ theo yêu cầu của nghiên cứu. Phía trên tủ được lắp van an toàn, nếu nhiệt độ trong tủ vượt quá giao động biên độ, van an toàn sẽ tự ngắt.

1.1.2. Cách sử dụng

– Đóng mạch điện, bấm nút mở công tắc tủ (có thể giữ vài giây đến khi xuất hiện đèn báo trên bảng điện tử). Sau đó bấm nút đặt nhiệt độ và thời gian (set up) theo yêu cầu nuôi cấy, điều chỉnh nhiệt độ và thời gian bằng ấn nút tương ứng mũi tên lên hoặc xuống. Nhiệt độ trong tủ ấm tăng dần và đạt tới nhiệt độ đã xác định.

– Nhiệt độ sẽ được duy trì trong suốt thời gian nuôi cấy đã định sẵn. Trên bảng điện tử luôn xuất hiện chỉ số báo nhiệt độ thực tế trong tủ. Khi đủ thời gian nuôi cấy, tủ sẽ phát ra tiếng báo hiệu và role tự ngắt để tự động tắt chế độ làm việc.

– Nếu muốn nuôi cấy liên tục lâu dài có thể không cần đặt chế độ thời gian, chỉ đặt nhiệt độ. Khi nào muốn kết thúc thì bấm nút tắt công tắc nguồn.

1.1.3. Khi sử dụng máy cần chú ý những điểm sau đây

– Hiệu chỉnh thiết bị trước khi sử dụng.

– Phải nối tủ với dây đất và kiểm tra điện thế của máy với điện thế ở nơi đặt máy xem có giống nhau không, trường hợp không giống nhau phải dùng biến thế.

- Khi sử dụng tủ ẩm lần đầu, phải kiểm tra bộ phận điều chỉnh nhiệt độ xem có chính xác không, nhiệt độ trong tủ có đều không.
- Cửa tủ luôn luôn phải đóng kín, trừ khi lấy hoặc cho nguyên liệu vào nuôi cấy nhưng cũng không được mở cửa tủ rộng và lâu.
- Luôn luôn phải đảm bảo cho tủ ẩm được khô ráo, sạch sẽ, phải cho tủ hoạt động thường xuyên nhất là những hôm trời ẩm. Khi làm đổ các chất dịch nuôi cấy hoặc làm bẩn trong tủ, phải lau chùi và sát trùng ngay.
- Nên đặt trong tủ một cốc nước vô trùng trong quá trình nuôi cấy để giúp cho quạt gió hoạt động tốt.
- Khi không dùng, tắt công tắc điện và rút phích cắm điện ra.

1.2. TỦ SẤY KHÔ (DRYING OVEN)

1.2.1. Tác dụng

- Dùng tủ sấy khô để khử trùng các dụng cụ thủy tinh, đồ sứ như ống nghiệm, xilanh, hộp lồng, cốc, phễu, cối chày sứ,... các đồ kim khí như dao, kéo, panh và các dụng cụ khác không có nước khác như bông, băng, vải,... Trừ vật liệu làm từ cao su và môi trường nuôi cấy không được khử trùng bằng tủ sấy khô.
- Nguyên lý cấu tạo của tủ sấy khô cũng gần giống như tủ ẩm, chỉ khác là có thể tiết trùng ở nhiệt độ 175 – 200°C.

1.2.2. Cách sử dụng tủ sấy khô

- Các dụng cụ phải rửa sạch, để khô, bao gói cẩn thận trước khi cho vào tủ, sau khi sắp xếp các thứ vào trong tủ rồi đóng kín cửa và đóng các lỗ thông khí. Bật công tắc điện, đặt chế độ làm việc cho tủ (điều chỉnh nhiệt độ và thời gian giống như với tủ định ôn). Thông thường dụng cụ nuôi cấy và phân tích vi sinh vật được khử trùng ở 160 – 180°C trong 2 giờ. Với các dụng cụ, như: pipet, xilanh,... không được sấy quá 60°C vì nhiệt độ cao làm giãn nở thủy tinh dẫn đến mất độ chính xác của dụng cụ. Lưu ý khi sấy không nên đặt dụng cụ sát thành tủ vì ở đây nhiệt độ thường cao hơn nhiều, dễ làm cháy giấy gói hoặc nút bông, cũng không nên xếp dụng cụ quá khít nhau để không khí có thể lưu thông được và làm nóng đều các vật cần khử trùng.
- Sau khi ngắt mạch điện, chờ nhiệt độ hạ dần xuống bằng nhiệt độ phòng thì mới được mở cửa tủ để lấy dụng cụ sấy ra. Dụng cụ lấy

ra phải để trên giá gỗ, trên giấy hoặc vải, không được để ở trên gạch men, trên sàn gạch hoặc sàn xi măng vì dụng cụ đang nóng gặp lạnh sẽ dễ vỡ và làm ảnh hưởng đến tính vô trùng của dụng cụ.

1.3. NỒI HẤP HƠI NƯỚC CAO ÁP (AUTOCLAVE)

1.3.1. Nguyên lý

Nồi hấp hơi nước cao áp (hình TH1.1) làm bằng kim loại chịu được nhiệt độ cao (ít nhất là 135°C), có thể dùng điện, dùng củi hoặc dùng than đun cho nước sôi, hơi nước sẽ nén dần lại ở trong nồi và nếu tiếp tục để cho nước sôi thì áp lực trong nồi sẽ tăng dần, áp lực càng tăng thì nhiệt độ của hơi nước trong nồi càng cao, như vậy giữa nhiệt độ (t°) của hơi nước và áp lực (P) của nó có liên quan với nhau, nhưng không phải theo một tỷ lệ đường thẳng.

Khi áp lực kế chỉ số 0 có nghĩa là: áp lực P trong nồi hấp = áp lực P không khí.

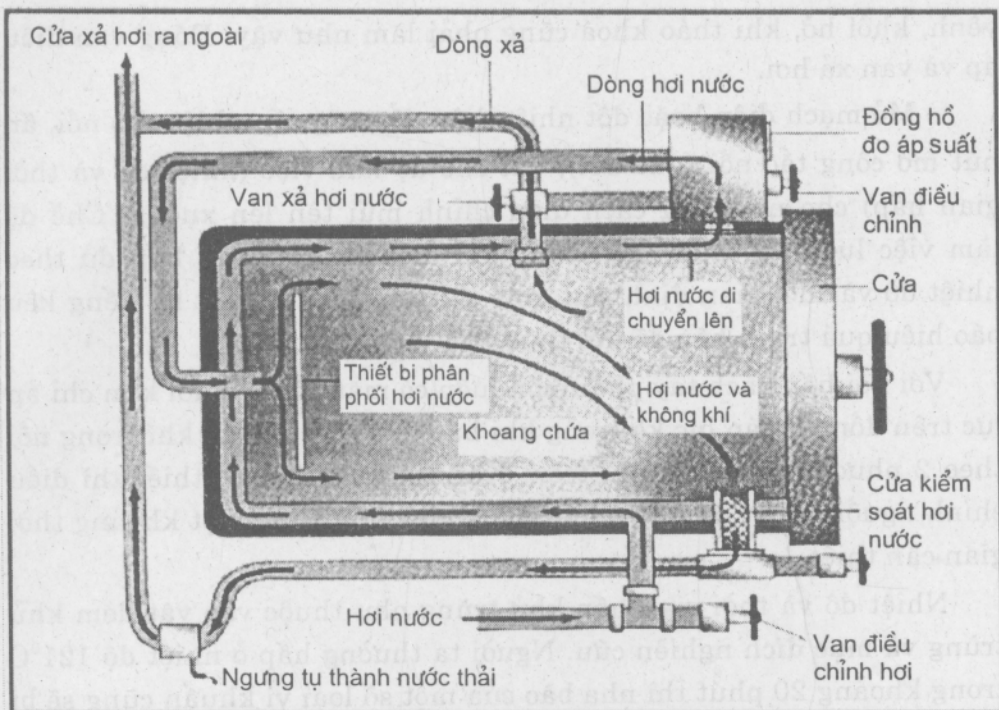
Cho nên khi áp lực kế chỉ 1kg/cm² thì chính là chỉ hiệu số giữa áp lực bên trong với áp lực không khí tồn tại trong nồi.

$$1\text{kg/cm}^2 = P (\text{trong nồi}) - P (\text{không khí trong nồi})$$

Do đó áp lực P trong nồi không phù hợp với P áp lực kế, hay nói một cách khác, nhiệt độ trong nồi không tương ứng với nhiệt độ của áp lực kế. Vì vậy muốn cho nhiệt độ trong nồi phù hợp với áp lực kế thì phải loại bỏ hết không khí trong nồi ra (1kg/cm² = 1atm = 1 phoud).

BẢNG TH 1.1. SO SÁNH MỐI LIÊN QUAN GIỮA ÁP SUẤT GHI TRÊN ÁP KẾ CỦA NỒI HẤP BIỂU THỊ BẰNG ATMOSPHERE VÀ NHIỆT ĐỘ TRONG NỒI ĐÃ LOẠI HẾT KHÔNG KHÍ

Áp suất (atm)	Nhiệt độ (°C)	Áp suất (atm)	Nhiệt độ (°C)	Áp suất (atm)	Nhiệt độ (°C)	Áp suất (atm)	Nhiệt độ (°C)
0,0	100,0	0,5	112,5	1,0	121,0	1,5	127,0
0,1	102,5	0,6	114,5	1,1	129,9	1,6	128,0
0,2	105,0	0,7	116,	1,2	124,0	1,7	129,0
0,3	107,5	0,8	117,0	1,3	125,0	1,8	130,0
0,4	110,0	0,9	119,0	1,4	126,0	1,9	131,0
						2,0	132,0



Hình TH 1.1. Nồi hấp hơi nước cao áp

Để loại bỏ hết không khí trong nồi ra có 2 cách:

- 1) Đóng khoá thoát hơi để tăng áp lực trong nồi lên đến khoảng 0,3atm rồi xì cho thoát hết hơi ra, sau đó khoá lại và cho tăng áp lực.
- 2) Mở khoá thoát hơi và đun cho đến khi hơi nước bắt đầu thoát ra thành một luồng hơi trắng khá mạnh, khá đều thì đóng lại và cho tăng áp lực.

1.3.2. Cách sử dụng nồi hấp cao áp

– Đổ nước vào nồi hấp với lượng vừa đủ (xem ở vạch ngang ghi trên ống thuỷ tinh hoặc bình chứa lắp bên ngoài nồi hấp). Chú ý nước phải ngập dây may so trong nồi, nếu là nồi hấp xách tay.

– Các dụng cụ đem hấp phải được bao gói kỹ, đối với các bình và ống môi trường có nút bông phải bọc bằng giấy dầu hoặc giấy nhôm để tránh hơi nước đọng làm ướt nút.

– Khi sắp xếp dụng cụ vào nồi hấp, không nên để sát nhau quá, để vật nặng xuống dưới, vật nhẹ lên trên.

– Đậy nắp, khoá chặt các ốc theo từng đôi đối xứng nhau để khỏi

vênh, khởi hở, khi tháo khoá cũng phải làm như vậy. Đóng van điều áp và van xả hơi.

– Mở mạch điện hoặc đốt nhiên liệu để cung cấp nhiệt cho nồi, ấn nút mở công tắc nồi (nút ON), đặt chế độ làm việc (nhiệt độ và thời gian hấp) cho nồi bằng cách điều chỉnh mũi tên lên xuống. Chế độ làm việc luôn thể hiện trên bảng ghi điện tử. Sau khi hấp đủ theo nhiệt độ và thời gian định sẵn, role sẽ tự ngắt, nồi phát ra tiếng kêu báo hiệu quá trình hấp đã kết thúc.

Với nồi hấp xách tay phải luôn luôn có mặt để theo dõi kim chỉ áp lực trên đồng hồ áp lực kế trong khi hấp, loại hết không khí trong nồi theo 2 phương pháp đã nêu trên. Khi đạt tới mức cần thiết thì điều chỉnh nguồn nhiệt để duy trì áp lực không đổi trong một khoảng thời gian cần thiết.

Nhiệt độ và thời gian hấp khử trùng phụ thuộc vào vật đem khử trùng và mục đích nghiên cứu. Người ta thường hấp ở nhiệt độ 121°C trong khoảng 20 phút thì nha bào của một số loại vi khuẩn cũng sẽ bị tiêu diệt.

– Khi đạt tới thời gian cần thiết thì ngắt điện (ấn nút OFF) hoặc rút hết nhiên liệu ra và đợi cho áp lực hạ dần xuống 0°C , nhiệt độ trong nồi giảm hẳn rồi mới được mở nắp lấy dụng cụ đã khử trùng ra. Chú ý tránh hạ áp lực đột ngột bằng cách mở van xì hơi ra quá mạnh sẽ làm rạn nứt hoặc vỡ dụng cụ. Cũng không nên để nồi hấp nguội lạnh mới lấy dụng cụ ra, vì lúc này nắp nồi sẽ mút chặt vào miếng đệm cao su, rất khó mở.

– Các dụng cụ lấy ra không được để ở nền gạch men, nền đá, nền xi măng (vì dụng cụ đang nóng gặp lạnh sẽ vỡ, nứt) và đảm bảo tính vô trùng cho dụng cụ.

1.4. TỦ LẠNH (FREEZER)

Tủ lạnh là một thiết bị quan trọng dùng để giữ và bảo quản giống vi khuẩn, virus và bảo quản các loại huyết thanh, các loại vacxin, các môi trường dùng để nuôi cấy,...

Tủ lạnh $0^{\circ} - 4^{\circ}\text{C}$ dùng để giữ giống vi khuẩn.

Tủ lạnh -15°C đến -30°C dùng để giữ giống virus.

1.5. MÁY LY TÂM (CENTRIFUGAL MACHINE)

1.5.1. Công dụng

- Tập trung ở đáy ống các phần tử cần nghiên cứu chứa trong một bệnh phẩm hay chất mang.
- Tập trung vi khuẩn nuôi cấy trong môi trường lỏng để tách riêng vi khuẩn.
- Làm trong một chất lỏng chứa nhiều phần tử đặc vẩn đục.
- Tách hồng cầu riêng với huyết tương,...

1.5.2. Cách sử dụng

Máy ly tâm thông thường có một trục quay tròn, về phía trên của trục có một hình sao để nhận các ống chứa chất lỏng cần ly tâm. Các ống này được móc vào sao bằng một cái quai. Khi quay các ống sẽ giãn ra thẳng góc với trục quay đứng và các hạt lắng xuống theo đường trục của ống và dồn về phía đáy. Với kiểu máy này, tốc độ tối đa là 4500 – 6000 vòng trong một phút.

Các máy ly tâm gần đây có bộ phận thắng bằng tự động, có máy để thời gian tự động, có đồng hồ chỉ tốc độ,... khi ly tâm chỉ cần vặn các nút theo ý muốn.

1.6. NHỮNG THIẾT BỊ CẦN THIẾT KHÁC

- Máy hút chân không (vacuum gauge).
- Máy đếm khuẩn lạc (colony counting).
- Máy đo pH (pH meter) hay thang đo pH (pH paper set).
- Máy cất nước (Deionizers).
- Máy đánh mẫu (Mixers).
- Máy đếm tế bào (cell counting).
- Máy lắc (shaker).
- Phòng hoặc buồng vô trùng (clean bench, laminars).

II- CÁC DỤNG CỤ VÀ THIẾT BỊ PHÒNG THÍ NGHIỆM

2.1. THIẾT BỊ QUANG HỌC

- Kính hiển vi quang học (Microscopy).
- Kính hiển vi chụp ảnh.

- Đèn soi kính hiển vi.
- Tủ quang nền đen.
- Thuốc đo vật kính và thuốc đo thị kính.
- Kính lúp hai mắt đeo trán.
- Máy projector.
- Máy Over head.
- Máy ảnh.
- Đèn tử ngoại (UV lamp).

2.2. THIẾT BỊ ĐO LƯỜNG

- Cân kỹ thuật (technical balance).
- Cân tiểu ly có lồng kính.
- Cân tiểu ly xách tay.
- Cân bàn.
- Cân phân tích điện.
- Nhiệt kế treo tường và các loại nhiệt kế đo nhiệt độ khác.
- Đồng hồ điện tử đếm phút, giây.

2.3. CÁC LOẠI DỤNG CỤ KHÁC

- Các loại dụng cụ thủy tinh: Phiến kính, hộp lồng, ống nghiệm, lọ, bình, phễu, cốc ống đông, xilanh, pipet, que gạt, đèn cồn,...
- Các loại dụng cụ kim loại: Dao mổ các loại, kéo thẳng, kéo cong, panh, que cấy, đèn xì, hộp tiêu độc, cửa xương,...
- Các loại dụng cụ đồ men, sứ: Khay men, cối chày sứ, xoong nổi để pha chế môi trường.
- Các loại dụng cụ cao su, vải, bông, băng: Găng tay để mổ và để rửa dụng cụ, ủng, bông thấm nước, bông không thấm nước, vải gạc, vải lọc, vải màn.
- Các loại hoá chất để chế môi trường, rửa dụng cụ thủy tinh và sát trùng tiêu độc.
- Các loại thuốc nhuộm và thuốc thử phản ứng sinh hoá.
- Các loại giống vi khuẩn và virus, các loại kháng huyết thanh để chẩn đoán, các loại khuẩn tố để chẩn đoán.

III- KÍNH HIỂN VI

Kính hiển vi là một dụng cụ quang học rất cần thiết để nghiên cứu hình thái vi sinh vật và nghiên cứu những vật hết sức nhỏ mà mắt thường không thể nhìn thấy được, có nhiều loại kính hiển vi khác nhau.

* Cấu tạo kính hiển vi quang học gồm có 2 bộ phận:

3.1. BỘ PHẬN CƠ HỌC

3.1.1. Chân kính hay đế kính

Dùng để đỡ kính hiển vi ở trạng thái cân bằng, cấu tạo từ kim khí đặc biệt.

3.1.2. Thân kính

Nối liền với chân kính, được tạo từ loại kim khí đặc biệt. Thân kính để gắn toàn bộ các bộ phận của kính hiển vi.

3.1.3. Ống kính

Là một ống kim khí rỗng hình trụ lắp trên trụ kính, đầu trên của ống kính lắp thị kính, phía dưới của ống kính là bàn xoay dùng để lắp các vật kính. Tác dụng của ống kính là khi vật ảnh được phóng đại lần thứ nhất bởi vật kính, thì đưa vật ảnh qua ống kính tới thị kính để phóng vật ảnh lần thứ hai. Như vậy vật ảnh ta quan sát thấy chính là ảnh ảo.

3.1.4. Khay kính hay đĩa kính

Có thể hình vuông hay hình tròn, là nơi đặt tiêu bản để quan sát, ở giữa có lỗ thấu quang để đưa ánh sáng từ bộ tụ quang kính lên tiêu bản. Trên khay kính có bộ phận kẹp tiêu bản cho vững và bộ phận gọi là xa để di chuyển tiêu bản theo hai chiều khác nhau, từ trái sang phải, từ trước ra sau và ngược lại để tìm vật ảnh. Ngoài ra, khay kính còn có thể di chuyển theo các chiều bằng cách vặn hai ốc ở hai bên khay kính.

3.1.5. Ốc điều chỉnh

Gồm có ốc điều chỉnh lớn (ốc sơ cấp) và ốc điều chỉnh nhỏ (ốc vi cấp). Ốc sơ cấp dùng để điều chỉnh tiêu điểm, ốc vi cấp dùng để điều chỉnh cho ảnh vật rõ nét.

3.2. BỘ PHẬN QUANG HỌC

3.2.1. Gương phản chiếu

Đặt ở phía dưới khay kính gồm có hai mặt, một mặt phẳng và một mặt lõm, dùng để lấy ánh sáng.

3.2.2. Tụ quang kính

Được lắp vào phía dưới khay kính bởi một ốc cố định, dùng để tập trung ánh sáng vào tiêu bản.

3.2.3. Bộ phận chắn sáng

Có hình giống như con người đặt ở phía dưới tụ quang kính có thể mở rộng hay hẹp dùng để điều hoà ánh sáng vào tiêu bản.

3.2.4. Vật kính

Là một hệ thống quang học rất quan trọng và phức tạp, gồm một số thấu kính, nó trực tiếp phóng đại ảnh thật của vật xem, khả năng phóng đại của vật kính phụ thuộc vào tiêu cự tức là phụ thuộc vào bán kính cong của thấu kính; thấu kính càng cong, tiêu cự càng ngắn thì khả năng phóng đại càng lớn. Vật kính khi dùng được lắp vào bàn xoay ở phía dưới ống kính. Có hai loại vật kính:

– *Vật kính khô*: là vật kính có độ phóng đại thấp x8; x20; x40; dùng để xem tươi, xem vi khuẩn di động, xem khuẩn lạc, hay xem ký sinh trùng hoặc xem các tiêu bản tổ chức,...

– *Vật kính dầu*: là vật kính có độ phóng đại cao x90; x100; x120,... nó có một vòng khác màu ở đầu vật kính để phân biệt với vật kính khô.

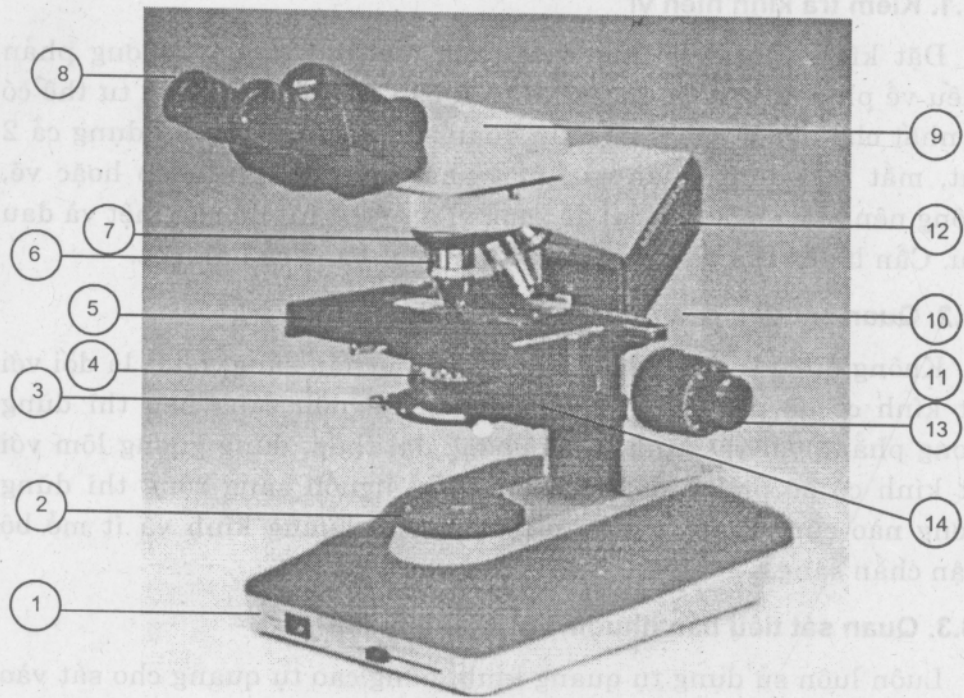
Vật kính khô và vật kính dầu khác nhau ở chất mà ánh sáng phải đi qua tiêu bản (phiến kính) và vật kính. Ở vật kính khô, chất đi qua là không khí mà chỉ số khúc xạ (chiết suất) của không khí là $n = 1$ rất khác với chỉ số khúc xạ của thủy tinh $n = 1,52$; do đó các tia sáng khi ra khỏi tiêu bản sẽ bị phản xạ và phần ngoài của chùm ánh sáng không lọt được vào vật kính.

Ở vật kính có độ phóng đại lớn, người ta dùng dầu bạch hương (huile de cèdre) có chỉ số khúc xạ $n = 1,51$ xấp xỉ với chỉ số khúc xạ của thủy tinh $n = 1,52$ đặt vào giữa tiêu bản và vật kính. Lúc này

thủy tinh và dầu bạch hương là một môi trường gần như đồng nhất, nên ánh sáng khi đi qua thủy tinh sẽ không bị khúc xạ mà chiếu thẳng vào vật kính.

3.2.5. Thị kính

Gồm có hai thấu kính lắp vào hai đầu của một cái ống nhỏ lắp trên đầu ống kính, một thấu kính hướng về mắt người xem và một thấu kính hướng về vật quan sát, kính trên là kính phóng đại ảnh thật do vật kính thu được, kính dưới là kính thị trường làm sáng tỏ thị trường do đó mà ta nhìn thấy rõ ảnh được phóng đại.



Hình TH 1.2. Cấu tạo kính hiển vi

- | | |
|---------------------|----------------------------------|
| 1. Đế kính | 8. Thị kính |
| 2. Đèn chiếu | 9. Ống kính |
| 3. Bộ tụ quang kính | 10. Thân kính |
| 4. Vòng bảo hiểm | 11. Ốc sơ cấp |
| 5. Khay kính | 12. Ốc vi cấp |
| 6. Vật kính | 13. Công tắc |
| 7. Bàn xoay | 14. Bộ phận điều chỉnh khay kính |

Thị kính có độ phóng đại càng cao thì khoảng cách giữa hai thấu kính càng ngắn (tiêu cự của thị kính càng ngắn) và ngược lại. Độ phóng đại của thị kính thường có 4 số: x5; x7; x10; x15.

Muốn biết độ phóng đại của vật quan sát (độ phóng đại của kính hiển vi), người ta nhân độ phóng đại của vật kính với độ phóng đại của thị kính. Ví dụ, dùng vật kính dầu x90 và thị kính x15 thì độ phóng đại của vật quan sát hay độ phóng đại của kính hiển vi sẽ là:

$$90 \times 15 = 1350 \text{ (lần)}$$

3.3. CÁCH SỬ DỤNG KÍNH HIỂN VI

3.3.1. Kiểm tra kính hiển vi

Đặt kính vào vị trí làm việc, cấm điện hoặc quay gương phản chiếu về phía ánh sáng, đặt kính trên bàn cho ngay ngắn ở tư thế có lợi nhất cho người quan sát. Khi quan sát tiêu bản cần sử dụng cả 2 mắt, mắt trái dùng quan sát, mắt phải dùng để ghi chép hoặc vẽ, không nên nheo một mắt lại để xem, vì như thế rất dễ mỏi mắt và đau đầu. Cần luyện tập để có thể xem kính được bằng cả hai mắt.

3.3.2. Quan sát tiêu bản tươi với vật kính khô

Không dùng tụ quang kính và bộ phận chắn sáng, nhất là đối với vật kính có độ phóng đại thấp (38), khi nguồn sáng hẹp thì dùng gương phẳng với vật kính có độ phóng đại thấp, dùng gương lõm với vật kính có độ phóng đại cao (340), khi nguồn sáng rộng thì dùng gương nào cũng được. Hạ thấp tốt cùng tụ quang kính và ít mở bộ phận chắn sáng.

3.3.3. Quan sát tiêu bản nhuộm với vật kính dầu

Luôn luôn sử dụng tụ quang kính, nâng cao tụ quang cho sát vào tiêu bản. Khi sử dụng tụ quang kính cần chú ý các thao tác:

Đặt phiến kính lên khay kính và cố định, dùng vật kính có độ phóng đại thấp để có ảnh trong thị trường trước. Hạ thấp vật kính cho sát gần tiêu bản (khi hạ vật kính mắt nhìn ngoài để tránh đè mạnh làm vỡ tiêu bản). Theo dõi trong ống kính, rồi từ từ vận ốc sơ cấp lên, đến khi trông thấy ảnh (thường có hình chớp) thì ngừng vận ốc sơ cấp và bắt đầu sử dụng ốc vi cấp, vận hết sức chậm đến khi thấy ảnh rõ nét thì thôi (có thể vận tới hoặc vận lui). Sau khi đã điều chỉnh tiêu điểm với vật kính độ phóng đại thấp thì quay vật kính đó ra, nhỏ

một giọt dầu bạch hương vào điểm định soi trên tiêu bản, không để giọt dầu lan rộng ra, xoay đầu vật kính dầu vào, và vận vật kính dầu sát xuống tiêu bản ngậm vào giọt dầu, chú ý mắt nhìn ngoài để đừng vận sát quá sẽ dễ vỡ phiến kính, đến khi thấy chớp ảnh, tức là ảnh đã trông thấy nhưng chưa thấy rõ, lúc này điều chỉnh ốc vi cấp cho đến khi ảnh vật rõ nét trong thị trường.

3.4. CÁCH BẢO QUẢN KÍNH HIỂN VI

– Khi lấy kính từ trong hộp kính hiển vi ra, dùng tay phải nắm chắc, kéo kính ra theo hướng nằm ngang, không để đụng vào thành hộp, sau đó dùng tay trái đỡ chân kính để mang đi (bao giờ cũng phải dùng 2 tay khi di chuyển). Nếu mang đi xa phải cố định chắc chắn để tránh bị lắc.

– Không được sờ tay vào đầu vật kính và thị kính, nếu cần có thể dùng vải mềm hoặc giấy lau kính để lau. Vật kính dầu dùng xong lấy vải mềm mịn hay giấy dai mịn lau sạch dầu bạch hương ở đầu vật kính, sau đó tấm xylon lau cho hết dầu (xylon có tác dụng làm tan dầu bạch hương). Cuối cùng lau lại một lần nữa bằng vải mềm, mịn hay giấy mềm.

– Khi dùng xong phải xoay các bộ phận của kính về đúng vị trí quy định, không được để vật kính nằm trong trục kính như lúc quan sát mà phải đặt đúng lỗ mù hoặc xoay vật kính ra hai bên và vận cho áp sát xuống đĩa kính, tụ quang hạ thấp xuống, gương phản chiếu xoay dọc thân kính. Toàn bộ kính đều coi như ở trạng thái nghỉ.

BÀI SỐ 2

CHUẨN BỊ DỤNG CỤ VÀ MÔI TRƯỜNG NUÔI CẤY VI SINH VẬT

Mục đích, yêu cầu

- Biết được và chuẩn bị được dụng cụ nuôi cấy VSV.
- Nắm vững cách pha chế môi trường nuôi cấy VSV.
- Hiểu được phương pháp khử trùng các loại dụng cụ và môi trường nuôi cấy VSV.

Nội dung kiến tập

- Chuẩn bị và rửa dụng cụ cần thiết để pha chế môi trường nuôi cấy VSV.
- Học cách bọc gói các dụng cụ thông dụng và nút bông cho ống nghiệm, pipet,...
- Cách pha chế môi trường thạch nghiêng và đĩa thạch.

I- CHUẨN BỊ DỤNG CỤ

1.1. CÁC DỤNG CỤ THƯỜNG ĐƯỢC SỬ DỤNG TRONG NGHIÊN CỨU VI SINH VẬT

- Đĩa petri (hộp lồng).
- Ống nghiệm, bình tam giác, bình cầu, chai thuỷ tinh.
- Pipet, xilanh, que gạt, que cấy.
- Lam kính, lamên.

1.2. YÊU CẦU

Các dụng cụ phải sạch về mặt hoá học và vi sinh vật học (các dụng cụ phải được vô trùng).

1.3. CÁCH XỬ LÝ DỤNG CỤ TRƯỚC KHI RỬA

- Đối với dụng cụ thuỷ tinh mới, chưa sử dụng, cần ngâm nước lã hoặc dung dịch H_2SO_4 loãng 24 giờ. Rửa lại bằng xà phòng và nước nhiều lần cho tới khi dung dịch rửa có pH trung tính.

– Các dụng cụ đã qua sử dụng, nhất là các VSV gây bệnh, trước khi rửa nhất thiết phải được khử trùng bằng hơi nước áp lực để giết chết các tế bào, đảm bảo an toàn cho người rửa, không cho mầm bệnh cũ nhiễm vào môi trường mới.

– Đối với các VSV không gây bệnh cho người và động, thực vật, chỉ cần tháo nút bông, xếp vào nồi hoặc chậu nhôm chuyên dụng, đổ nước xà phòng, ngâm dụng cụ ngập kín nước, đun sôi 15 – 30 phút. Gom các cặn bẩn vào túi nilon, buộc kín rồi mới đổ bỏ.

– Dịch nuôi VSV trước khi đổ bỏ cần thêm vài giọt formalin, lắc mạnh để giết chết tế bào.

– Sử dụng dung dịch sunfo-cromic để ngâm tẩy các vết bẩn trên dụng cụ thuỷ tinh.

1.4. CÁCH RỬA DỤNG CỤ

– Chọn chổi rửa thích hợp với từng loại ống hoặc bình, phía đầu nên dệt dây chun để phần lõi sắt không chọc thủng đáy ống nghiệm hoặc đáy bình.

– Dùng miếng nhám thấm nước rửa, hoặc bông thấm cồn lau sạch các ký hiệu ghi trên thuỷ tinh.

– Dùng chổi hoặc miếng rửa đã thấm dung dịch nước rửa cọ kỹ phía trong ống, hoặc bình hay đĩa petri tới khi sạch hết các vết bẩn. Dùng khăn mềm cọ kỹ phía ngoài. Xả nước làm sạch chất tẩy rửa. Tráng lại bằng nước cất. Dụng cụ ngược dụng cụ vào giá đựng cho róc hết nước. Làm khô ở nhiệt độ phòng, hoặc phơi nắng, hoặc sấy khô ở 80 – 105°C. Đĩa petri nên rửa và xếp theo bộ để dễ lắp lại với nhau.

– Các phiến kính và lá kính dùng xong nên ngâm riêng vào dung dịch tẩy rửa hoặc sát trùng. Dùng khăn mềm cọ rửa, tráng nước cất, thấm khô, hong lại trước khi cất. Các lá kính rất dễ vỡ, cần thận trọng hơn và nên rửa dưới vòi nước chảy nhẹ.

– Với các pipet dùng để hút dịch VSV: sau khi sử dụng cần ngâm ngay vào ống nước sát trùng, khuấy bỏ nút bông, ngâm tiếp vào dung dịch tẩy rửa 1 ngày rồi chuyển sang bình rửa pipet tự động qua đêm. Tráng nước cất, hong khô. Nếu rửa trực tiếp dưới vòi nước, cần điều chỉnh sao cho dòng nước chảy qua bên trong pipet.

Với các pipet dùng cho các phản ứng hoá học, không cần ngâm nước sát trùng, đặt pipet dưới vòi nước chảy để xả bớt hoá chất bám

dính bên trong, ngâm vào ống nước xà phòng một ngày, rửa sạch rồi tráng nước cất. Pipet chỉ nên hong khô ở nhiệt độ phòng. Nếu sấy ở nhiệt độ cao, thủy tinh giãn nở làm sai lệch thể tích.

– Pha dung dịch rửa:

+ Dung dịch sunfo-cromic:

Bicromat kali: 50g.

H₂SO₄ đặc: 500ml.

+ Dung dịch kiềm trong ancol:

NaOH viên: 120g.

Nước cất: 120ml.

Ancol 95°: 1000ml.

1.5. CHUẨN BỊ DỤNG CỤ ĐỂ KHỬ TRÙNG

– Dụng cụ trước khi khử trùng phải được rửa sạch, làm khô và gói giấy để bảo đảm tính vô trùng sau khi sấy.

– Mỗi pipet được gói trong dải giấy dài có chiều rộng 4 – 5cm. Đầu pipet được dùng để hút bằng miệng được đút nút bằng một ít bông, nút bông cần vừa phải, nếu chặt quá sẽ khó hút dịch và khó lấy ra khi rửa. Pipet được gói bắt đầu từ phía đầu nhỏ giọt, quấn giấy dần dần vào theo kiểu xoáy tròn ốc cho đến khi hết ở phía đầu có nút bông. Phải quấn giấy cho sát khít vào pipet. Sau khi quấn giấy, ta phải giữ cho khỏi bẩn và khỏi rách bằng cách buộc thành từng bó cùng kích cỡ hoặc cho vào ống đựng pipet làm bằng kim loại hay bằng bìa cứng.

– Các que gạt cũng được gói riêng từng cái và sau đó cũng bó lại như pipet. Các đĩa petri được gói thành từng chồng, mỗi chồng khoảng 4 – 5 bộ.

Các chai lọ, ống nghiệm và ống burri dùng để nuôi cấy vi sinh vật nhất thiết phải được đậy nút (nút nhựa hoặc kim loại hay cao su nhân tạo chịu nhiệt hoặc bằng nút bông). Nếu làm nút bông phải dùng bông không thấm nước (bông mỡ). Nút bông cần làm đúng kiểu cách để thuận tiện khi thao tác thí nghiệm, có thể làm nút bông trần hoặc nút bông có bọc vải màn.

Lấy bông theo lớp, tùy vào kích cỡ miệng bình, chai lọ và ống nghiệm để lấy lượng bông phù hợp. Có 2 cách làm nút bông thông dụng:

* Nhồi bông vào giữa, dàn đều ra xung quanh thành hình tròn, lấy đầu một ngón tay đặt vào giữa, các ngón của bàn tay kia giữ đều phía ngoài rồi đẩy sát lên ngón tay đặt giữa tạo thành nút bông.

* Đặt miếng bông vừa lấy (theo hình chữ nhật) trên mặt bàn sạch, cuộn tròn lại theo chiều dài đến hết, rồi gấp làm đôi tạo thành nút bông.

Xoay đều nút vừa tạo ra vào miệng ống hoặc bình, sâu khoảng 2 – 3cm, điều chỉnh sao cho không tạo thành rãnh trên nút bông để ngăn chặn sự tập nhiễm từ không khí, vuốt đều phần còn lại bên ngoài rồi bện chặt lại như hình ngọn lửa. Nút bông đạt yêu cầu cần vừa phải, không chặt quá, cũng không lỏng quá, dễ dàng lấy ra khi thực hiện các thao tác nuôi cấy VSV.

Với các bình môi trường thạch có thể bao giấy bạc thay cho nút bông.

1.6. KHỬ TRÙNG CÁC DỤNG CỤ THUỶ TINH

– Phương pháp cơ bản để khử trùng các dụng cụ thuỷ tinh là phương pháp khử trùng bằng sức nóng khô (bằng nhiệt). Công việc này được thực hiện trong tủ sấy (Drying oven) ở nhiệt độ 160 – 180°C trong vòng 2 giờ. Khi đó có thể tiêu diệt cả tế bào dinh dưỡng lẫn các bào tử của VSV.

– Các dụng cụ đã khử trùng được bảo quản trong túi polyethylen cất giữ ở chỗ kín, tránh bụi bặm. Chỉ bóc giấy ngay trước khi sử dụng. Sau khi khử trùng, các que gạt, que cấy chỉ nên sử dụng trong vòng 24 giờ, hộp petri trong vòng 3 ngày, ống nghiệm, bình nón khoảng 7 – 10 ngày nếu bảo quản tốt. Nếu để lâu, dụng cụ phải được khử trùng lại trước khi sử dụng.

– Một số dụng cụ như que gạt, que cấy, ống nghiệm, pipet có thể khử trùng bằng hơi nước ở áp lực cao (sử dụng nồi hấp cao áp), thông thường ở 121°C/30'. Khử trùng xong nên sử dụng ngay.

II. CHUẨN BỊ CÁC MÔI TRƯỜNG ĐỂ NUÔI CẤY VI SINH VẬT

Cũng như các sinh vật khác, để sinh trưởng và phát triển, các tế bào vi sinh vật cần các chất dinh dưỡng thích hợp. Khi nuôi cấy nhân tạo, người ta làm các loại “thức ăn” cung cấp cho từng nhóm vi sinh

vật khác nhau. Dạng “thức ăn” này được gọi là môi trường nuôi cấy. Tuy từng giống VSV khác nhau mà có môi trường nuôi cấy chuyên tính khác nhau.

2.1. CÁC YÊU CẦU VỀ MÔI TRƯỜNG NUÔI CẤY

– Đầy đủ các chất dinh dưỡng phù hợp với từng kiểu trao đổi chất của từng nhóm vi sinh vật, không chứa các yếu tố độc hại, môi trường nuôi cấy phải được đảm bảo cho sự sinh trưởng bình thường của vi sinh vật.

– Vô trùng tuyệt đối để khi nuôi cấy chỉ phát triển một loại VSV mong muốn.

2.2. CÁCH GỌI TÊN MÔI TRƯỜNG

Môi trường thường được gọi theo tên người chế tạo công thức (ví dụ môi trường Hansen, MacConkey,...) hoặc theo nguồn dinh dưỡng chính có trong môi trường (môi trường tinh bột-thạch, malt-thạch, gluco-pepton,...).

2.3. PHÂN LOẠI MÔI TRƯỜNG

Môi trường được phân loại theo thành phần hoá học, chế độ dinh dưỡng và công dụng

2.3.1. Phân loại theo thành phần hoá học

2.3.1.1. Môi trường có thành phần xác định (môi trường tổng hợp) (defined medium)

Môi trường được chế tạo từ các chất có thành phần được xác định rõ ràng. Ví dụ, môi trường A có chứa 5g gluco, 1g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2g K_2HPO_4 , 1 lít nước. Nếu như bổ sung 1 lượng nhất định axit amin cụ thể nào đó (Lyzin) vào thì môi trường A vẫn được gọi là môi trường có thành phần xác định.

Môi trường có thành phần xác định được sử dụng để nghiên cứu các nhu cầu dinh dưỡng hoặc các con đường sinh hoá đặc biệt của vi sinh vật.

Tuy nhiên, khái niệm môi trường xác định cũng chỉ có tính chất tương đối bởi vì các hoá chất sử dụng để pha chế môi trường, ngoài thành phần chính được xác định, còn có các nguyên tố vi lượng tạp nhiễm không được xác định.

Nguồn nước pha chế môi trường cũng cần được chú trọng. Với loại môi trường này nhất thiết phải sử dụng nước cất tinh khiết để pha chế.

2.3.1.2. Môi trường thành phần không xác định

(Môi trường tự nhiên hoặc bán tổng hợp) (Undefined medium, complex medium).

Môi trường có chứa các hợp chất có thành phần không xác định rõ ràng như các chất chiết từ mô động, thực vật hay tế bào nấm men.

Ngoài các chất chiết tự nhiên, môi trường còn có cả các hoá chất có thành phần xác định. Ví dụ như môi trường A ở trên được bổ sung thêm pepton.

2.3.2. Phân loại theo chế độ dinh dưỡng

2.3.2.1. Môi trường tối thiểu (Minimal medium)

Loại môi trường cung cấp nhu cầu tối thiểu của VSV, không dư thừa. Ví dụ, nếu một loại VSV nào đó chứa thông tin di truyền sinh tổng hợp tất cả các loại axit amin cần thiết của chúng thì không cần thêm axit amin vào môi trường. Hoặc nếu VSV bình thường cần 2 loại axit amin, chỉ cần bổ sung 2 loại đó mà không cần thêm bất kỳ loại nào khác.

Tuỳ từng trường hợp, môi trường tối thiểu cho từng loại VSV khác nhau cũng khác nhau. Nhiều môi trường tối thiểu chỉ dùng để nuôi cấy một phạm vi tương đối hẹp các VSV.

2.3.2.2. Môi trường đủ hoặc giàu (All purpose hoặc Rich medium)

Môi trường chứa hàng loạt chất dinh dưỡng vượt xa nhu cầu tối thiểu của VSV. Môi trường giàu trợ giúp sinh trưởng của nhiều loại VSV. Trong môi trường giàu, VSV sinh trưởng và phát triển nhanh và tốt hơn so với môi trường tối thiểu. Sở dĩ như vậy là vì các nguồn dinh dưỡng mà VSV cần có thể lấy dễ dàng từ các hợp chất như axit amin, axit béo, vitamin, nucleic có sẵn trong môi trường.

2.3.3. Phân loại môi trường theo công dụng

2.3.3.1. Môi trường chọn lọc hay môi trường tuyển chọn (Selective medium)

– Môi trường này đảm bảo cho sự phát triển của các VSV mà ta mong muốn và ức chế sự phát triển của các VSV ngoài ý muốn.

– Môi trường chọn lọc chủ yếu dùng để phân lập các chủng VSV thuần khiết từ tự nhiên hoặc dùng để nuôi cấy tích lũy (enrichment).

– Có 2 cách làm tăng tính chọn lọc của môi trường:

+ Cho thêm chất ức chế các VSV không mong muốn nhưng không ảnh hưởng tới sinh trưởng của các loại VSV ta định nuôi cấy hoặc tuyển chọn. Các chất ức chế bao gồm các loại thuốc nhuộm như tím kết tinh (crystal violet), các chất kháng sinh, các chất chống nấm, NaN_3 ,... Nồng độ cao của muối, đường tác động đến áp suất thẩm thấu của tế bào được sử dụng như một nhân tố để chọn lọc VSV.

+ Loại bỏ một chất mà các VSV khác cần tới khiến chúng không phát triển được.

2.3.3.2. Môi trường phân biệt (differential medium)

Môi trường phân biệt cho phép nhiều loại VSV phát triển và phân biệt nhanh chóng loài này với loài khác. Ví dụ môi trường có chứa bromocresol (chất chỉ thị màu) trợ giúp sinh trưởng của nhiều loài VSV nhưng dựa vào khả năng chuyển màu của chất chỉ thị có thể nhận biết ngay loại nào có khả năng hình thành axit từ đường.

2.3.3.3. Môi trường chọn lọc – phân biệt (Selective – differential medium)

Môi trường này bao gồm cả 2 chức năng chọn lọc và phân biệt. Nó giúp cho việc chọn lọc một nhóm nhỏ VSV, đồng thời phân biệt chúng với những nhóm VSV khác.

2.3.4. Phân loại môi trường theo trạng thái vật lý

2.3.4.1. Môi trường lỏng (dịch thể) – Liquid medium

Thường được sử dụng để nuôi cấy VSV nhằm thu nhận sinh khối, các sản phẩm trao đổi chất (enzym, kháng sinh, vitamin,...) hay phát hiện các đặc điểm sinh hoá, để giữ giống và bảo quản nhiều loại VSV không phát triển được tốt trên các môi trường đặc.

2.3.4.2. Môi trường đặc (cố thể) – Solid medium

– Để làm đông môi trường, người ta thường sử dụng thạch (agar), đôi khi sử dụng gelatin (keo da, xương động vật), hoặc sử dụng silicagel (chế tạo từ thủy tinh lỏng và HCl).

– Môi trường đặc dùng để phân lập giống thuần khiết, đếm số

lượng VSV, giữ giống VSV, nghiên cứu hình thái khuẩn lạc, hoạt động đối kháng,...

– Thạch là một loại polysaccharit chiết từ một loại tảo biển. Vì không bị VSV phân giải nên thạch là chất làm đông môi trường khá lý tưởng. Trong nước, thạch nóng chảy ở gần 100°C và đông đặc ở khoảng 43°C . Thạch thường được bổ sung vào môi trường với số lượng khoảng 16 – 20g/l. Trong môi trường trung tính, hơi axit hoặc hơi kiềm, thạch vẫn giữ được khả năng tạo gel khá bền vững. Trong môi trường axit ($\text{pH} < 5,0$) thạch bị thủy phân trong quá trình khử trùng, mất tính tạo gel sau khi để nguội.

2.3.4.3. Môi trường mềm

Thường sử dụng để giữ chủng vi sinh vật. Thạch được bổ sung với số lượng 6 – 10g/l.

2.3.4.4. Môi trường bán lỏng

Thêm thạch vào với lượng 2 – 5 g/l. Do nồng độ oxy xâm nhập vào bên trong môi trường bán lỏng chỉ ở mức độ nhất định nên môi trường này được sử dụng để nuôi các vi khuẩn hảo khí (microaerophilic).

2.3.4.5. Môi trường xốp

Môi trường xốp được ứng dụng trong sản xuất (VSV học công nghiệp). Chất xốp như trấu, cám,... được trộn với các thành phần dinh dưỡng khác.

2.4. CHUẨN BỊ MÔI TRƯỜNG

Cần đọc kỹ công thức cấu tạo môi trường, chuẩn bị các hoá chất và dụng cụ liên quan.

2.4.1. Pha chế

– Nhìn vào các công thức môi trường, lần lượt cân đong các thành phần. Đánh dấu vào công thức các thành phần đã cân hoặc đong. Nếu công thức có thạch thì nên đong nước cho vào nồi đựng, cân thạch cho vào nước để thạch ngấm nước, dễ tan khi được đun sôi và lần lượt cân đong các thành phần khác.

– Nếu môi trường phải đun nấu, ngoài thể tích nước theo công thức, nên bổ sung một lượng nhỏ nước để bù lại thể tích bay hơi khi đun (khoảng 15 – 20ml/l).

– Mỗi hoá chất xúc bằng một thìa riêng khi cân. Cho hoá chất hoặc các thành phần được cân lên đĩa có giấy cân một cách từ từ tới khi vừa đủ. Nắm vững cách sử dụng các loại cân.

Với các thành phần có hàm lượng nhỏ nên pha dung dịch mẹ (stock solution), tính hàm lượng có trong 1 đơn vị thể tích suy ra thể tích cần lấy để bổ sung vào môi trường.

Các loại bột gạo, ngô, cám được cân và cho vào nước lạnh, vừa đun vừa khuấy cho tới khi bột chín.

Các thành phần kém bền nhiệt như chất kháng sinh, vitamin,... phải được khử trùng theo phương pháp riêng (thường sử dụng màng lọc khuẩn).

Đôi khi một số thành phần được cân riêng, khử trùng riêng và chỉ được trộn lại với nhau sau khi đã khử trùng để tránh phản ứng tạo thành kết tủa khi toàn bộ thành phần được khử trùng chung (xảy ra khi có mặt đồng thời các muối phosphat và $MgSO_4$).

2.4.2. Đun môi trường

– Môi trường dịch thể: Nếu các thành phần tan đều trong nước thì không cần đun.

– Môi trường đặc: Đặt nồi lên bếp vừa đun, vừa khuấy đều bằng đũa thuỷ tinh. Khi môi trường sôi một lúc, thạch tan hết là được, tránh đun lâu nước bay hơi sẽ làm cạn môi trường. Hớt bọt hoặc lọc trong nếu cần.

2.4.3. Điều chỉnh pH

– Nếu môi trường ở dạng dịch thể trong suốt, không màu, không chứa các chất dính nhót như tinh bột, có thể đo pH bằng máy đo.

– Môi trường có màu, chứa các chất dính nhót không được đo pH bằng máy (điện cực dễ bị hỏng), nên sử dụng giấy đo pH. Cũng có thể nhận biết pH qua màu sắc của môi trường do các chất chỉ thị màu tạo nên.

– Nhìn chung, nếu các thành phần môi trường được cân đúng chính xác, các hoá chất đạt tiêu chuẩn, sau khi pha chế môi trường sẽ đạt được giá trị pH cần có. Nếu pH sai lệch quá lớn cần xem lại các khâu và phải pha lại môi trường. Nếu sai khác không lớn, có thể điều chỉnh bằng dung dịch kiềm (KOH, NaOH) hoặc axit (HCl, CH_3COOH) loãng, hoặc các muối theo chỉ dẫn ở công thức. Việc điều chỉnh pH cần

thận trọng để sau khi chỉnh xong, thể tích môi trường không bị thay đổi ngoài phạm vi cho phép.

Lưu ý: Khi pH môi trường thấp hơn 6,0 – 6,5 thì sẽ xảy ra việc pepton hoá gelatin và sau khi khử trùng, môi trường sẽ không đông lại được. Khi pH thấp hơn 5,0 sẽ xảy ra sự thủy phân và thạch mất khả năng tạo gel.

Nếu môi trường có phản ứng kiềm thì khi khử trùng sẽ xuất hiện kết tủa sắt, xuất hiện việc caramen hoá đường và đường trở nên không hấp thu được đối với vi sinh vật. Để tránh những hiện tượng này, các môi trường được dùng để nuôi cấy các vi sinh vật ưa axit, hoặc ưa kiềm phải được tiến hành khử trùng ở pH trung tính và sau khi hấp áp lực mới axit hoá, hoặc kiềm hoá môi trường. Ngoài ra có nhiều thành phần của môi trường thường được khử trùng riêng ở những chế độ pH không ảnh hưởng tới chúng, sau đó mới đưa vào môi trường một cách vô trùng với số lượng thích hợp.

Sau khi khử trùng, pH môi trường có thể bị thay đổi, đôi khi phải kiểm tra lại.

2.4.4. Phân phối môi trường vào các dụng cụ

– Dụng cụ được dùng phải vô trùng. Để khử trùng tốt, môi trường chỉ được rót tới 1/2 dung tích của vật chứa. Với các ống nghiệm làm thạch nghiêng chỉ rót khoảng 1/4 chiều cao ống và 1/2 với ống làm thạch đứng.

– Lớp môi trường càng dày việc tiệt trùng càng khó, hơn nữa ở áp lực cao môi trường sẽ sôi mạnh làm đẩy nút và phụt ra ngoài.

– Đối với các bình dùng để nuôi VSV hiếu khí trên máy lắc, chỉ rót khoảng 1/5 dung tích bình. Đối với bình dùng nuôi kỵ khí, sau khi khử trùng, dồn một số bình lại với nhau trong điều kiện vô trùng để đạt được thể tích cần thiết.

2.5. KHỬ TRÙNG MÔI TRƯỜNG DINH DƯỠNG

Khử trùng là một trong những biện pháp cần thiết và quan trọng nhất trong thực nghiệm vi sinh vật học. Thuật ngữ "khử trùng" bắt nguồn từ tiếng La tinh với nghĩa là sự "làm tuyệt dục". Trong vi sinh vật học, khử trùng được hiểu là làm chết tất cả mọi vi sinh vật. Tiến hành khử trùng môi trường, dụng cụ, thiết bị và các thứ khác để tránh sự phát triển lẫn lộn của các hệ vi sinh vật ngoại lai vào giống

đang nghiên cứu. Việc khử trùng môi trường và dụng cụ là việc bắt buộc phải làm khi thực hiện tất cả các bài tập.

2.5.1. Phương pháp khử trùng môi trường dinh dưỡng

Môi trường dinh dưỡng được khử trùng chủ yếu bằng cách hấp trong nồi hấp áp lực. Phương pháp này dựa trên nguyên tắc làm gia nhiệt các vật bằng hơi nước bão hoà dưới một áp suất lớn hơn áp suất của khí quyển. Khi áp suất hơi nước tăng lên thì nhiệt độ cũng tăng theo.

Tác dụng phối hợp giữa nhiệt độ cao và áp suất bảo đảm cho việc khử trùng thực hiện được tốt. Khi hấp áp lực sẽ làm tiêu diệt cả tế bào dinh dưỡng lẫn bào tử của vi sinh vật. Khi ghi chế độ khử trùng bằng các đơn vị áp suất 0,5; 1,0; 1,6; 2,0atm, có nghĩa là người ta muốn nói đến các áp suất bổ sung. Việc tăng áp suất hơi nước được tạo ra trong những thiết bị đậy kín thành dày, đóng kín các nồi hấp áp lực.

2.5.2. Chế độ khử trùng môi trường

– Nhiệt độ và thời gian khử trùng bằng cách hấp áp lực trước hết được quyết định bởi thành phần của môi trường dinh dưỡng. Các cơ chất có chứa những chất không bền đối với nhiệt độ 120°C phải được khử trùng ở 0,5atm. Sữa, dịch tự phân nấm men, nước nấm men và các môi trường chứa gelatin được khử trùng ở 0,5atm trong 15 phút. Các môi trường có chứa đường, chẳng hạn như môi trường mạch nha, môi trường nước ép thực vật được khử ở 0,5atm trong 20 – 30 phút. Canh thịt – pepton và thạch – thịt – pepton được khử trùng ở 1atm trong 20 – 30 phút. Môi trường khoai tây, nước chiết đất được khử trùng ở 1,5atm trong 30 phút.

– Để lựa chọn chế độ khử trùng phải tính đến pH của môi trường. Khi môi trường có phản ứng axit, các hợp chất cao phân tử trong đó có thể bị thủy phân khi hấp áp lực.

– Với các thành phần môi trường kém bền nhiệt, có thể khử trùng theo các cách sau:

+ Phương pháp Pasteur: đun nóng dung dịch ở $80^{\circ}\text{C}/15$ phút rồi làm nguội ngay.

+ Phương pháp Tyndal: đun sôi cách thuỷ dung dịch trong 30 phút, lặp lại 3 lần, mỗi lần cách nhau 24 giờ.

Hai phương pháp này chỉ có thể diệt các tế bào dinh dưỡng, không diệt được các bào tử kháng nhiệt.

+ Sử dụng màng lọc vi khuẩn: thường dùng để khử trùng các thành phần như chất kháng sinh, vitamin,... Kích thước của lỗ màng lọc vào khoảng $0,2 - 0,45\mu\text{m}$. Lọc khuẩn không loại được virus.

2.5.3. Cách làm đĩa thạch vô trùng

- Các đĩa petri phải mới được khử trùng trong vòng 24 giờ.
- Bình môi trường mới được khử trùng, để nguội đến $50 - 60^{\circ}\text{C}$ rồi mới đổ ra đĩa. Không đổ khi môi trường nóng $> 60^{\circ}\text{C}$ để tránh hơi nước đọng trên nắp đĩa và mặt thạch sẽ dẫn đến dễ bị tạp nhiễm trong quá trình nuôi cấy. Trước khi đổ nên quay tròn bình để trộn đều môi trường, tránh lắng mạnh sinh bọt khí.
- Tiến hành đổ môi trường ra đĩa petri trong điều kiện vô trùng (sử dụng phòng vô trùng hoặc tủ cấy vô trùng đã được lau cồn và khử trùng bằng tia tử ngoại). Tay người làm cũng phải được khử trùng bằng cồn hoặc dung dịch sát khuẩn.
- Sau khi đổ môi trường ra đĩa, nếu thấy các bọt khí phải dùng que cấy nung nóng đỏ châm vỡ bọt khí khi thạch còn nóng, chưa đông. Để yên cho thạch đông trong đĩa và nguội dần đến nhiệt độ phòng. Xếp các đĩa môi trường thành từng chồng, bao kín bằng giấy vô trùng.
- Có thể làm khô mặt thạch và kiểm tra độ vô trùng bằng cách mở hé nắp đĩa trong tủ cấy thổi khí vô trùng, hoặc đặt các gói petri theo chiều ngược trong tủ ấm 2 - 3 ngày. Sau đó, chọn lựa các đĩa không nhiễm VSV để sử dụng.

2.5.4. Cách làm môi trường thạch nghiêng

- Trước tiên cần lau sạch mặt bàn nơi sẽ đặt thạch nghiêng, đặt một thước (gỗ, nhựa) sạch cao khoảng 2 - 3cm lên mặt bàn, khử trùng mặt bàn và thước bằng cồn. Trải một mảnh vải hoặc giấy vô trùng trùm lên mặt bàn và thước gỗ.
- Sau khi khử trùng trong nồi hấp áp lực, cần làm nguội các ống môi trường ở nhiệt độ phòng hoặc dưới quạt mát một lúc đến khi chỉ còn khoảng $50 - 60^{\circ}\text{C}$ để tránh hơi nước đọng lại nhiều trên bề mặt thạch.

Nhẹ nhàng đặt ống môi trường nằm trên lớp vải hoặc giấy vô trùng, đầu có nút kê trên thước, điều chỉnh sao cho mép thạch cách xa nút bông 3 - 4cm. Đặt các ống thành hàng sát nhau, hết một hàng lại đặt tiếp hàng sau gối lên hàng trước. Đối với ống thạch dùng để

giữ giống VSV, chỉ cần đặt nghiêng vát một chút để môi trường giữ được độ ẩm trong thời gian dài.

– Nếu có đủ dụng cụ, có thể cho các ống môi trường có cùng kích cỡ vào giá đựng nhiều hàng, rồi đặt cả giá ống nghiệm nghiêng đều một góc trên thước. Do tính chất đồng đều của các ô trên giá sẽ giúp các ống môi trường được nghiêng đều như ý muốn. Cách này giúp thao tác đặt nghiêng được nhanh và bề mặt thạch nghiêng đều hơn, có thể dễ dàng thực hiện với một số lượng lớn môi trường.

– Trong quá trình làm thạch đông, không được rung bàn hay rung ống thạch. Sau khi thạch đông, ống nguội hẳn mới gói các ống thạch nghiêng bằng giấy vô trùng, đặt vào tủ ẩm $30 - 37^{\circ}\text{C}$ để kiểm tra độ vô trùng và làm khô mặt thạch. Sau vài ngày lấy ra quan sát kỹ bề mặt thạch phát hiện các khuẩn lạc VSV. Soi ống nghiệm dưới ánh đèn để tìm các khuẩn lạc chìm trong thạch. Những ống thạch nghiêng vô trùng (không chứa các khuẩn lạc VSV) được dùng để làm thí nghiệm và giữ giống VSV.

BÀI SỐ 3

NUÔI CẤY VI SINH VẬT

Mục đích, yêu cầu

- Hiểu rõ yêu cầu đối với nghiên cứu VSV là mọi dụng cụ và điều kiện làm việc phải tuyệt đối vô trùng.
- Biết được các kỹ thuật nuôi cấy VSV thông dụng.
- Biết được mỗi loại vi sinh vật yêu cầu môi trường và điều kiện nuôi cấy khác nhau.

Nội dung

- Thực hành thao tác nuôi cấy vô trùng trên đĩa thạch và ống thạch nghiêng.
- Phương pháp rĩa cấy phân lập VSV.
- Xác định môi trường chuyên tính thích hợp cho một số loại VSV.

I- KỸ THUẬT VÔ TRÙNG

Trong phòng thí nghiệm, VSV được nuôi cấy nhằm để dễ dàng xác định và kiểm tra khả năng sinh trưởng cũng như trao đổi chất của chúng. VSV được nhiễm hoặc đưa vào trong môi trường nuôi cấy giúp giữ cho chúng sống, hoạt động và để nghiên cứu sự sinh trưởng của chúng. Việc nhiễm VSV phải được thực hiện trong điều kiện không có các VSV không mong muốn khác, hoặc không bị tạp nhiễm trong môi trường nuôi cấy. Kỹ thuật vô trùng được sử dụng trong nghiên cứu VSV nhằm loại trừ các sự tạp nhiễm.

Tất cả các môi trường nuôi cấy được khử trùng trước khi sử dụng. Việc khử trùng thường được thực hiện bằng sử dụng nồi hấp áp lực. Các dụng cụ chứa môi trường như ống nghiệm hay đĩa petri không nên mở ra cho tới khi thực sự làm việc với chúng, và thậm chí sau đó cũng vậy.

Cả hai phương pháp nuôi cấy trên đĩa petri hay trong ống nghiệm cung cấp số lượng lớn VSV trong một diện tích nhỏ và dễ dàng cho việc

vận chuyển. Thạch nghiêng là các ống nghiệm chứa môi trường đặc đã được đặt nghiêng trong khi thạch đông lại. Thạch nghiêng giống như đĩa Petri cung cấp một bề mặt sinh trưởng cho VSV nhưng ống thạch nghiêng thì dễ bảo quản và vận chuyển hơn. Thạch cho phép làm đông cứng ở tận đáy ống nghiệm tạo ra một môi trường thạch sâu. Độ sâu thường được sử dụng cho VSV cần ít oxy hơn lượng đang có trên bề mặt môi trường. Môi trường thạch bán rắn chỉ chứa 0,5 – 0,7% thạch thay cho 1,5% thạch, có thể thường sử dụng để xác định liệu VSV có di động được hay không. Vi khuẩn di động được sẽ chuyển động từ điểm nuôi cấy tạo ra sự xuất hiện của “cây noen” đảo ngược.

Sự cấy truyền và nhiễm VSV thường được thực hiện với một que cấy vô trùng, được phủ một dây Niken–crom không bị ăn mòn, chịu nhiệt. Trong đó, đoạn cuối của dây được uốn cong thành một cái móc vòng, nó được gọi là một que cấy tròn; nếu đầu dây kim loại thẳng thì gọi là que cấy thẳng. Đối với những mục đích đặc biệt, sự nuôi cấy có thể cũng được cấy chuyển với các miếng gạc cotton, pipet, que gạt thuỷ tinh hoặc xilanh vô trùng. Những kỹ thuật này rất thông dụng trong nghiên cứu VSV.

Một que cấy tròn hay thẳng được sử dụng phụ thuộc vào dạng (trạng thái) của môi trường. Người ta có thể quyết định trong khi làm thí nghiệm tùy điều kiện và mục đích thí nghiệm.

1.1. VẬT LIỆU THÍ NGHIỆM

- Ống nghiệm chứa môi trường nước thịt.
- Ống nghiệm chứa môi trường thạch nghiêng.
- Ống nghiệm chứa môi trường thạch bán rắn.
- Que cấy đầu tròn, que cấy đầu thẳng.
- Giá ống nghiệm, thuốc nhuộm Gram.
- Nuôi cấy: dịch vi khuẩn *Lactococcus lactic*, *Pseudomonas*.

1.2. TIẾN HÀNH THÍ NGHIỆM

Tiến hành thí nghiệm theo thủ tục sau:

a) Thực hiện với chỉ một loại dịch vi khuẩn trong 1 lần, ngăn chặn bất kỳ sự trộn lẫn hoặc nhiễm chéo. Bắt đầu với một loại nước canh thang, nhẹ nhàng khoá đáy và lắc đều lắng cặn.

b) Để cấy vào dung dịch nước thịt, giữ que cấy có giống VSV trong tay thuận, một ống môi trường ở tay kia.

Bước 1: Khử trùng đầu que cấy tròn bằng cách giữ trên ngọn lửa (đèn gas hoặc đèn cồn) cho đến khi nóng đỏ.

Bước 2: Giữ que cấy giống như một cái bút, uốn cong ngón tay út phối hợp với lòng bàn tay nhẹ nhàng rút nút ra khỏi ống nghiệm trong khi quay ống. Không được đặt nút lấy ra xuống mặt bàn làm việc.

Bước 3: Giữ ống nghiệm nghiêng một góc, chuyển miệng của ống nghiệm hướng về ngọn lửa. Luôn giữ ống nuôi cấy và ống môi trường mới ở độ nghiêng để giảm thiểu lượng bụi bẩn có thể rơi vào trong ống. Không để đầu ống nghiệm quá xa hoặc dung dịch sẽ cấy rời khỏi nút.

Bước 4: Nhúng đầu que cấy tròn đã khử trùng, được làm nguội vào dung dịch nước thịt để lấy một vòng sức căng bề mặt dịch nuôi cấy. Đưa que cấy ra ngoài, trong khi cầm que cấy đốt miệng ống nghiệm và đút nút lại bằng cách quay ống vào nút. Đặt ống nghiệm vào giá.

Bước 5: Lấy đầu nút ra khỏi một ống nghiệm chứa môi trường nước thịt đã khử trùng, hơ miệng ống trên ngọn lửa. Nhúng đầu que cấy có giống VSV vào môi trường và sau đó vẽ một đường từ đáy ống. Hơ miệng ống môi trường và đậy nút lại trước khi đặt lên giá.

Bước 6: Khử trùng lại đầu que cấy đến khi nóng đỏ rồi để nguội. Nhiều khi người ta hay cầm nhiều ống nghiệm trên tay trong cùng một lần cấy. Không nằm ngoài mục đích giữ và cấy chuyển giữa các ống nghiệm nhưng phải thực hiện được kỹ thuật cấy chuyển vô trùng.

c) Đối với môi trường thạch nghiêng, lặp lại bước 1 – 4 và cấy trên thạch nghiêng bằng cách di chuyển đầu que cấy nhẹ nhàng ngang trên mặt thạch từ đáy ống lên phía đỉnh, phải cẩn thận để không chọc thủng mặt thạch. Hơ miệng ống nghiệm trên ngọn lửa và đút nút lại. Khử trùng đầu que cấy, để nguội, dán nhãn trên ống nuôi cấy.

d) Đối với môi trường thạch bán rắn, sử dụng que cấy thẳng, lặp lại bước 1 – 4. Cấy sâu vào môi trường bằng cách đâm sâu đầu que cấy thẳng vào giữa, sau đó rút ra. Hơ miệng ống nghiệm trên ngọn lửa và đậy nút lại. Đốt nóng que cấy, để nguội, dán nhãn ống nuôi cấy.

e) Nuôi các ống nuôi cấy ở 35°C với thời gian thích hợp.

f) Ghi nhận hiện tượng xuất hiện ở mỗi ống nuôi cấy, tham khảo các hình mẫu.

g) Xem mùi vị xuất hiện của các ống nuôi cấy. Nhuộm Gram và so sánh chúng.

II- KỸ THUẬT PHÂN LẬP VI SINH VẬT BẰNG PHA LOÃNG

- Trong tự nhiên, hầu hết VSV sinh trưởng trong môi trường có chứa nhiều loại VSV khác nhau. Việc nuôi cấy hỗn hợp ít được sử dụng trong nghiên cứu VSV bởi vì khó khăn trong việc xác định riêng rẽ từng loại, vì khi đó chúng cùng các vi sinh vật khác cùng biểu lộ các hoạt tính. Nuôi cấy thuần khiết, chỉ chứa một loại VSV đơn là yêu cầu trong các khái niệm nghiên cứu như đặc tính, bệnh phát sinh, trao đổi chất và khả năng kháng kháng sinh,...

- Trong những năm 1970, Joseph Lister đã đặt vấn đề nuôi cấy thuần khiết bằng cách tiến hành dây pha loãng tới khi mỗi một ô về mặt lý thuyết chỉ chứa một vi khuẩn. Tuy nhiên, sự thành công là rất giới hạn và sự tạp nhiễm (có mặt các VSV không mong muốn) rất phổ biến. Năm 1980, Robert Koch đặt nền móng cho môi trường đặc, nhờ đó các nhà VSV học có thể tách rời VSV bằng pha loãng và thu nhận chúng trên môi trường đặc. Một vi khuẩn được phát hiện dựa trên sự hình thành khuẩn lạc có thể nhìn thấy được chỉ chứa một loại VSV.

- Hiện nay có 3 phương pháp nuôi cấy thường được sử dụng để phân lập VSV: rĩa đĩa, gạt đĩa và đổ đĩa.

+ Trong kỹ thuật rĩa đĩa, một que cấy tròn được sử dụng để tạo vệt mẫu trộn nhiều lần trên bề mặt của môi trường nuôi cấy rắn trong đĩa petri. Về mặt lý thuyết, dùng que cấy tròn tạo vệt nhắc lại cho bề mặt thạch, VSV lần lượt rời khỏi que cấy được phân bố đồng đều trên mặt thạch, mỗi tế bào sẽ phát triển thành một khuẩn lạc. Cấy rĩa đĩa là một kỹ thuật phân lập đang được sử dụng ngày nay.

+ Cấy gạt và đổ đĩa là kỹ thuật định lượng cho phép xác định số lượng VSV trong một mẫu cơ chất. Trong kỹ thuật gạt đĩa, một số lượng nhỏ mẫu pha loãng xác định được gạt trên đĩa môi trường đặc bằng cách sử dụng một que uốn cong (hình dạng giống như một chiếc gậy hockey). Trong kỹ thuật đổ đĩa, một lượng nhỏ mẫu pha loãng được trộn với thạch nóng chảy và đổ trực tiếp vào đĩa petri vô trùng còn rỗng. Sau khi nuôi, VSV sinh trưởng có thể nhìn thấy là các khuẩn lạc trên hoặc trong đĩa thạch đã đổ. Để xác định số lượng VSV trong một mẫu ban đầu, các

đĩa với số khuẩn lạc từ 25 – 250 được lựa chọn. Ít hơn 25 khuẩn lạc là không đúng bởi vì một sự tập nhiễm đơn gây ra ít nhất 4% sai số. Một đĩa có lớn hơn 250 khuẩn lạc thì khó đếm. Số lượng VSV trong mẫu ban đầu được tính theo phương trình sau:

$$\text{VSV/ml} = \frac{\text{Số lượng khuẩn lạc}}{\text{Độ pha loãng}}$$

2.1. VẬT LIỆU

Đĩa petri chứa môi trường thạch.

Ống nghiệm chứa thạch nóng chảy.

Đĩa petri vô trùng, bình nón 250ml.

Pipet 1ml vô trùng, pipet bóp bóng.

Môi trường thạch nghiêng.

Dịch nuôi cấy: 2 loại vi khuẩn.

2.2. TIẾN HÀNH THÍ NGHIỆM

a) Dán nhãn vào đáy của 2 đĩa môi trường tương ứng với 2 loại dịch nuôi cấy.

b) Khử trùng que cấy: hơi nóng đỏ đầu que cấy, làm nguội rồi lấy vô trùng một vòng que cấy dịch VSV.

c) Thao tác tạo vết cấy có thể thực hiện với các đĩa petri đặt trên bàn hoặc trên tay.

- Nhấc một mép của đĩa petri lên và cấy ở phần đầu tiên bằng cách tạo các đường không chồng nhau (đường dích dắc). Không được làm xước mặt thạch trong khi cấy.

- Khử trùng que cấy, quay đĩa tiếp và ria qua một khu vực của phần thứ hai sang phần thứ ba hoặc ria trên phần còn lại của bề mặt thạch, cần cẩn thận tránh tạo các đường chạm vào các phần cấy trước đó.

- Khử trùng que cấy trước khi cắm lại vào giá đựng.

d) Có thể ria cấy trên nhiều đĩa với một vài loại dịch VSV. Sau đó dán nhãn, ghi tên người thực hiện, ngày và nguồn dịch nuôi cấy.

e) Nuôi các đĩa vừa cấy ở 30 – 35°C trong tủ định ôn cho tới khi phát hiện các khuẩn lạc riêng rẽ phát triển (thường từ 24 – 48h). Chú ý khi đặt các đĩa petri trong tủ phải để ngược lại cho phần nắp đĩa xuống phía dưới.

f) Sau khi nuôi cấy, ghi lại kết quả.

g) Tiếp tục cấy chuyển từ một khuẩn lạc đơn dòng sang đĩa môi trường mới nhiều lần cho đến khi thu được giống thuần khiết. Sau đó cấy từ một khuẩn lạc trên đĩa đã thuần vào ống môi trường thạch nghiêng để giữ giống.

III- MÔI TRƯỜNG CHUYÊN TÍNH

– Môi trường chuyên tính được sử dụng để phân lập các VSV mà số lượng là giới hạn trong dịch pha loãng có nhiều VSV ưu thế khác nhau. Ví dụ, nếu dịch để phân lập có 1 triệu tế bào vi khuẩn A và chỉ có 1 tế bào vi khuẩn B, vi khuẩn B có thể bị hạn chế trong phần rìa cấy thứ nhất ở đĩa phân lập. Để giúp phân lập các VSV thiểu số, các phương pháp nuôi cấy làm giàu và chọn lọc có thể làm tăng cường sự sinh trưởng của một số VSV và hạn chế sự sinh trưởng của các VSV khác. Môi trường chọn lọc chứa các hoá chất ngăn chặn sự sinh trưởng của các VSV không mong muốn mà không ảnh hưởng tới sự sinh trưởng của các VSV cần phân lập. Môi trường làm giàu chứa các hoá chất kích thích sự sinh trưởng của các VSV mong muốn. Các VSV khác sẽ sinh trưởng nhưng sự sinh trưởng của các VSV mong muốn sẽ được tăng lên.

– Môi trường chuyên tính là môi trường mà chỉ tạo điều kiện cho sự phát triển thuận lợi của VSV A mà không tạo điều kiện thuận lợi cho VSV B (hay VSV B không phát triển hoặc phát triển kém trên môi trường này).

Dựa vào môi trường chuyên tính mà xác định được VSV A thông qua việc hình thành khuẩn lạc của VSV đó.

– Một loại môi trường hữu ích khác để phân lập VSV là môi trường phân biệt. Môi trường này chứa vài loại dinh dưỡng cho phép khảo sát để phân biệt một loại VSV này với các loại khác bằng trao đổi chất hoặc thay đổi môi trường.

Do có nhiều phương pháp và nhiều loại môi trường nên phải chọn thủ tục phù hợp với loại VSV mong muốn. Ví dụ, nếu vi khuẩn B chịu được muối có thể được thêm vào môi trường nuôi cấy. Các điều kiện vật lý có thể được sử dụng để lựa chọn một loại vi khuẩn. Nếu vi khuẩn B có khả năng kháng nhiệt, mẫu có thể được đun lên trước khi

phân lập. Trong thí nghiệm này, sẽ xác định tiêu chuẩn sử dụng để chọn một môi trường nuôi cấy. Hai loại môi trường sẽ được so sánh.

3.1. VẬT LIỆU

- Đĩa petri chứa môi trường phenylethyl alcohol agar.
- Đĩa petri chứa môi trường trypton agar.
- Thuốc nhuộm Gram.
- Hỗn hợp dịch nuôi *E.coli* và *Staphylococcus*.

3.2. TIẾN HÀNH THÍ NGHIỆM

Môi trường trypton agar	Môi trường phenylethyl alcohol agar.
Trypton: 1,0%	Trypton: 1,0%
Cao thịt: 0,3g	Cao thịt: 0,3g
NaCl: 0,5g	Phenylethyl alcohol: 0,25
Agar: 1,5g	NaCl: 0,5 g

– Sử dụng một cái bút đánh dấu chia mỗi đĩa thành 3 phần bằng cách đánh dấu dưới đáy. Dán nhãn một phần trên mỗi đĩa cho mỗi loại dịch VSV.

– Rĩa mỗi loại dịch VSV trên mặt thạch.

– Đặt ngược các đĩa nuôi trong tủ định ôn ở 30 – 35°C. Ghi lại kết quả sau 24, 48 và 72h nuôi cấy. Nhuộm Gram các khuẩn lạc xuất hiện khác nhau và quan sát dưới kính hiển vi. Vẽ hình quan sát được.

BÀI SỐ 4

PHƯƠNG PHÁP LẤY MẪU PHÂN TÍCH VI SINH VẬT

Mục đích

- Hiểu rõ phương pháp và nguyên tắc lấy mẫu cơ chất để phân tích VSV.
- Nắm được các cách bảo quản và chuẩn bị mẫu cơ chất phân tích VSV.

Nội dung

- Phương pháp lấy mẫu cơ chất trên thực địa.
- Bảo quản mẫu.
- Chuẩn bị mẫu để phân tích VSV.

I- NGUYÊN LÝ

Mỗi một biện pháp kỹ thuật tác động vào đất hay cơ chất đều gây ra sự thay đổi sinh vật đất và hoạt động của chúng trong môi trường. Mức độ thay đổi hoạt tính phụ thuộc vào kích cỡ của mẫu cơ chất và việc xử lý mẫu tiếp theo (sàng, phơi khô hoặc làm lạnh các mẫu cơ chất tươi lấy từ thực địa).

II- XÁC ĐỊNH SỐ LƯỢNG MẪU VÀ DỤNG CỤ ĐỂ LẤY MẪU

2.1. XÁC ĐỊNH SỐ LƯỢNG MẪU CẦN LẤY

- Phụ thuộc vào mục tiêu, nội dung nghiên cứu mà định ra yêu cầu số lượng và vị trí lấy mẫu phải đại diện.
- Phụ thuộc vào điều kiện cụ thể ngoài thực địa, hay khu vực cần lấy mẫu phân tích.

Điều quan trọng nhất người lấy mẫu phải thực hiện là lấy mẫu sao cho đồng nhất và phải đại diện được khu vực, khoảnh đất hay cơ chất cho khu đó, vùng đó.

Ví dụ: số lượng tương ứng các mẫu cơ chất trong các đồng phế

thải, rác thải,... được lấy từ khu vực đã điều tra và được trộn lẫn để tạo thành một mẫu đại diện.

2.2. CÁC VẬT LIỆU CẦN CHUẨN BỊ ĐỂ LẤY MẪU

- Dụng cụ lấy mẫu (dao, kéo, lõi trụ, mai thuổng,...).
- Cồn, bông vô trùng.
- Xô đựng.
- Túi đựng mẫu.
- Thùng làm lạnh.

2.3. MẪU ĐẠI DIỆN

Các mẫu ngẫu nhiên có thể chỉ để trộn đều nếu chúng được lấy từ một khu vực đồng nhất và đại diện.

Ví dụ: Nếu lấy mẫu đất để phân tích VSV đất (cần dựa vào yêu cầu của mục tiêu nghiên cứu, độ chính xác đến đâu, lấy bao nhiêu mẫu, diện tích rộng hẹp của từng khoanh đất,...)

- Diện tích.
- Địa hình.
- Độ sâu theo tầng phẫu diện đất.
- Loại hình sử dụng đất (thậm chí lấy theo kiểu sử dụng đất).
- Cây trồng.
- Điều kiện độ ẩm.

Các mẫu đất cần được lấy khác biệt thực sự. Những khác biệt lớn trong vùng lân cận phải được loại trừ khỏi mẫu. Nếu chúng có tầm quan trọng đặc biệt thì mẫu phải được lấy riêng rẽ.

III- PHƯƠNG PHÁP LẤY MẪU VÀ VẬN CHUYỂN MẪU

3.1. NGUYÊN TẮC LẤY MẪU

- Để đảm bảo mẫu đại diện, các điểm lấy mẫu phải được phân bố ngẫu nhiên trong diện tích điều tra. Điều này tốt nhất được tiến hành theo phương pháp lấy điểm theo đường chéo, nếu địa hình đồng nhất và diện tích $< 1000\text{m}^2$ sẽ lấy 5 điểm đại diện.

- Lấy mẫu không nên gần bờ ruộng hoặc đường đi, vì số lượng VSV trong mẫu đất đó sẽ không đại diện cho khoảng đất ở chính vùng đó.

- Khi lấy mẫu, gạt bỏ lớp rễ, cỏ bề mặt (nếu có), sau đó cắt vuông

xuống phía dưới. Cứ như vậy lấy càng nhiều điểm càng tốt. Lấy được điểm nào lập tức phải cho ngay vào túi đựng mẫu để tránh sự nhiễm tạp.

- Nếu đề tài yêu cầu phân tích VSV theo phẫu diện đất, thì đào phẫu diện (như phần học thổ nhưỡng), sau đó lấy đất theo từng tầng riêng biệt để phân tích.

- Nếu ruộng lấy mẫu đang thâm canh các loại cây trồng cạn, mặt ruộng không đồng nhất, thì phải xem xét cụ thể thực địa để lấy mẫu sao cho đồng nhất và chính xác. Ví dụ: luống khoai, ngô, sắn, đậu, lạc, rau,... thì không được lấy đất ở trên mặt luống và ở dưới rãnh luống, mà phải lấy ở sườn luống, không được lấy gần gốc cây trồng.

- Lấy mẫu đất để phân tích tốt nhất vào thời gian đất tương đối ổn định, nghĩa là người dân không tác động nhiều vào đất (thường sau thu hoạch).

- Lấy mẫu từ các cơ chất khác, như: đồng rác thải, phế thải,... cũng cần phải xem xét rất cụ thể thực địa sao cho lấy mẫu chuẩn nhất, đại diện nhất khu vực nghiên cứu.

- Khối lượng cần lấy khoảng 200gam/1 mẫu.

- Lấy mẫu phân tích VSV phải đảm bảo nguyên tắc là vô trùng, tránh sự nhiễm tạp, lấy xong phải cho mẫu vào phích lạnh đựng mẫu (vì sinh sản của VSV cực nhanh, nếu không bảo quản trong điều kiện lạnh ngay, số liệu phân tích sẽ không chính xác).

3.2. VẬN CHUYỂN MẪU

Mẫu để phân tích VSV, tốt nhất lấy xong chuyển ngay về phòng phân tích để bảo quản. Trong quá trình vận chuyển mẫu không được làm thủng túi đựng mẫu và luôn luôn giữ trong phích lạnh (để kìm hãm sinh trưởng và phát triển của VSV trong mẫu).

3.3. BẢO QUẢN MẪU

- Tốt nhất khi mẫu đã về tới phòng thí nghiệm, cần xử lý mẫu và phân tích ngay (công việc xử lý mẫu phải được thực hiện trong phòng vô trùng để tránh tạp khuẩn vào mẫu phân tích).

- Nếu không kịp phân tích, thì phải bảo quản mẫu ở tủ lạnh, nhiệt độ $< 3^{\circ}\text{C}$.

- Mẫu được bảo quản không quá 30 ngày, tốt nhất phân tích càng sớm càng tốt.

BÀI SỐ 5

PHƯƠNG PHÁP PHÂN TÍCH VI SINH VẬT

Mục đích

- Giúp cho học viên biết và thực hành một số phương pháp phân tích VSV trong cơ chất.
- Nắm được phương pháp phân tích VSV (nuôi cấy trong môi trường dịch thể và trên môi trường rắn hoặc bán rắn).

Nội dung

- Giới thiệu phương pháp pha loãng (chuẩn bị dịch cấy).
- Nuôi cấy VSV trong môi trường dung dịch.
- Nuôi cấy VSV trên môi trường rắn, bán rắn.
- Kiểm tra kết quả nuôi cấy.
- Tính số lượng VSV trong 1 gam hay 1ml dịch môi trường.

I- CÁC BƯỚC PHÂN TÍCH

1.1. DỤNG CỤ PHÂN TÍCH

– Bình tam giác, bình cầu, ống nghiệm (dung tích: 10ml, 100ml, 250ml), pipet chia độ 0,1 – 1,0ml, 2ml, 5ml, 10ml), hộp nhôm, que cấy, que gạt, bi thuỷ tinh, giấy quỳ, khay men, cuốc, khoan,... Tất cả các dụng cụ đều phải tiệt trùng.

– Môi trường nuôi cấy VSV đã khử trùng (Bài 3).

1.2. CHUẨN BỊ BÌNH NƯỚC VÔ TRÙNG LÀM DÂY PHA LOÃNG

Chuẩn bị 10 bình tam giác hoặc bình cầu có dung tích 100ml hoặc 250ml. Cho vào mỗi bình 90ml nước máy (thường cho 92ml, vì khi khử trùng bốc hơi khoảng 2ml). Đem bình các bình đã có nước tiệt trùng hơi ở 1atm (121°C) qua 30 phút. Lấy ra để nguội sẽ được dây pha loãng, đánh số thứ tự từ 1 đến 10.

1.3. XÁC ĐỊNH ĐỘ ẨM MẪU CẦN PHÂN TÍCH

Cân 10 gam mẫu cơ chất tươi cho vào hộp nhôm, có thể cân cả khối lượng hộp nhôm khi chưa có mẫu phân tích, sau đó đem sấy ở tủ sấy nhiệt độ 105°C qua 4 giờ, đem hộp nhôm đã sấy ra cho vào bình hút ẩm cho đến khi nguội. Đem cân khối lượng, sau đó sấy nhiều lần như vậy đến khi khối lượng không thay đổi, thì tính độ ẩm của mẫu phân tích theo công thức sau:

$$\text{Độ ẩm } X\% = \frac{A - B}{B - C} \times 100$$

X: Độ ẩm %.

A: Khối lượng hộp + cơ chất còn ướt.

B: Khối lượng hộp + cơ chất đã sấy khô.

C: Khối lượng hộp.

Tính hệ số khô kiệt k:

$$k = \frac{1 - x}{1}$$

1.4. CHUẨN BỊ DÂY PHA LOÃNG

Muốn đếm được số lượng vi sinh vật dễ dàng, khi phân tích cần pha loãng cơ chất đến một độ nhất định. Cần lưu ý rằng, làm giảm mật độ VSV phải pha loãng tỷ lệ luôn luôn $= 1/10$.

– Cân 10g cơ chất cho vào bình thứ nhất đã có 90ml nước vô trùng, lắc 15 – 20 phút, trên máy lắc 150 lần/ phút. Như vậy chúng ta đã có dung dịch pha loãng 10^{-1} , nghĩa là tỷ lệ 1:10.

– Dùng pipet 10ml hút 10ml dung dịch ở nồng độ 10^{-1} cho vào 90ml nước ở ống bình thứ 2, lắc đều, chúng ta có nồng độ pha loãng 10^{-2} , tỷ lệ 1:100.

– Tiếp tục làm như vậy đối với các bình thứ 3, 4,... đến khi chúng ta có được dãy pha loãng cần thiết, tỷ lệ 10^{-3} , 10^{-4} ,...

Chú ý: Các pipet đều phải khử trùng, mỗi một nồng độ pha loãng phải dùng 1 pipet riêng.

Có thể chuẩn bị dãy pha loãng bằng ống nghiệm có chứa 9ml nước, hoặc bình tam giác có chứa 45ml nước vô trùng,... rồi đem khử trùng như làm với bình tam giác. Nếu làm bằng ống nghiệm, thì chỉ cân 1 gam cơ chất khô, hoặc 5 gam cơ chất khô. Nghĩa là ta vẫn tạo

được dây pha loãng tỷ lệ 1:10. Để phân tán đều dịch cơ chất trong ống nghiệm, dùng pipet hút dịch đưa lên, đưa xuống nhiều lần nhưng không thổi khí.

II- NUÔI CẤY

– Khi đã có dung dịch pha loãng rồi, dùng pipet 0,1ml lấy từ bình pha loãng nào đó trong dây pha loãng cấy vào trong môi trường đã chuẩn bị sẵn cho từng nhóm, hoặc từng giống VSV định phân tích. Mỗi nồng độ ít nhất phải cấy 3 – 5 lần nhắc lại (số lần nhắc lại càng nhiều, thì kết quả có độ tin cậy càng cao). Cấy ít nhất ở 3 nồng độ pha loãng liên tiếp. Cấy xong dùng que gạt thủy tinh vô trùng dàn đều dịch cấy trên mặt môi trường (nếu môi trường rắn hoặc bán rắn trên đĩa môi trường thạch). Còn cấy vào trong môi trường dung dịch trong các ống nghiệm, hoặc bình dung dịch dinh dưỡng, chỉ cần lắc nhẹ là xong.

Chú ý: Tất cả các hộp lồng, hoặc các bình môi trường thí nghiệm đều phải đánh số thứ tự theo nguyên tắc sau: số mẫu nghiên cứu, nồng độ pha loãng – số lần nhắc lại.

Ví dụ: 5.4.3 – nghĩa là mẫu phân tích số 5; cấy ở nồng độ pha loãng thứ 4; cấy ở đĩa môi trường có số lần nhắc lại thứ 3.

– Sau khi cấy xong cho đĩa, hoặc bình nuôi cấy vào trong tủ nuôi, nuôi ở nhiệt độ thích hợp cho từng chủng giống VSV khác nhau trong thời gian nhất định (có thể từ 48 – 72 giờ, có giống phải nuôi lâu hơn mới hình thành khuẩn lạc).

– Cùng một dung dịch cơ chất pha loãng có thể phân tích nhiều mặt như nấm, xạ khuẩn và các loại vi khuẩn,... bằng cách cấy vào môi trường thích hợp. Môi trường có thể là dịch thể, có thể là thạch bằng và từ những khuẩn lạc đã mọc trên môi trường thạch bằng và những đặc trưng của môi trường dịch thể, chúng ta có thể tính số lượng của vi sinh vật.

III- TÍNH SỐ LƯỢNG VI SINH VẬT

3.1. PHƯƠNG PHÁP THẠCH BẰNG (TRÊN MÔI TRƯỜNG THẠCH)

– Mỗi tế bào vi sinh vật trên môi trường thích hợp sẽ phát triển

và cho chúng ta một khuẩn lạc. Do đó số lượng khuẩn lạc cho ta biết số lượng vi sinh vật trong một gam cơ chất.

– Sau khi VSV đã mọc trên môi trường thạch đĩa (hộp lồng), đem đếm số lượng khuẩn lạc được hình thành bằng máy đếm khuẩn lạc, hoặc đếm trực tiếp theo phương pháp chia ô trên đĩa môi trường.

Kết quả được tính theo công thức sau:

$$S = T \times 10 \times N \times K$$

S: Số lượng vi sinh vật trong một gam cơ chất.

T: Số khuẩn lạc trung bình trong một hộp petri.

10: Số khuẩn lạc quy ra 1ml (vì lúc nuôi cấy trong hộp lồng chúng ta dùng 0,1ml dung dịch cơ chất).

N: Số nghịch đảo của nồng độ pha loãng.

K: hệ số khô kiệt (Nếu không quy đổi từ khô sang tươi).

3.2. TÍNH SỐ LƯỢNG VI SINH VẬT TRONG MÔI TRƯỜNG LỒNG (PHƯƠNG PHÁP ĐỊNH TÍNH)

Có những loại vi khuẩn không thể dùng mắt thường quan sát khuẩn lạc hoặc sản phẩm sinh ra cũng không có màu gì đặc biệt để đánh giá vi khuẩn hoạt động. Trong trường hợp này phải dùng phản ứng màu để xác định. Cứ mỗi ống nghiệm có phản ứng màu gọi là ống (+). Dựa vào các ống dương tính, căn cứ vào bảng Mc.Crady chúng ta tính ra số lượng vi sinh vật.

Ví dụ:

Độ pha loãng	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}
Số ống dương	3*	3*	3*	2*	1*	0

– Tìm số chỉ tiêu: 321

Số chỉ tiêu là con số có 3 hàng số. Hàng số đầu là số biểu hiện ở nồng độ loãng nhất các ống nghiệm đều dương. Hai số tiếp theo là số ống dương ở 2 nồng độ tiếp theo sau.

– Dếm số chỉ tiêu này tra bảng Mc.Crady ta sẽ có số lượng vi khuẩn tương ứng: 15.

– Từ con số này ta tính ra số lượng vi khuẩn trong một gam cơ chất theo công thức:

$$S = t \times 10 \times n \times k$$

S: Số lượng vi sinh vật.

t: Số lượng vi khuẩn tra bảng.

10: Số lượng vi khuẩn quy ra 1ml.

n: Số nghịch đảo của nồng độ pha loãng.

k: Hệ số khô kiệt.

$$S = 15 \times 10 \times 10^3 \times 1,52 = 2,28.10^5 \text{ tế bào/1g.}$$

BÀI SỐ 6

QUÁ TRÌNH CHUYỂN HOÁ NITƠ DƯỚI TÁC DỤNG CỦA VSV (AMÔN HOÁ, PHẢN NITƠ RAT HOÁ, CỐ ĐỊNH N_2)

Mục đích và yêu cầu

- Hiểu rõ vòng tuần hoàn nitơ trong đất, thấy được sự thay đổi hoá học xảy ra ở mỗi bước trong chu trình.
- Giải thích được tầm quan trọng của vòng tuần hoàn nitơ.
- Phân biệt quá trình cố định nitơ phân tử cộng sinh và tự do.

Nội dung

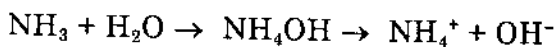
- Các phương pháp phân tích VSV trong quá trình chuyển hoá các hợp chất chứa nitơ trong môi trường.
- Thực hành trực tiếp các thí nghiệm về quá trình chuyển hoá nitơ trong môi trường.

I- NGUYÊN LÝ

Tiến hành các test thử chứng minh sự có mặt của vi khuẩn amôn hoá, phản nitrat hoá và cố định nitơ phân tử cộng sinh trong đất.

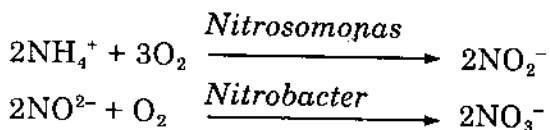
Vòng tuần hoàn nitơ là một khía cạnh nghiên cứu rộng rãi và ứng dụng quan trọng của vi sinh vật đất. Tất cả các sinh vật đều cần nitơ để tổng hợp protein, axit nucleic và các hợp chất chứa nitơ khác. Sự phục hồi nitơ bởi các sinh vật khác nhau được gọi là vòng tuần hoàn nitơ. Vi sinh vật đóng một vai trò cơ bản, không thể thay thế được trong vòng tuần hoàn nitơ do chúng tham gia rất nhiều phản ứng trao đổi chất khác nhau nhằm chuyển hoá các hợp chất chứa nitơ. Khi cây trồng, động vật và vi sinh vật chết đi, các vi sinh vật sẽ phân huỷ chúng bởi sự thủy phân protein và amôn hoá.

- Thủy phân protein là sự thủy phân các protein thành dạng amino axit. Amôn hoá giải phóng amoniac do khử amin hoá các amino axit hoặc đồng hoá ure thành NH_3 . Trong hầu hết môi trường đất, amoniac hoà tan trong nước tạo thành ion amôn:



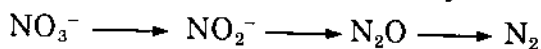
Một số ion amôn sẽ được cây trồng và vi sinh vật sử dụng trực tiếp để tổng hợp các axit amin.

– Bước tiếp theo trong vòng tuần hoàn nitơ là sự oxy hoá các ion amôn trong quá trình nitrát hoá. Hai giống vi khuẩn có khả năng oxy hoá NH_4^+ trong hai giai đoạn liên tiếp được chỉ rõ như sau:



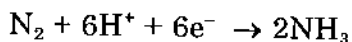
Những phản ứng này được sử dụng để sinh ra năng lượng (ATP) cho tế bào. Vi khuẩn nitrát hoá là các loài dị dưỡng hoá năng và nhiều loài bị ức chế bởi vật chất hữu cơ. Nitrát là một nguồn nitơ quan trọng cho cây trồng.

– Vi khuẩn phản nitrát hoá chuyển hoá nitrát và loại bỏ chúng khỏi vòng tuần hoàn nitơ. Phản nitrát hoá là quá trình biến đổi nitrát thành nitrit và khí nitơ. Sự chuyển hoá này có thể được trình bày như sau:



Phản nitrát hoá còn được gọi là hô hấp yếm khí. Nhiều giống vi khuẩn gồm có *Pseudomonas* và *Bacillus* có khả năng phản nitrát hoá trong điều kiện yếm khí.

– Nitơ không khí có thể quay trở lại đất bởi sự biến đổi khí nitơ thành amoniac, một quá trình được gọi là sự cố định nitơ. Các tế bào vi sinh vật có enzym nitrogenaza có thể cố định nitơ trong điều kiện yếm khí như sau:



Một số sinh vật tiên nhân sống tự do, ví dụ như *Azotobacter*, *Clostridium* và vi khuẩn lam có khả năng cố định nitơ. Nhiều loại vi khuẩn cố định nitơ sống liên kết chặt chẽ với rễ các loại cỏ trong đất vùng rẫy, nơi mà lông hút tiếp xúc với đất.

Vi khuẩn cộng sinh cung cấp một vai trò quan trọng hơn trong quá trình cố định nitơ phân tử. Một điển hình là mối quan hệ cộng sinh giữa *Rhizobium* và rễ cây họ đậu (như đậu tương, đậu xanh, đậu Hà Lan, cỏ *Alfalfa* và cỏ ba lá), có đến hàng nghìn loài đậu đỗ khác nhau. Nông dân đã trồng đậu tương và *Alfalfa* để tái tạo nitơ trong các cánh đồng của họ. Nhiều loại đậu đỗ hoang dại có thể sinh trưởng

trên những vùng đất nghèo dinh dưỡng tìm thấy ở rừng rậm nhiệt đới hoặc sa mạc khô cằn. Loài *Rhizobium* là đặc trưng cho từng loại cây chủ mà chúng nhiễm vào. Khi lông hút và vi khuẩn *Rhizobia* tiếp xúc trong đất, nốt sần rễ được hình thành trên cây chủ. Nốt sần cung cấp môi trường yếm khí cần thiết cho quá trình cố định nitơ.

Quá trình cố định nitơ phân tử cộng sinh cũng xảy ra trên rễ của các cây không thuộc họ đậu. Xạ khuẩn *Frankia* hình thành nốt sần trên cây tổng quán sủi.

Bất kỳ sự phá vỡ nào trong vòng tuần hoàn nitơ cũng có thể ảnh hưởng quyết định đến sự tồn tại của sự sống.

II- QUÁ TRÌNH AMÔN HOÁ

2.1. VẬT LIỆU

Ống môi trường canh thang pepton;	Đất ẩm;
Thuốc thử Nesler;	NH_4OH ;
Bản sứ lỗ tròn.	

2.2. TIẾN HÀNH THÍ NGHIỆM

– Hoà đất vào nước vô trùng tạo dung dịch. Lấy 1 vòng que cấy nhiễm vào ống môi trường canh thang pepton.

– Nuôi ở nhiệt độ phòng và làm test thử amonia ở sau 2 và 7 ngày.

– Test thử amonia: nhỏ 1 giọt dung dịch thuốc thử Nesler vào lỗ bản sứ. Thêm vào 1 vòng que cấy canh thang pepton đã cấy dịch đất, trộn đều. Màu vàng đến màu nâu chỉ ra rằng có amonia. So sánh kết quả với ô có nhỏ dung dịch thuốc thử với NH_4OH . Sử dụng ống nghiệm canh thang pepton không nhiễm dịch đất làm đối chứng.

III- QUÁ TRÌNH PHẢN NITRAT

3.1. VẬT LIỆU

Ống nghiệm chứa môi trường nước thịt – muối nitrat; Đất ẩm;
Thuốc thử nitrat A và B; Bụi kẽm.

3.2. Thủ tục tiến hành

– Xử lý một ống môi trường nước thịt – muối nitrat bằng dung dịch đất như trên. Nhiễm vào ống khác *P. aeruginosa*.

– Nuôi cả 2 ống ở nhiệt độ phòng trong 1 tuần.

– Kiểm tra sự chuyển hoá nitrat. Thêm 5 giọt nitrat A và 5 giọt nitrat B vào mỗi ống nuôi cấy và ống không xử lý, lắc nhẹ. Màu đỏ xuất hiện trong vòng 30 giây là test thử dương tính. Nếu ống kiểm tra không chuyển màu đỏ, thêm 1 lượng nhỏ bụi kẽm, ống thử chuyển sang màu đỏ là test thử âm tính, nếu không chuyển màu thì đó cũng là kết quả dương tính.

IV- QUÁ TRÌNH CỐ ĐỊNH NITƠ PHÂN TỬ

4.1. VẬT LIỆU

– Đĩa petri chứa môi trường thạch nấm men–manitol.

– Xanh methylen, dao lam, cây họ đậu.

4.2. TIẾN HÀNH THÍ NGHIỆM

– Cắt 1 nốt sần từ rễ cây đậu đỗ và rửa sạch dưới vòi nước chảy. Quan sát nốt sần.

– Cắt nốt sần thành 2 nửa bằng dao lam. Quan sát bên trong. Nghiền nốt sần giữa 2 lam kính và tạo vết bôi bằng cách quay 2 lam kính với nhau.

– Cấy rìa 1 vòng que cấy dịch nghiền trên môi trường thạch. Nuôi ở nhiệt độ phòng khoảng 7 ngày.

– Làm khô trong không khí lam kính có vết bôi và cố định lại bằng nhiệt. Nhuộm tiêu bản trong 1 phút bằng xanh methylen. Rửa và quan sát dưới vật kính dầu.

– Quan sát sự sinh trưởng của vi khuẩn trên đĩa. Nhuộm đơn bằng xanh methylen. So sánh hình thái vi khuẩn trên tiêu bản với tiêu bản đã chuẩn bị sẵn từ nốt sần.

BÀI SỐ 7

CHUYỂN HOÁ LƯU HUỖNH DƯỚI TÁC DỤNG CỦA VI SINH VẬT

Mục đích và yêu cầu

- Hiểu được vai trò của VSV trong việc đảm bảo vòng tuần hoàn lưu huỳnh.
- Vẽ biểu đồ vòng tuần hoàn lưu huỳnh xảy ra trong cột Vinogradskii.

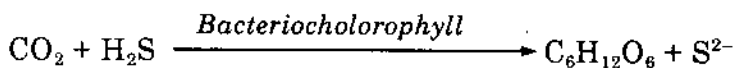
Nội dung

Quan sát sự sinh trưởng của vi khuẩn chuyển hoá lưu huỳnh trong cột Vinogradskii.

I- NGUYÊN LÝ CHUNG

Một trong những hướng nghiên cứu vi sinh vật đất là vòng tuần hoàn lưu huỳnh. Vi khuẩn lam và màu tía tham gia vào vòng tuần hoàn sinh hoá lưu huỳnh. Mặc dù sắc tố quang hợp của vi khuẩn lam được quyết định bởi sắc tố vi khuẩn, chúng vẫn có thể xuất hiện màu nâu do sự có mặt thêm của sắc tố quang hợp màu đỏ gọi là carotenoit. Vi khuẩn quang hợp màu tía xuất hiện màu tía, hoặc đỏ bởi vì có số lượng lớn carotenoit. Vi khuẩn màu tía cũng có sắc tố vi khuẩn.

Vi khuẩn quang hợp sử dụng sắc tố để sinh ra điện tử cho tổng hợp ATP và sử dụng lưu huỳnh, các hợp chất chứa lưu huỳnh, khí hydro hoặc các phân tử hữu cơ là nguồn cung cấp điện tử. Phương trình tổng quát cho quang hợp ở vi khuẩn là:



Một số vi khuẩn dự trữ các hạt lưu huỳnh trong, hoặc trên tế bào như là kết quả của sự sản xuất ion sunfit. Lưu huỳnh dự trữ có thể được dùng làm nguồn cung cấp điện tử trong quá trình quang hợp,

kết quả là tạo ra sunfat. Trong tự nhiên, sunfit hydro được sinh ra từ sự biến đổi sunfat trong hô hấp yếm khí và sự phân rã các amino axit có chứa lưu huỳnh. Sunfat có thể bị biến đổi thành sunfit hydro bởi 5 giống vi khuẩn chuyển hoá sunfat (rõ nhất là *Desulfovibrio*). CO_2 mà vi khuẩn quang hợp sử dụng được cung cấp bởi quá trình lên men hydratecarbon trong môi trường yếm khí.

Kỹ thuật nuôi cấy làm giàu bao gồm phương thức tái tạo môi trường được gọi là cột Vinogradskii sẽ được dùng cho bài tập này. Chúng ta sẽ sử dụng nó để tăng cường sự sinh trưởng của vi khuẩn chuyển hoá lưu huỳnh trong điều kiện yếm khí. Một vài loại vi sinh vật được nuôi cấy phụ thuộc vào sự phản ứng với ánh sáng và oxy sẵn có của chúng.

II- VẬT LIỆU

- Hỗn hợp bùn (bùn, CaCO_3 , cỏ khô hay giấy và CaSO_4).
- Ống nghiệm to hoặc ống đong.
- Que gạt.
- Bùn đất.
- Đệm Vinogradskii (NH_4Cl , Na_2S , KH_2PO_4 , K_2HPO_4).
- Giấy nhôm, nguồn sáng.

III- DỊCH NUÔI CẤY

Dịch nuôi cấy *Pseudomonas aeruginosa*.

IV- TIẾN HÀNH THÍ NGHIỆM

- Xếp chặt hỗn hợp bùn đến 2/3 chiều cao của một ống nghiệm lớn hoặc ống đong. Xếp chặt để hạn chế bọt khí trong ống.
- Cẩn thận xếp một lớp mỏng bùn đất lên trên cùng của lớp hỗn hợp bùn đầu tiên.
- Nhẹ nhàng đổ dung dịch đệm xuống cạnh của ống đong, chú ý không làm xáo trộn bề mặt bùn. Đổ đầy ống đong đến mức có thể.
- Đậy miệng ống bằng giấy nhôm và đặt ở phía trước một nguồn

sáng. Người hướng dẫn có thể ấn định các nguồn sáng khác nhau (ví dụ như ánh sáng nóng, huỳnh quang, đỏ hoặc xanh).

– Quan sát ống thí nghiệm mỗi tuần một lần trong 4 tuần. Ghi lại sự xuất hiện các khu vực màu sắc. Bùn hảo khí sẽ có màu hơi nâu và bùn yếm khí có màu đen.

– Sau 4 tuần, chuẩn bị tiêu bản giọt treo từ các vết xanh hoặc tím trong ống. Quan sát dưới kính hiển vi sự xuất hiện của vi khuẩn và xem có các hạt lưu huỳnh hay không?

BÀI SỐ 7

VI SINH VẬT PHÂN GIẢI LÂN (PHOSPHO)

Mục đích và yêu cầu

– Phương pháp phân lập, tuyển chọn giống VSV phân huỷ chuyển hoá lân.

– Thấy được tác dụng vi sinh vật trong quá trình phân giải phospho khó tan.

– Nhận biết được cường độ phân giải lân dưới tác dụng của VSV.

Nội dung

– Phân lập chủng giống VSV phân giải lân.

– Phương pháp bố trí thí nghiệm.

I- VI KHUẨN PHÂN GIẢI LÂN HỮU CƠ

Lân hữu cơ có thể được phân giải bởi nhiều loại vi sinh vật. Có thể dùng môi trường có thành phần sau để phân lập.

1.1. MÔI TRƯỜNG PHÂN LẬP

Loxitin	0,05g	MgSO ₄	0,3g
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,3g	FeSO ₄	vệt
CaCO ₃	5g	Gluko	10g
NaCl	0,3g	Nước	1000ml
MnSO ₄	vệt	Thạch	15 – 18g.

Lân hữu cơ có thể dùng loxitin hoặc axit nucleic.

1.2. DỤNG CỤ, NGUYÊN LIỆU

Ống nghiệm có 9ml nước vô trùng.

Ống hút 1ml và 10ml.

Hộp lồng đã tiệt trùng.

Ống nghiệm có thạch nghiêng.

1.3. CÁC BƯỚC THỰC HIỆN

Cân đất 10g. Cho vào bình tam giác có 90ml nước vô trùng. Lắc 10 phút. Pha loãng mẫu $10^{-2} - 10^{-5}$. Trong điều kiện không có axit nucleic hoặc lợxitin thì dùng lòng đỏ trứng gà. Dùng dung dịch NaClO 2% tiệt trùng trứng. Dùng nước cất rồi nước vô trùng rửa sạch NaClO. Luộc trứng. Lấy lòng đỏ nghiền nhỏ. Ngâm cồn gạn nước cồn. Làm như thế nhiều lần. Lọc. Dùng axeton kết tủa. Dùng rượu và axeton để hoà tan và kết tủa. Cuối cùng dùng rượu hoà tan, như thế có thể dùng được.

Cho môi trường vào ống nghiệm 1,8 x 18cm mỗi ống 15ml. Tiệt trùng $120^{\circ}\text{C}/15$ phút.

Nấu chảy môi trường, để nguội 50°C . Đổ vào hộp lồng mỗi hộp 15ml. Chờ môi trường đông lại. Dùng ống hút đã tiệt trùng lấy 0,1ml dung dịch đất ở nồng độ 10^{-3} hoặc 10^{-4} . Cấy lên trên mặt môi trường. Dùng que thuỷ tinh dàn đều khắp môi trường. Để ở $28 - 30^{\circ}\text{C}$ trong 3 – 4 ngày.

1.4. KIỂM TRA KẾT QUẢ

Trên mặt môi trường sẽ xuất hiện khuẩn lạc màu trắng đục có hình tròn, có nếp nhăn. Đây là khuẩn lạc của vi khuẩn phân giải lân hữu cơ.

Dùng que cấy lấy vi khuẩn làm tiêu bản – nhuộm đơn. Xem kính. Vi khuẩn hình que, hai đầu tròn, đứng riêng rẽ hoặc liên lại thành chuỗi. Lấy vi khuẩn này tiếp tục thuần hoá.

Chú ý: Có thể dùng lòng đỏ trứng trực tiếp, không qua rửa rượu và kết tủa bằng axeton. Cách làm như sau:

Rửa sạch vỏ trứng bằng NaClO 2% hoặc bằng cồn 95%. Dùng nước cất rồi nước vô trùng rửa sạch NaClO và cồn. Cho lòng đỏ trứng vào bình tam giác đã tiệt trùng. Cho vào 50ml nước vô trùng, đánh vào cho đều. Cho vào mỗi hộp lồng 1ml nước lòng đỏ trứng. Đổ môi trường vào. Lắc nhẹ, trộn đều và để đông lại. Lấy ống hút cho dung dịch cân phân lập vào. Mỗi hộp lồng cấy 0,5ml dung dịch đất. Để 2 – 3 hộp làm đối chứng. Để ở $28 - 30^{\circ}\text{C}$ trong 24 giờ. Thời gian nuôi cấy không được quá lâu vì dễ tạp vi khuẩn. Khuẩn lạc mọc. Lấy vi khuẩn làm tiêu bản, xem kính. Nếu đúng như vi khuẩn phân giải lân đã miêu tả trên thì tiếp tục cấy vào thạch nghiêng nhiều lần để thuần hoá.

II- VI SINH VẬT PHÂN GIẢI LÂN VÔ CƠ KHÓ TAN

2.1. MÔI TRƯỜNG

Saccharo	10g	MnSO ₄	0,03g
(NH ₄)SO ₄	0,5g	Fe ₂ (SO ₄) ₃ .7H ₂ O	0,03g
NaCl	0,3g	Ca ₃ (PO ₄) ₂	10g
KCl	0,3g	Thạch	20g
MgSO ₄	0,3g	Nước cất	1000ml

2.2. DỤNG CỤ VÀ NGUYÊN LIỆU

Bình tam giác;	Hộp lồng;
Ống nghiệm;	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ .2H ₂ O dung dịch;
HCl đậm đặc và 0,1N;	Bình định mức 50ml;
Dung dịch đất pha loãng;	Bèo dâu.

2.3. CÁC BƯỚC

Đổ môi trường vào các hộp lồng đã tiệt trùng. Dùng dung dịch đất 0,1ml đổ vào, san đều trên bề mặt môi trường. Để ở 28 – 30°C.

2.4. ĐÁNH GIÁ KẾT QUẢ

– Sau 5 – 7 ngày, quan sát khuẩn lạc và hình thái vi khuẩn. Khuẩn lạc trong nhò, lồi, đường biên thẳng. Xung quanh khuẩn lạc có vòng phân giải trong suốt. Vòng này lớn hay bé tùy vi khuẩn. Thường thì vòng phân giải bé và muốn xem phải lật ngược đĩa petri.

– Muốn đánh giá chắc chắn hơn nên kết hợp chặt chẽ giữa quan sát bằng mắt thường và dùng dung dịch Sulfomolybdatamon để kiểm tra kết quả có lân dễ tiêu không. Nếu có lân sẽ kết hợp với Sulfomolybdatamon thành hợp chất phospho molybdatamon màu vàng kết tủa.

– Quan sát vi khuẩn: Từ khuẩn lạc có vòng phân giải, lấy một ít vi khuẩn. Làm tiêu bản và quan sát dưới kính hiển vi. Vi khuẩn phân giải hợp chất lân khó tan thành dễ tan hình que. Đầu tròn có vỏ nhầy bé, có bào tử, Gram dương. Muốn thuần khiết thì cấy vào thạch nghiêng nhiều lần. Mỗi lần cấy đều kiểm tra dưới kính hiển vi.

– Để phân lập vi khuẩn phân giải hợp chất lân vô cơ khó tan thành dễ tan có thể dùng bèo dâu. Ở cánh bèo dâu và rễ điển thanh có nhiều vi khuẩn phân giải lân khó tan thành dễ tan.

Lấy cánh bèo dâu. Rửa qua nước máy cho sạch, nghiền nhỏ trong một ít nước vô trùng để tạo thành dung dịch. Lấy dịch bèo dâu cấy trên môi trường thạch phẳng. Để ở 28 – 30°C trong 5 – 7 ngày, quan sát khuẩn lạc và tế bào vi khuẩn dưới kính hiển vi.

Chú ý:

- Nghiền bèo dâu thành dịch để cho dễ cấy vào môi trường.
- Để xác định cường độ phân giải của vi khuẩn cần định lượng lân dễ tiêu trên máy so màu.

BÀI SỐ 9

XÁC ĐỊNH SINH KHỐI VI SINH VẬT ĐẤT

Mục đích

- Giới thiệu cho học viên hiểu được khả năng tạo sinh khối của VSV.
- Các phương pháp xác định sinh khối VSV.

Nội dung

- Hiểu được sinh khối vi sinh vật và ảnh hưởng của môi trường đến khả năng tạo sinh khối.
- Biết được phương pháp nuôi cấy VSV tạo sinh khối và những tác động đến quá trình tạo sinh khối VSV.

I- NGUYÊN LÝ CHUNG

Trong đất, vi sinh vật xuất hiện với mật độ và chủng loại rất lớn. Trong đó, vi khuẩn và nấm là các loài vi sinh vật phong phú nhất, nguyên sinh động vật và tảo xuất hiện với số lượng ít hơn. Phần sinh khối cacbon trong đất được tìm thấy có 1 – 3% cacbon hữu cơ (Sparling, 1985). Khảo sát trên đất canh tác cho thấy tỷ lệ sinh khối vi sinh vật do hoạt động trao đổi chất là 1 – 5 và 2 – 8% vật chất hữu cơ tương ứng trong đất trồng cây và đất đồng cỏ (Beck và cộng sự, 1992). Sinh khối được xác định dựa trên sự phân tích toán học các đường cong hô hấp cho thấy chỉ có 2 – 30% tổng sinh khối là hoạt động trao đổi chất.

Hoạt động của vi sinh vật đất tạo nên độ phì cho đất và thực hiện các chức năng trong hệ sinh thái:

- Hoạt động phân giải: Khoáng hoá cơ thể vi sinh vật, động, thực vật và các chất hữu cơ tổng hợp, huy động các chất dinh dưỡng vô cơ và các nguyên tố vi lượng.

- Hoạt động tổng hợp: Sản xuất sinh khối vi sinh vật, đồng tổng hợp các hợp chất mùn và chất keo dính, cố định các chất dinh dưỡng.

Sinh khối vi sinh vật đất là khối lượng các tế bào vi sinh vật nguyên vẹn trong lượng đất đã cho.

– Các phương pháp khác nhau được sử dụng để xác định sinh khối vi sinh vật:

+ Đếm dưới kính hiển vi

+ Đếm trên đĩa môi trường đặc hoặc trong môi trường dịch thể.

+ Kỹ thuật ủ – xông hơi, chiết xuất – xông hơi và đo hô hấp cảm ứng chất nền.

– Xác định ATP, axit muramic, D-alanin, kitin hoặc các glucosamin khác, axit nucleic, phospholipit, lipopolysaccharit,...

– Đo tỷ lệ tổng hợp ADN với [^3H] thymidin, tỷ lệ hợp nhất của $\text{H}_2^{32}\text{PO}_4$ và [C^{14}] axetat.

– Phân tích phổ sinh khối với chất đồng vị bền vững.

Xác định sinh khối trong đất gặp một số khó khăn. Các phương pháp nuôi cấy và đếm trực tiếp dưới kính hiển vi có giá trị giới hạn. Chúng đếm chỉ với một lượng nhỏ, một phần nhỏ chưa biết của tổng sinh khối vi sinh vật do hình thành các khối tế bào, cường độ hấp phụ khác nhau của các sinh vật tới hạt đất và nhiều loại sinh vật khác nhau có thể sinh trưởng trên môi trường nuôi cấy. Đếm trực tiếp dưới kính hiển vi không phân biệt được giữa sinh khối sống và chết. Các phương pháp vật lý có sự lặp lại tốt hơn đếm trên đĩa môi trường và phù hợp cho các nghiên cứu so sánh. Sự chuyển đổi các đơn vị đo sinh khối nên được thực hiện cẩn trọng và đòi hỏi các điều tra sâu hơn. Sự suy luận từ sinh khối hoạt động đo được trong phòng thí nghiệm đến hoạt động trao đổi chất trong đất không khai phá là không thể được. Cả phương pháp đếm VSV sống trên đĩa lẫn phương pháp vật lý đều không tính toán đến phần lớn sinh khối tiềm tàng trong điều kiện tự nhiên.

Những năm gần đây, các phương pháp xác định sinh khối vi sinh vật gián tiếp lại quan trọng hơn. Các phương pháp này đòi hỏi thời gian ít, và có sự lặp lại cao. Tuy nhiên, không thể phân biệt được sinh khối tiềm tàng và hoạt động của vi sinh vật trong đất. Sinh khối vi khuẩn và nấm cũng không thể phân biệt được. Một trong những phương pháp được sử dụng phổ biến là phương pháp chiết – xông hơi. Phương pháp này cho phép đánh giá sinh khối vi sinh vật của đất bằng cách đo toàn bộ lượng vật liệu sinh khối hữu cơ có thể chiết được từ các vi sinh vật mới bị giết. Phương pháp chiết xông hơi sử dụng cho đất khô và đất ướt (ngập úng, ruộng lúa nước) với tất cả các giá trị pH

của đất. Sinh khối được xác định trong đất có chứa các chất nền phân huỷ mạnh và đất bão hoà dung dịch kalisunfat.

II- XÁC ĐỊNH SINH KHỐI CACBON CỦA VI SINH VẬT ĐẤT

2.1. NGUYÊN TẮC

Bằng cách xông hơi mẫu đất, các tế bào nguyên vẹn được hoà tan và chất hữu cơ vi sinh vật được giải phóng. Chất hữu cơ của đất không ở thể sống thì không chịu ảnh hưởng của việc xông hơi. Các mẫu đất được xông hơi clorofooc trong 24h. Cacbon hữu cơ chiết bằng dung dịch kalisunfat 0,5mol/l được xác định cho mẫu xông hơi và không xông hơi, và hiệu số của cacbon hữu cơ chiết được sử dụng để xác định lượng cacbon sinh khối vi sinh vật.

Sự xông hơi bằng clorofooc cũng ảnh hưởng tới hệ động vật đất. Phần đóng góp cacbon của các cơ thể loại này thường nhỏ (<5%) và có thể bỏ qua.

2.2. VẬT LIỆU, HOÁ CHẤT VÀ THUỐC THỬ

– Nếu yêu cầu các mẫu đất cần phải đồng nhất thì sàng các mẫu ở khả năng giữ nước (KNGN) là 40%. Hàm lượng nước của mẫu phải cao hơn khả năng giữ nước 30% để đảm bảo độ phân tán đều của clorofooc và để cho sự xông hơi có hiệu quả. Cần chú ý tránh làm đất ướt đóng khối và ố bẩn. Mẫu lấy từ đất ngập nước không phải sấy khô trước khi phân tích.

– Ống thủy tinh (400 x 200mm) có phễu lọc, chai nhựa 1000ml có nắp, bình ly tâm plastic hoặc túi nylon, giấy lọc thô, oxit nhôm, hạt chống trào, đĩa petri.

– Clorofooc không có rượu etylic: Lọc 70ml clorofooc qua ống thủy tinh với 50g oxit nhôm. Lọc 25ml đầu tiên cho giai đoạn 2. Dung dịch clorofooc không có etylic có thể giữ được 14 ngày trong chai tối màu. Khi có ánh sáng, clorofooc không có rượu etylic phân huỷ nhanh tạo thành khí phosgen (COCl_2) không mùi và rất độc.

– Dung dịch BaCl_2 1M: 20,8g/100ml.

– Axit HCl 0,1M; NaOH 0,1M.

– K_2SO_4 0,5M: 87,135g/l

- Dung dịch chỉ thị: 0,1g phenolphthalein/100ml etanol (60%V/V).
- Phòng ủ có khả năng duy trì nhiệt độ $(25 \pm 2)^{\circ}\text{C}$.
- Bình hút ẩm được bảo vệ chống nổ, hệ tạo chân không (bơm tia nước hoặc bơm điện), máy lắc nằm ngang hoặc đứng, tủ đá (-15°C đến -20°C).

2.3. TIẾN HÀNH THÍ NGHIỆM

2.3.1. Chiết – xông hơi

a) Xông hơi: Lót hút bình ẩm bằng giấy lọc ẩm để xông hơi mẫu đất. Cân ít nhất ba mẫu đất ẩm trong cốc đốt thủy tinh (hoặc trong đĩa petri), mỗi mẫu chứa khối lượng tương đương với 25 đến 50g đất khô kiệt. Sau đó đặt chúng vào bình hút ẩm cùng với cốc đốt chứa 25ml clorofooc không chứa rượu etylic, cho một ít hạt chống trào vào cốc clorofooc và cốc đốt chứa vôi. Tạo chân không cho bình hút ẩm cho tới khi clorofooc bên trong bình sôi mạnh khoảng 2 phút. Đóng khoá chân không của bình hút ẩm và để ở phòng ủ ($25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) trong bóng tối khoảng 22 – 24h.

Nếu như không có đủ mẫu đất thì dùng mẫu nhỏ hơn nhưng giữ cho tỷ lệ khối lượng đất và dung môi chiết không đổi (1: 4). Trong đất có chứa chất hữu cơ nhiều hơn 20% thì tăng tỉ lệ đất: dung môi trên 1 : 4 (cho tới tối đa là 1: 30 đối với đất chứa 95% chất hữu cơ, ví dụ: tầng thảm mục) để thu được chất chiết. Ghi lại lượng đất đã sử dụng.

Sau khi xông hơi kết thúc, lấy cốc clorofooc và giấy lọc ra khỏi bình hút ẩm. Sau đó tiến hành tách hơi clorofooc trong mẫu đất bằng cách hút chân không bình hút ẩm (lặp lại 6 lần, mỗi lần 2 phút) và mẫu đất có thể mang đi chiết được.

Cho ba mẫu đối chứng ẩm không xông hơi (50g khối lượng khô) vào chai nhựa PE và dùng 200ml dung dịch kalisunfat để chiết ngay.

b) Chiết: Để chiết tách cacbon hữu cơ, chuyển mẫu đất vào chai nhựa PE thật cẩn thận, cho thêm 200ml dung dịch kalisunfat, lắc chai trên máy lắc nằm ngang ở tốc độ 200 vòng/phút trong 30 phút, hoặc máy lắc đứng ở tốc độ 60 vòng/phút trong 45 phút và lọc dung môi qua giấy lọc. Chiết đối chứng không xông hơi và lọc dung môi chiết cũng như vậy.

Nếu như không phân tích ngay, bảo quản dịch chiết của mẫu đất xông hơi và không xông hơi ở tủ đá và giữ ở nhiệt độ từ -15°C đến -20°C .

Trước khi sử dụng làm tan dịch chiết đến nhiệt độ phòng và đồng nhất chúng.

Chú thích:

1) Trong khi bảo quản dung môi chiết thường xuất hiện kết tủa trắng (đặc biệt khi giữ ở nhiệt độ đông lạnh) bởi vì chúng thường được bão hoà với canxi sunfat (CaSO_4). Không cần hoà tan lượng canxi sunfat dư này vì nó không tác dụng với bất kỳ hoá chất nào trong quá trình tiến hành theo phương pháp này.

2) Các màng tế bào của các rễ non sống cũng bị ảnh hưởng qua quá trình xông hơi bằng clorofoc. Nếu như đất có chứa nhiều rễ cây sống, cần phải tiến hành thêm một quy trình xử lý trước khi chiết (như dây qua lưới có kích thước 0,025mm để loại bỏ rễ cây).

c) Xác định cacbon trong dịch chiết

– Hàm lượng cacbon của vi sinh vật trong mẫu đất được xác định bằng cách phân tích và hàm lượng này có thể sử dụng để so sánh các mẫu đất khác nhau. Nếu như cần số liệu về sinh khối vi sinh vật hiện tại, thì lúc đó các phân tích như vậy được nhân với hệ số chuyển đổi được rút ra từ các thực nghiệm, tương quan giữa khối lượng tế bào đã biết với lượng cacbon sau khi xông hơi và chiết tách. Tất cả các hệ số chuyển đổi đã sử dụng đều tương quan theo hệ số ban đầu này.

– Xác định hàm lượng cacbon trong dịch chiết bằng phương pháp oxy hoá dicromat hoặc phương pháp phân tích trên máy.

2.3.2. Xác định cacbon sinh khối vi sinh vật bằng phương pháp oxy hoá dicromat

Trong môi trường axit mạnh chất hữu cơ bị oxy hoá và Cr(VI) bị khử thành Cr(III) . Lượng dicromat còn lại được chuẩn độ ngược.

– Thuốc thử bổ sung:

+ Kalidicromat $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 0,0667 M (19,6125g kalidicromat khô/lít nước). Do bản chất nguy hại của kalidicromat, phải rất cẩn thận khi sử dụng và thải bỏ.

+ Axit phosphoric H_3PO_4 ($\rho = 1,71\text{g/ml}$).

+ Axit sunfuric H_2SO_4 ($\rho = 1,84\text{g/ml}$).

+ Sắt (II) amoni sunfat, dung dịch chuẩn độ $[(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}] = 0,04\text{M}$: Sắt (II) amoni sunfat (15,69g) hoà tan trong nước cất, thêm 20ml axit sunfuric, sau đó cho tiếp nước cất đến mức 1000ml.

+ Dung dịch phức sunfat 1 – 10 – phenanthrolin 0,025mol/l.
 + Hỗn hợp axit: Hai thể tích axit sunfuric trộn với một thể tích axit phosphoric.

– Thiết bị bổ sung:

+ Sinh hàn Liebig (Làm lạnh bằng nước).

+ Bình đáy tròn 250ml, Buret 10ml, chia độ 0,05ml, pipet 2ml.

– Cách tiến hành:

+ Dùng pipet lấy 2ml dung dịch kalidicromat (P_D) và 15ml hỗn hợp 2 axit cho vào 8ml dịch chiết đã được lọc (P_S) trong bình đáy tròn 250ml. Đun hồi lưu nhẹ toàn bộ hỗn hợp trong vòng 30 phút, sau đó làm lạnh và pha loãng với khoảng 20ml đến 25ml nước qua đường sinh hàn để tráng.

+ Cũng tiến hành tương tự như vậy với mẫu trắng, có chứa 8ml dung dịch K_2SO_4 .

Xác định lượng dicromat thừa bằng cách chuẩn độ ngược với muối kép sunfat sắt (II) amoni dùng một vài giọt dung dịch phức 1 – 10 – phenanthrolin–sunfat sắt (II) làm chỉ thị.

2.3.3. Tính toán kết quả

Tính lượng cacbon hữu cơ chiết ra được bằng công thức (1) và (2)

$$C(g/ml) = [(V_H - V_S)/V_C] \times MP_D \times E \times 1000/P_S \quad (1)$$

Trong đó:

V_S : Thể tích dung dịch chuẩn độ đã dùng để chuẩn mẫu (ml).

V_H : Thể tích dung dịch chuẩn độ đã dùng để chuẩn mẫu trắng hồi lưu (ml).

V_C : Thể tích dung dịch chuẩn độ đã dùng để chuẩn mẫu trắng không hồi lưu (ml).

M : $K_2Cr_2O_7$ (mol /lít).

P_D : Thể tích dung dịch $K_2Cr_2O_7$ bổ sung (ml).

P_S : Thể tích dung dịch mẫu bổ sung (ml).

E : 3 (chuyển đổi từ cacbon hữu cơ $C[C]$ thành $CO_2[C (+ IV)]$).

$$C(g/g \text{ đất khô}) = C(g/ml) \times (P_K/ D_w + S_w) \quad (2)$$

Trong đó:

P_K : Khối lượng dung môi chiết (g).

D_w : Khối lượng đất khô (g).

S_w : Nước trong đất (g nước/g đất khô).

Tính lượng cacbon sinh khối B_c , theo công thức (3):

$$B_c = E_c / k_{EC} \quad (3)$$

Trong đó:

E_c = (khối lượng cacbon hữu cơ chiết được từ đất xông hơi) – (khối lượng cacbon hữu cơ chiết được từ đất không xông hơi).

$K_{EC} = 0,38$. Hệ số k_{EC} được tính toán từ mối liên quan giữa kết quả của những phương pháp ủ – xông hơi và phương pháp chiết – xông hơi (12 loại đất).

2.3.4. Xác định cacbon sinh khối vi sinh vật bằng phân tích cacbon theo phương pháp quang phổ

– Nguyên tắc:

Với sự có mặt của kalipersunfat ($K_2S_2O_8$), cacbon hữu cơ chiết được của đất bị oxy hoá thành cacbon dioxit và lượng cacbon dioxit được đo bằng phổ (IR) và (UV).

– Thuốc thử bổ sung:

+ Kali persunfat ($K_2S_2O_8$).

+ Axit phosphoric.

+ Natri polyphosphat $[(NaPO_3)_m]$, rất tinh khiết.

– Thuốc thử kalipersunfat: Hoà tan 20g kalisunfat trong 90ml nước cất, dùng axit phosphoric điều chỉnh pH của dung dịch bằng 2 và sau đó cho nước cất vừa đủ đến 1000ml.

– Thuốc thử natri polyphosphat: Hoà tan 50g natri polyphosphat trong 90ml nước cất, dùng axit phosphoric điều chỉnh pH của dung dịch trên đến 2, sau đó thêm nước cất đến 1000ml.

– Thiết bị bổ sung:

+ Máy phân tích cacbon tự động với bộ phát hiện hồng ngoại hoặc với hệ thống dòng liên tục với đầu đo so màu.

+ Trong tiêu chuẩn này việc xác định cacbon sinh khối vi sinh vật dựa trên cơ sở oxy hoá cacbon hữu cơ bằng persunfat được hoạt hoá tia cực tím.

– Cách tiến hành:

Đối với phương pháp oxy hoá tự động bằng persunfat – tia cực

tím, trộn 5ml phần chiết từ đất bằng dung dịch kalisunfat với 5ml thuốc thử natripolyphosphat. Bất kỳ kết tủa nào của CaSO_4 đều được hoà tan trong quá trình này. Thuốc thử kalipersunfat được đưa một cách tự động vào buồng oxy hoá UV, ở đây sự oxy hoá thành CO_2 được thực hiện bằng tia cực tím. CO_2 được tạo thành được đo bằng hấp thụ hồng ngoại hay bằng quang phổ UV.

2.3.5. Tính toán kết quả

– Tính lượng cacbon hữu cơ chiết được (C) theo công thức (4):

$$C \text{ (g/g đất khô)} = [(V \times D_v) - (B \times D_v)] \times (P_k / D_w + S_w) \quad (4)$$

Trong đó:

V: C(g/ml) của mẫu.

B: C(g/ml) của mẫu trắng.

D_v : Độ pha loãng của mẫu bằng natri phosphat (ml).

D_B : Độ pha loãng của mẫu trắng bằng natri phosphat (ml).

P_k : Khối lượng dung môi chiết (g).

D_w : Khối lượng đất khô (g).

S_w : Nước trong đất (g nước/g đất khô).

– Tính lượng sinh khối BC sử dụng công thức:

$$B_C = E_C / k_{EC} \quad (5)$$

Trong đó:

E_C = (cacbon hữu cơ chiết được từ đất xông hơi) – (cacbon hữu cơ chiết được từ đất không xông hơi).

$k_{EC} = 0,35$.

Hệ số k_{EC} được tính từ mối liên quan giữa kết quả của phương pháp ủ xông hơi và kết quả của phương pháp chiết - xông hơi (23 loại đất).

Có thể sử dụng phương pháp chiết - xông hơi kết hợp với phương pháp nghiên cứu phân huỷ của các chất hữu cơ đánh dấu ^{14}C .

Quy trình chiết sơ bộ với đất có chứa nhiều rễ cây sống:

Cho đất ẩm (25 đến 50g khối lượng khô) vào bình thuỷ tinh 250ml có chứa 100ml dung dịch kali sunfat để chiết trong vòng 20 phút trên máy lắc và sàng (đối với đất canh tác kích thước lỗ là 2mm, còn đối với đất đồng cỏ là 3mm). Rửa thật sạch rễ cây (và hạt đá nhỏ) trên sàng bằng 75ml dung dịch kalisunfat bổ sung thêm và sấy khô, cân chúng. Ly tâm khoảng 500g huyền phù gồm đất và dung dịch

kalisunfat trong bình thuỷ tinh trong 15 phút. Sau đó chất nước lọc phía trên. Cho thêm 3 giọt clorofooc vào đất để xông hơi. Quy trình như trên.

Nếu có các rễ cây sống trong đất thì nhất thiết phải sử dụng quy trình trên. Hơn nữa, quy trình này tạo cho việc đo nitơ sinh khối vi sinh vật dễ dàng hơn bằng việc giảm nitơ vô cơ nền có trong đất. Nó còn giảm những khó khăn khi đo sinh khối vi sinh vật trong đất khô và vì vậy rất tiện lợi cho việc đo sự dao động của cacbon sinh khối vi sinh vật đất và nitơ trong năm. Sinh khối vi sinh vật đo được không bị chiết tách ra khỏi đất bằng quy trình chiết sơ bộ này.

III- XÁC ĐỊNH SINH KHỐI NITƠ CỦA VI SINH VẬT ĐẤT

Sau khi xông hơi bằng clorofooc, mẫu đất được chiết bằng dung dịch kalisunfat. Nitơ tổng số trong dịch lọc được xác định và biến đổi sang nitơ sinh khối (Brookes và cs, 1985). Nitơ tổng số được xác định theo phương pháp Kjeldahl.

3.1. VẬT LIỆU, HOÁ CHẤT VÀ THUỐC THỬ

Các vật liệu, hoá chất, dụng cụ và thuốc thử chuẩn bị như xác định cacbon sinh khối vi sinh vật ở trên.

3.2. TIẾN HÀNH THÍ NGHIỆM

3.2.1. Chiết – xông hơi

Xông hơi 150 – 200g mẫu đất ẩm bằng clorofooc trong 24h giống như phân tích cacbon sinh khối ở trên. Sau đó (ngược với kỹ thuật chiết – xông hơi trên, clorofooc không được tách ra khỏi mẫu), trộn đất xông hơi với dung dịch kalisunfat theo tỉ lệ 1: 4, lắc 30 phút và lọc làm mẫu phân tích (3 lần lặp lại). Tiến hành tương tự với mẫu đối chứng không xông hơi (3 lần lặp lại).

Tiến hành phân tích lượng nitơ tổng số trong dịch lọc ngay theo phương pháp Kjeldahl. Có thể cất giữ dịch lọc ở 4°C cho đến khi phân tích.

3.2.2. Phân tích nitơ theo phương pháp Kjeldahl

- Dụng cụ, hoá chất bổ sung:
- + Bình Kjeldahl (250ml), bộ cất đậm Kjeldahl.
- + Axit sunfuric H_2SO_4 ($\rho = 1,84$ g/ml).

+ H_2SO_4 0,05M.

+ Hỗn hợp xúc tác: 100g K_2SO_4 + 10g CuSO_4 + 1g Se, nghiền nhỏ.

+ NaOH 32% (W/V).

+ Axit boric 2% (W/V).

+ Dung dịch chỉ thị (ví dụ xanh bromcresol, đỏ metyl).

– Tiến hành: Cho 0,5g hỗn hợp xúc tác và 20ml H_2SO_4 đặc vào bình dịch lọc, công phá cho đến khi thu được dung dịch trong, để nguội ở nhiệt độ phòng.

Cho 10ml axit boric và vài giọt chỉ thị vào bình hứng dịch chưng cất. Sau khi thêm xút dư, tiến hành chưng cất 3 – 20 phút để chuyển hoàn toàn NH_3 vào bình chứa axit boric và chỉ thị.

Xác định N- NH_4 bằng chuẩn độ với H_2SO_4 0,05M (điểm chuẩn độ là dung dịch chuyển từ xanh sang hồng. Lượng nitơ trong mẫu được tính theo công thức sau:

$$\frac{(S - C) \cdot 1,4 \cdot 100 \cdot 100}{A \cdot \text{SW} \cdot 1000} = \% \text{ N}$$

Trong đó:

S: Lượng axit H_2SO_4 0,05M dùng cho mẫu (ml).

C: Lượng axit H_2SO_4 0,05M dùng cho đối chứng (ml).

1,4: Hệ số chuyển đổi (1ml H_2SO_4 0,05M tương ứng với 1,4 mgN).

100: Lượng dịch tiêu thụ (ml).

A: Ước số dịch tiêu thụ (ml).

SW: Lượng đất ban đầu.

$100 \cdot 1000^{-1}$: Hệ số chuyển đổi (% , W/W).

3.3. TÍNH KẾT QUẢ

Nitơ sinh khối vi sinh vật được tính theo phương trình:

$$\frac{(S - C)}{0,54} = \mu\text{g N} \cdot \text{g}^{-1} \text{dm}$$

Trong đó:

S: Giá trị của mẫu ($\mu\text{g N-NH}_4 \cdot \text{g}^{-1} \text{dm}$).

C: Giá trị đối chứng ($\mu\text{g N-NH}_4 \cdot \text{g}^{-1} \text{dm}$).

0,54: Hệ số K_{EN} (mối quan hệ giữa nitơ sinh khối VSV và nitơ tổng số trong đất).

BÀI SỐ 10

THAM QUAN KIẾN TẬP MÔN HỌC

Mục đích và yêu cầu

- Nhằm trang thiết bị kiến thức thực tế cho sinh viên về ứng dụng công nghệ VSV trong nông nghiệp và xử lý ô nhiễm môi trường.
- Yêu cầu sinh viên tham gia đầy đủ các buổi học ngoại khoá theo chương trình môn học.
- Sau khi học xong, sinh viên phải viết tiểu luận về bài học ngoại khoá.

Địa điểm học ngoại khoá

- Các phòng thí nghiệm VSV hiện đại chuyên phục vụ trong giảng dạy và nghiên cứu về lĩnh vực nông nghiệp.
 - Phòng Sinh học đất Trường Đại học Nông nghiệp I, Hà Nội.
 - Các loại chế phẩm, phân VSV đang được sản xuất và áp dụng trong nông nghiệp.
 - Trung tâm VSV ứng dụng Trường Đại học Khoa học Tự nhiên.
 - Phòng Nghiên cứu VSV nông nghiệp Trường Đại học Nông nghiệp I.
 - Viện Sinh học Viện Khoa học Việt Nam.
 - Phòng thí nghiệm Sinh học đất Viện Nông hoá thổ nhưỡng.
 - Phòng Thí nghiệm Động vật không xương sống, Đại học Sư phạm I, Hà Nội.
 - Các Trung tâm Nghiên cứu thực nghiệm đất, phân liên quan đến sinh vật đất.
- #### *Nội dung*
- Tìm hiểu và học tập trang thiết bị phân tích sinh vật đất.
 - Các mô hình trình diễn, các thí nghiệm về biện pháp canh tác trong nông nghiệp.
 - Các phương pháp nghiên cứu về sinh vật trong đất.

PHỤ LỤC

**BẢNG 1: PHA DUNG DỊCH ĐỆM SORENSEN I VÀ DUNG DỊCH Na_2HPO_4 1/15M
VÀ KH_2PO_4 1/15M – SỐ LƯỢNG DUNG DỊCH (ml)**

pH	Na_2HPO_4 1/15 M	KH_2PO_4 1/15 M
4,53	0,00	10,00
4,48	0,10	9,90
5,29	0,25	9,75
5,59	0,50	9,50
5,91	1,00	9,00
6,24	2,00	8,00
6,47	3,00	7,00
6,64	4,00	6,00
6,81	5,00	5,00
6,98	6,00	4,00
7,17	7,00	3,00
7,38	8,00	2,00
7,73	9,00	1,00
8,04	9,50	0,50
8,34	9,75	0,25
8,67	9,90	0,10
9,18	10,00	0,00

BẢNG 2A: TÍNH SỐ LƯỢNG VI SINH VẬT THEO MAC.CRADY

Chỉ số	Số lượng VSV có xác suất lớn nhất khi cấy lặp lại ở các ống nghiệm				Chỉ số	Số lượng VSV có xác suất lớn nhất khi cấy lặp lại ở các ống nghiệm			
	2	3	4	5		2	3	4	5
00	0,0	0,0	0,0	0,0	132	-	-	1,6	-
001	0,5	0,3	0,2	0,2	140	-	-	1,4	1,1
002	-	-	0,5	0,4	141	-	-	1,7	-
003	-	-	0,7	-	200	2,5	0,9	0,6	0,5
010	0,5	0,3	0,2	0,2	201	5,0	1,4	0,9	0,7
011	0,9	0,6	0,5	0,4	202	-	2,0	1,2	0,9
012	-	-	0,7	0,6	203	-	-	1,6	1,2
013	-	-	0,9	-	210	6,0	1,5	0,9	0,7
020	0,9	0,6	0,5	0,4	211	13,0	2,0	1,3	0,9
021	-	-	0,7	0,6	212	20,0	3,0	1,6	1,2
022	-	-	0,9	-	213	-	-	2,0	-
030	-	-	0,7	0,6	220	25,0	2,0	1,3	0,9
031	-	-	0,9	-	221	17,0	3,0	1,6	1,2

040	-	-	0,9	-	222	110,0	3,5	2,0	1,4
041	-	-	1,2	-	223	-	4,5	-	-
100	0,6	0,4	0,3	0,2	230	-	3,0	1,7	1,2
101	1,2	0,7	0,5	0,4	231	-	3,5	2,0	1,4
102	-	1,1	0,8	0,6	232	-	4,0	-	-
103	-	-	1,0	0,8	240	-	-	2,0	1,4
110	1,3	0,7	0,5	0,4	241	-	-	3,0	-
111	2,0	1,1	0,8	0,8	300	-	2,5	1,1	0,8
112	-	-	1,0	0,8	301	-	4,0	1,6	1,1
113	-	-	0,5	-	302	-	6,5	2,0	1,4
120	2,0	1,1	0,8	0,6	303	-	-	2,5	-
121	3,0	1,5	1,1	0,3	310	-	4,5	1,6	1,1
122	-	-	1,3	1,1	311	-	7,5	2,0	1,4
123	-	-	1,6	-	312	-	11,5	3,0	1,7
130	-	1,6	1,1	0,8	313	-	16,0	3,5	2,0
131	-	-	1,4	1,0	320	-	9,5	2,0	1,4

BẢNG 2B: TÍNH SỐ LƯỢNG VI SINH VẬT THEO MAC.CRADY

Chỉ số	Số lượng VSV có xác suất lớn nhất khi cấy lặp lại ở các ống nghiệm				Chỉ số	Số lượng VSV có xác suất lớn nhất khi cấy lặp lại ở các ống nghiệm			
	2	3	4	5		2	3	4	5
321	-	15,0	3,0	1,7	451	-	-	-	5,0
322	-	20,0	3,5	2,0	500	-	-	-	2,5
330	-	25,0	3,0	1,7	501	-	-	-	3,0
331	-	45,0	3,5	2,0	502	-	-	-	4,0
332	-	110,0	4,0	-	503	-	-	-	6,0
333	-	140,0	5,0	-	504	-	-	-	7,5
340	-	-	3,5	2,0	510	-	-	-	3,5
341	-	-	4,5	2,5	511	-	-	-	4,5
350	-	-	-	2,5	512	-	-	-	6,0
400	-	-	2,5	1,3	513	-	-	-	8,5
401	-	-	3,5	1,7	520	-	-	-	5,0
402	-	-	5,0	2,0	521	-	-	-	7,0
403	-	-	7,0	2,5	522	-	-	-	9,5
410	-	-	3,5	1,7	523	-	-	-	12,0

411	-	-	5,5	2,0	524	-	-	-	15,0
412	-	-	8,0	2,5	525	-	-	-	17,5
413	-	-	11,0	-	530	-	-	-	8,0
414	-	-	11,0	-	531	-	-	-	11,0
420	-	-	6,0	2,0	532	-	-	-	14,0
421	-	-	9,5	2,5	533	-	-	-	17,0
422	-	-	13,0	3,0	534	-	-	-	20,0
423	-	-	17,0	-	535	-	-	-	25,0
424	-	-	20,0	-	540	-	-	-	13,0
430	-	-	11,5	2,5	541	-	-	-	17,0
431	-	-	16,5	3,0	542	-	-	-	25,0
432	-	-	20,0	4,0	543	-	-	-	30,0
433	-	-	30,0	-	544	-	-	-	35,0
434	-	-	35,0	-	545	-	-	-	45,0
440	-	-	25,0	3,5	550	-	-	-	25,0
441	-	-	40,0	4,0	551	-	-	-	35,0
450	-	-	-	1,4	555	-	-	-	180,0

TÀI LIỆU THAM KHẢO

I- Tiếng Việt

1. Kiều Hữu Ánh và Ngô Tự Thành (dịch giả). *Vi sinh vật học của các nguồn nước*. NXB Khoa học & Kỹ thuật, Hà Nội, 1985.
2. Đái Duy Ban. *Công nghệ sinh học đối với vật nuôi và cây trồng*. NXB Nông nghiệp, 1997.
3. Thái Trần Bái và cộng sự. *Động vật học không xương sống*. NXB Đại học Sư phạm Hà Nội, 2005.
4. Đường Hồng Dật và cộng sự. *Giáo trình Vi sinh vật trồng trọt*. NXB Giáo dục, 1978.
5. Nguyễn Lâm Dũng và cộng sự. *Sổ tay nghiên cứu vi sinh vật*, tập I, II, III. NXB Giáo dục, 1978, 1979.
6. Nguyễn Lâm Dũng và cộng sự. *Thực hành vi sinh vật*. NXB Giáo dục, 1992.
7. Nguyễn Lâm Dũng. *Thực tập vi sinh vật* (dịch giả từ tiếng Nga). NXB Giáo dục, 1983.
8. Nguyễn Đường và Nguyễn Xuân Thành. *Giáo trình Vi sinh vật đất*, NXB Nông nghiệp, 1999.
9. Đặng Đình Kim và cộng sự. *Giáo trình Công nghệ sinh học vi tảo*. NXB Nông nghiệp, 1999.
10. Hà Văn Lâm và cộng sự. *Biện pháp sinh học trong nông nghiệp*. NXB Nông nghiệp, 1997.
11. Nguyễn Như Thanh và Nguyễn Xuân Thành. *Giáo trình Vi sinh vật đại cương*. NXB Nông nghiệp, 2004.
12. Nguyễn Xuân Thành và cộng sự. *Giáo trình Công nghệ vi sinh vật trong nông nghiệp*. NXB Nông nghiệp, 2003.
13. Nguyễn Xuân Thành và cộng sự. *Giáo trình Vi sinh vật học nông nghiệp*. NXB Nông nghiệp, 2004.

14. Nguyễn Xuân Thành và cộng sự. *Giáo trình Vi sinh vật học Công nghiệp*. NXB Giáo dục, 2005.

15. Nguyễn Xuân Thành và cộng sự. *Thực tập vi sinh vật đại cương*. NXB Nông nghiệp, 1994.

16. Nguyễn Xuân Thành và cộng sự. *Thực tập vi sinh chuyên ngành*. NXB Nông nghiệp, 2006.

II. Tiếng Nga

17. Е. З. Тенпер – Е. Н. Ёрнова. Практикум по микробиологии. Москва "Колос", 1979.

18. К.Д. Пяткин. Л. М. Гороцисский – Микробиология. Москва "Медцина", 1981.

19. Е.Н. Мишустин. Микробиология. Москва "Колос", 1978.

20. В. Л. Кретовиц. Биологическая молекулярного Азота Киев Наукова думка, 1983.

21. Ш. М. Мусаев. Биология и селекция микроорганизмов. Ташкент "Фан", 1980.

22. М. И. Протсов. Фитонатология. Ленинград "Колос", 1980.

III. Tiếng Anh

23. Bergey–*Manual of Determination of Bacteria*, Accademic press Inc, London and New Yourk, 1970.

24. Boehinger Mannheim GmbH, *Biochemica: The DiG System Users guide for filter Hybridization*, 1993.

25. Burges, H.D. and Hussey, N.W, 1971. *Microbial cotrol of insects and mites London – NewYork*.

26. Cazozzi, N.B, Kramer, V.C, Warren, G.W, Evola,1991, *Prediction of Insecticidal Activity of Bacillus thuringiensis Strains by Polymerase Reaction Product Profiles. Applied and Environmental Microbiology*, p.3057 – 3061.

27. Cari. P. SWanson, Timothy Merz and Willam.J.Cytigenetics (second edition) *Prentice – Hall of India Private Limited*, 1990.

28. Chilcott, C.N. and Wigley, P.J, 1992, *Isolation and Toxicity of Bacillus thuringiensis from Soil and Insect Habityats in New Zealand. Journal of Invertebrate Phathology* 61, p. 244–247.

29. Choi, S.K, b.T. Koo, s.Shin, S.H.Park, J.I.im, 1995. *Screening of nested mutants of ADN sequencing by direct electrophoresis of bacterial cultures*. Anal. Biochem. 230: 182 – 183.
30. Dennis E. Ohman. *E xpe riment in gene manipulation*. University of California at Berkeley, 1989.
31. Dirk U. Pfeiffer – *Veterinary Epidemiology An Introduction*, Palmerston North, New Zealand, 1998.
32. Makoto M. Watanabe et al., 1997. *Microalgae and Protozoa*. NIES Collection. List of strains. Environment Agency, Japan.
33. I. EdWard Alcamo. *Fundamentals of microbiology*, Third Edition The Benjamin/ Cummings Publishing Company Inc, 1991.
34. Ferre, J. M.d.Real, J.Van Rie, S.Jansens, and M.Peferoen, 1991, *Resistance to the Bacillus thuringiensis bioinsecticide in a field population of Plutella xylostella is due to a change in a midgut membrane receptor*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:8119–5123. .
35. Ivan Arthur Merchane, Ralph David-Barner. *Infectious disease of domestic animal*. USA, 1992.
36. Kiryat Sde – Boker. *Physical & Chemical Processes for Water & WasteWater Treatment & Reuse*. Hanoi, Vietnam, December, 2000.

Chịu trách nhiệm xuất bản:

Chủ tịch HĐQT kiêm Tổng Giám đốc NGÔ TRẦN ÁI
Phó Tổng Giám đốc kiêm Tổng biên tập NGUYỄN QUÝ THAO

Tổ chức bản thảo và chịu trách nhiệm nội dung:

Chủ tịch HĐQT kiêm Giám đốc CTCP Sách DH-DN
TRẦN NHẬT TÂN

Biên tập nội dung và sửa bản in:

NGUYỄN HỒNG ÁNH

Trình bày bìa:

HOÀNG MẠNH DỨA

Chế bản:

ĐINH XUÂN DŨNG

GIÁO TRÌNH SINH HỌC ĐẤT

Mã số : 7K704M7 – DAI

In 1.000 bản (QĐ 55), khổ 16 x 24cm. Tại Nhà in Hà Nam
Số 29 - Đường Lê Hoàn - TX. Phủ Lý - Hà Nam
Số in: 300. Số ĐKKH xuất bản: 17-2007/CXB/94-2217/GD
In xong và nộp lưu chiểu tháng 8 năm 2007.



**CÔNG TY CỔ PHẦN SÁCH ĐẠI HỌC - DẠY NGHỀ
HEVOBCO**

25 HÀN THUYỀN – HÀ NỘI

Website : www.hevobco.com.vn



VƯƠNG MIỀN KIM CƯƠNG
CHẤT LƯỢNG QUỐC TẾ

TÌM ĐỌC SÁCH THAM KHẢO BỘ MÔN SINH HỌC CỦA NHÀ XUẤT BẢN GIÁO DỤC

- | | |
|--|------------------------------|
| 1. Chú giải di truyền học | Đỗ Lê Thăng - Đinh Đoàn Long |
| 2. Sinh học cơ thể | Nguyễn Như Hiền |
| 3. Chọn lọc và hướng dẫn giải bài tập
di truyền học | Đỗ Lê Thăng |
| 4. Giáo trình Thực vật học | Nguyễn Bá |
| 5. Giáo trình Sinh học đất | Nguyễn Xuân Thành |
| 6. Sinh lí học người và động vật | Nguyễn Như Hiền |
| 7. Sinh lí học thực vật | Nguyễn Như Khanh |
| 8. Dạy học công nghệ 11 | Nguyễn Văn Khôi |

*Bạn đọc có thể mua tại các Công ti Sách - Thiết bị trường học ở các địa phương
hoặc các Cửa hàng của Nhà xuất bản Giáo dục :*

Tại Hà Nội : 25 Hàn Thuyên; 187B Giảng Võ; 232 Tây Sơn; 23 Tràng Tiền.

Tại Đà Nẵng : Số 15 Nguyễn Chí Thanh; Số 62 Nguyễn Chí Thanh.

Tại Thành phố Hồ Chí Minh : 104 Mai Thị Lựu, Quận 1;

Cửa hàng 451B - 453, Hai Bà Trưng, Quận 3; 240 Trần Bình Trọng – Quận 5.

Tại Thành phố Cần Thơ : Số 5/5, đường 30/4.

Website : www.nxbgd.com.vn



8 934980 763414



Giá : 29.000 đ