

KỸ THUẬT VI SINH

CHƯƠNG 3 & 4

Đặc trưng hóa và Định danh VSV

Đặc trưng hóa VSV

- **Hình thái**
- **Đặc tính sinh lý và tăng trưởng**
- **Phản ứng sinh hóa (khả năng chuyển hóa C, N, P, S...)**
- **Yếu tố di truyền (gene mã hóa liên quan hoạt tính đang quan tâm)**

Hình thái

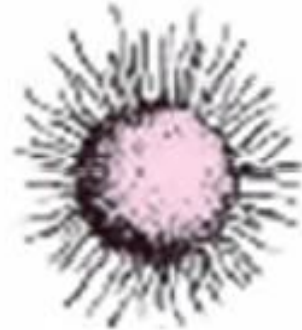
- Hình thái khuẩn lạc: hình dạng, kích thước, màu sắc, khuẩn ty,...
- Hình thái tế bào: hình dạng, kích thước, cách sắp xếp, Gram, di động (flagella, pili) bào tử, bao nhầy,...



Tròn



Không có hình dạng xác định



Có nhiều sợi nhỏ



Dạng chấm điểm



Phẳng



Nổi



Nhô cao



Lõm giữa



Dạng đứng



Trơn láng



Gợn sóng



Phân thùy



Răng cưa



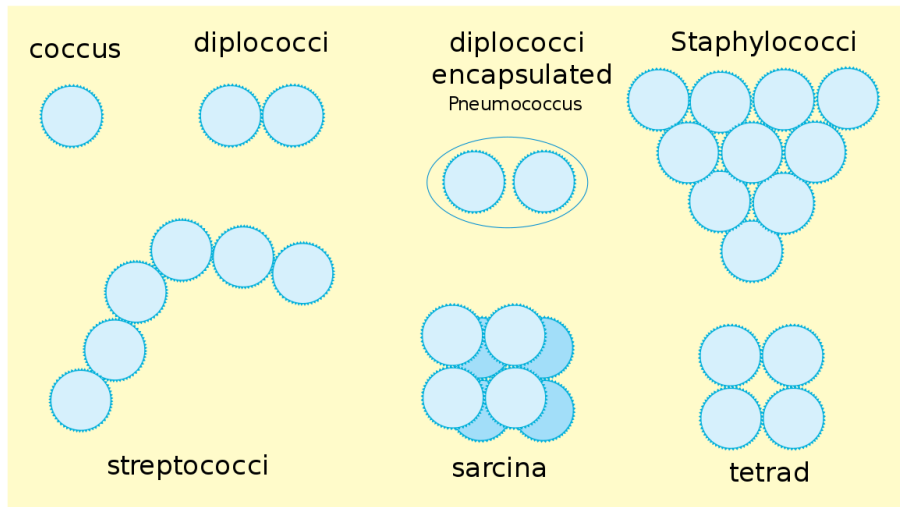
Nhiều sợi nhỏ



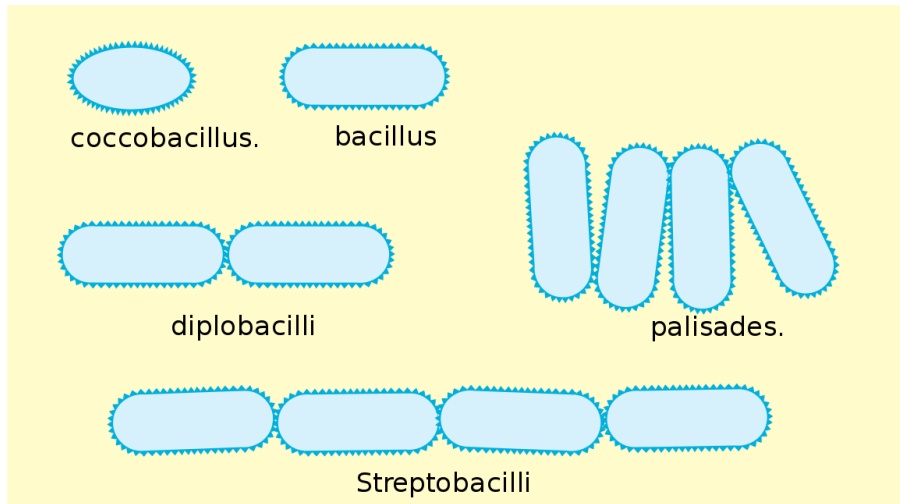
Gợn sóng

Một số hình dạng khuẩn lạc mọc trên môi trường rắn: hàng 1 (nhìn từ trên xuống), hàng 2 (nhìn ngang), hàng 3 (dạng rìa khuẩn lạc)

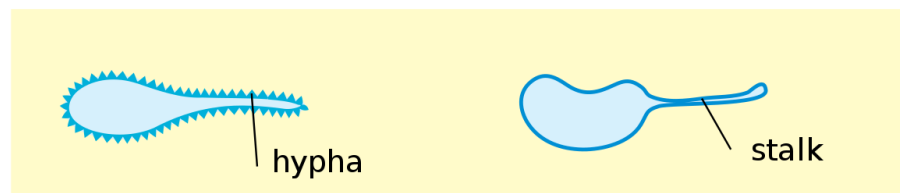
Cocci



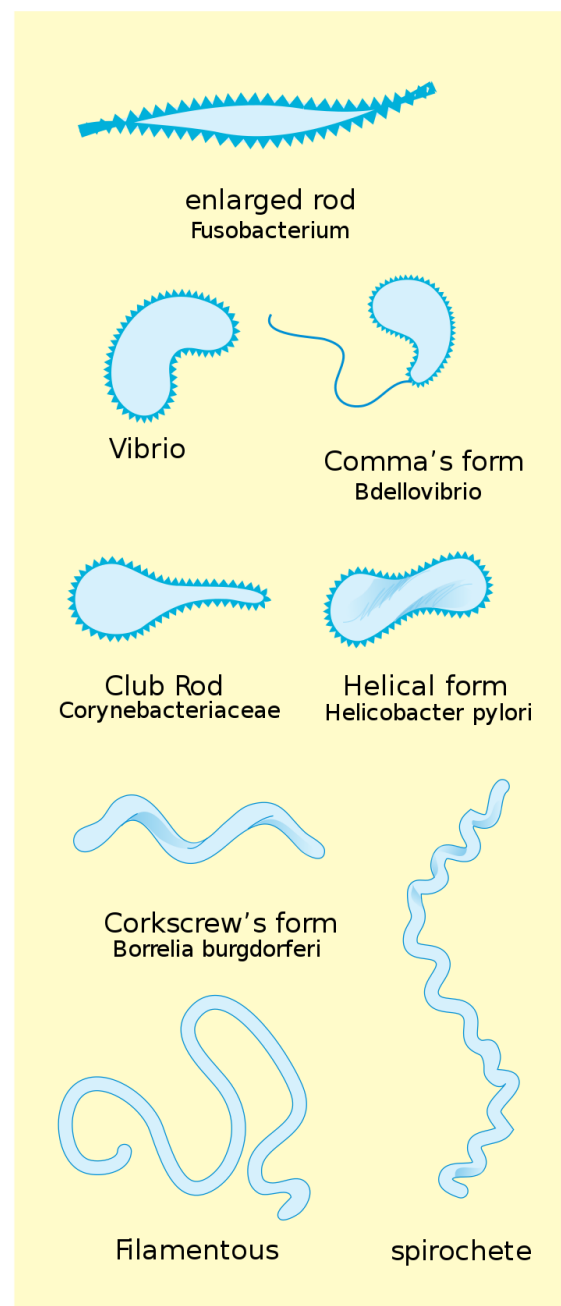
Bacilli



Budding and appendaged bacteria



Others



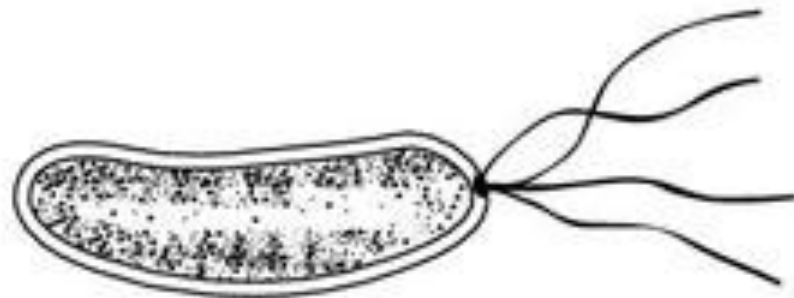
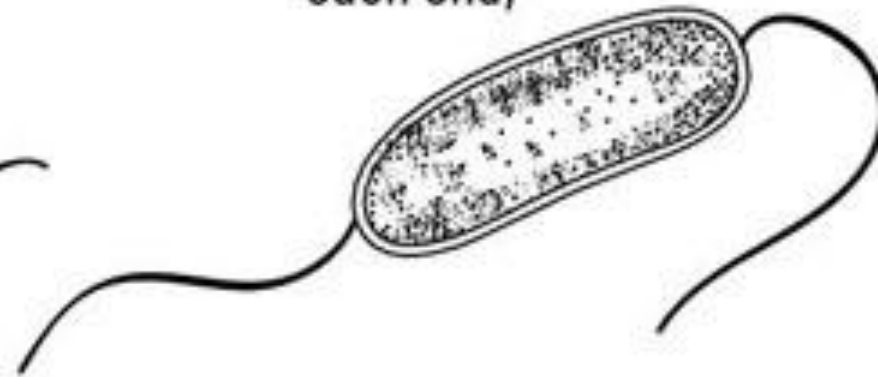
Atrichous
(no flagella)



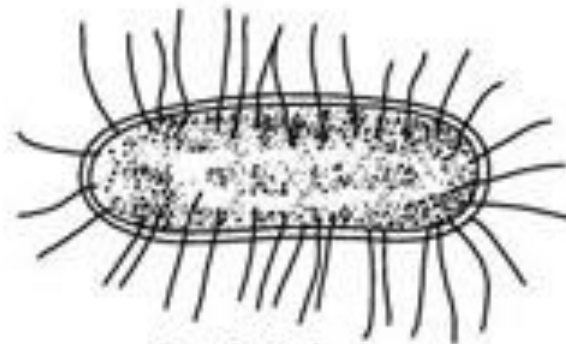
Monotrichous
(one flagellum at
one end)



Amphitrichous
(flagella at
each end)



Lophotrichous
(tuft of flagella
at one end)



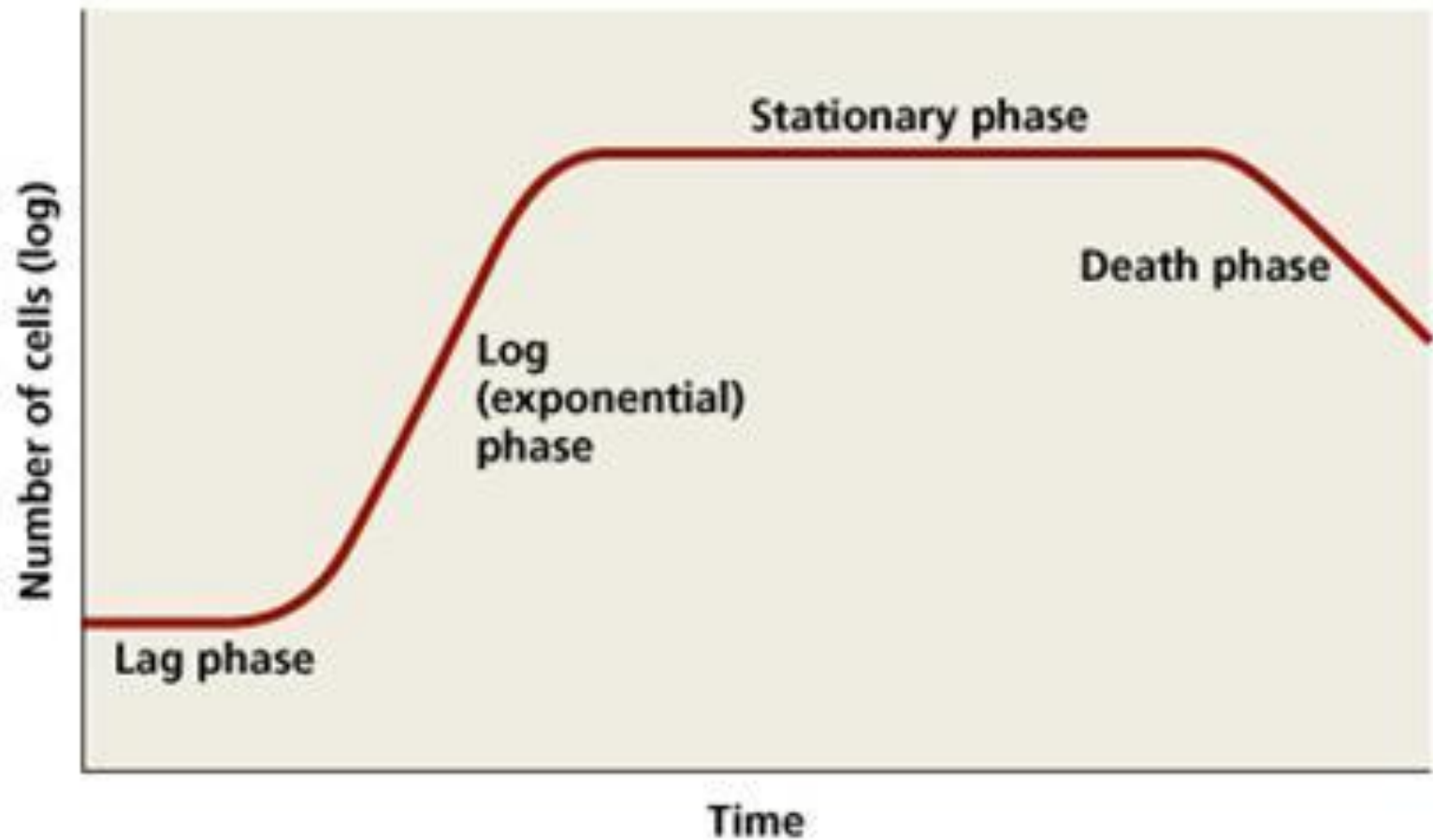
Peritrichous
(flagella all over)

Sinh lý và tăng trưởng VSV

1. Đường cong tăng trưởng

2. Ảnh hưởng của yếu tố môi trường

- pH
- Nhiệt độ
- Áp suất thẩm thấu
- Oxy



- **Pha ổn định:** số lượng tế bào không tăng (nhưng hoạt động chức năng vẫn tiếp tục)
- **Pha suy tàn:** giảm số lượng do tế bào phân hủy

Generation (thế hệ)

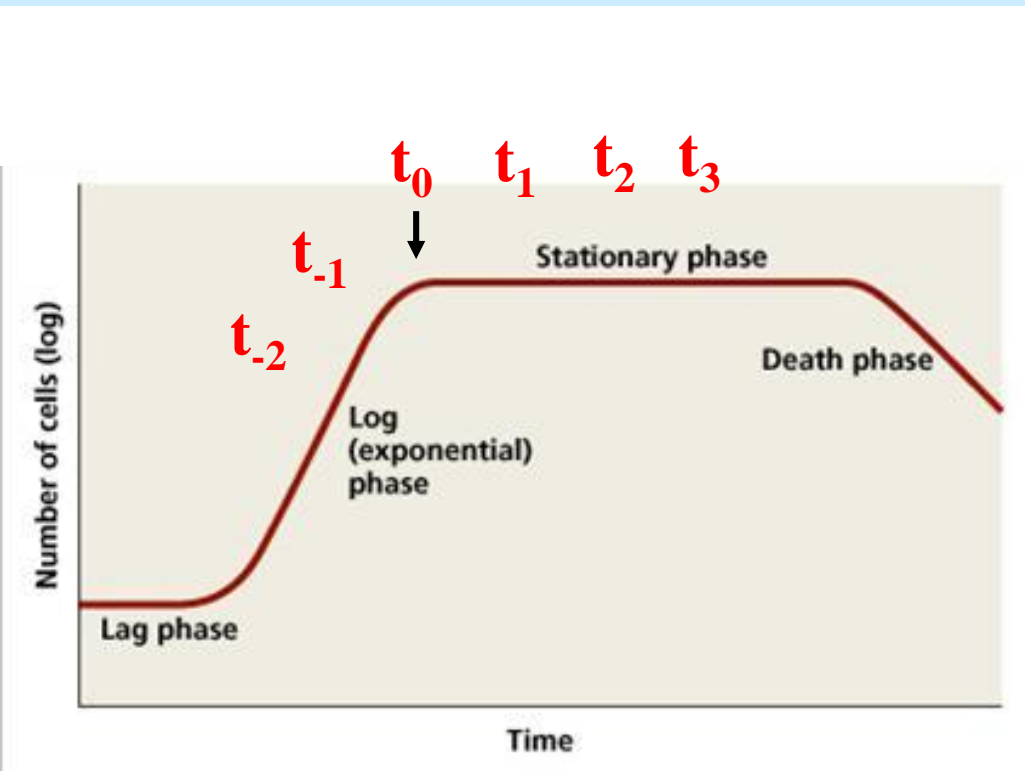
- Hiện tượng tế bào gấp đôi **x** \longrightarrow **2x**

- Thời gian thế hệ:

- ~20 phút – vài giờ
- < 10 phút
- > vài ngày

Ý nghĩa

Đường tăng trưởng được xem là thang thời gian của hoạt động sinh tổng hợp



- **Pha log**: hoạt động tăng trưởng mạnh mẽ nhất

➔ **Nghiên cứu thành phần tế bào, enzym**

- **Pha ổn định**: hoạt động chức năng mạnh mẽ

- Protease
- Tiếp nhận DNA ngoại bào
- Kháng sinh và killing factor
- Tạo bào tử

Các yếu tố môi trường

ảnh hưởng đến tăng trưởng của VSV

- ☐ Nhiệt độ
- ☐ pH
- ☐ Áp suất thẩm thấu
- ☐ Oxy

Chia nhóm Thảo luận

- 1. Nhiệt độ có ảnh hưởng như thế nào đến sự sinh trưởng của VSV?**
- 2. Căn cứ vào khả năng chịu nhiệt của VSV, có thể chia VSV thành mấy loại?**
- 3. Cho biết những ứng dụng về nhiệt độ đối với VSV trong đời sống?**

- 1. pH ảnh hưởng như thế nào đối với VSV?**
- 2. Dựa vào sự thích nghi pH của VSV có thể chia VSV thành mấy nhóm?**
- 3. Nêu một số ứng dụng trong đời sống về ảnh hưởng của pH đối với sinh trưởng của VSV?**

- 1. Áp suất thẩm thấu là gì?**
- 2. Nếu nuôi cấy VSV trong môi trường có nồng độ muối hoặc đường cao thì VSV sẽ bị ảnh hưởng như thế nào?**
- 3. Nêu một số sản phẩm được bảo quản tránh nhiễm VSV nhờ ứng dụng cơ chế của áp suất thẩm thấu?**

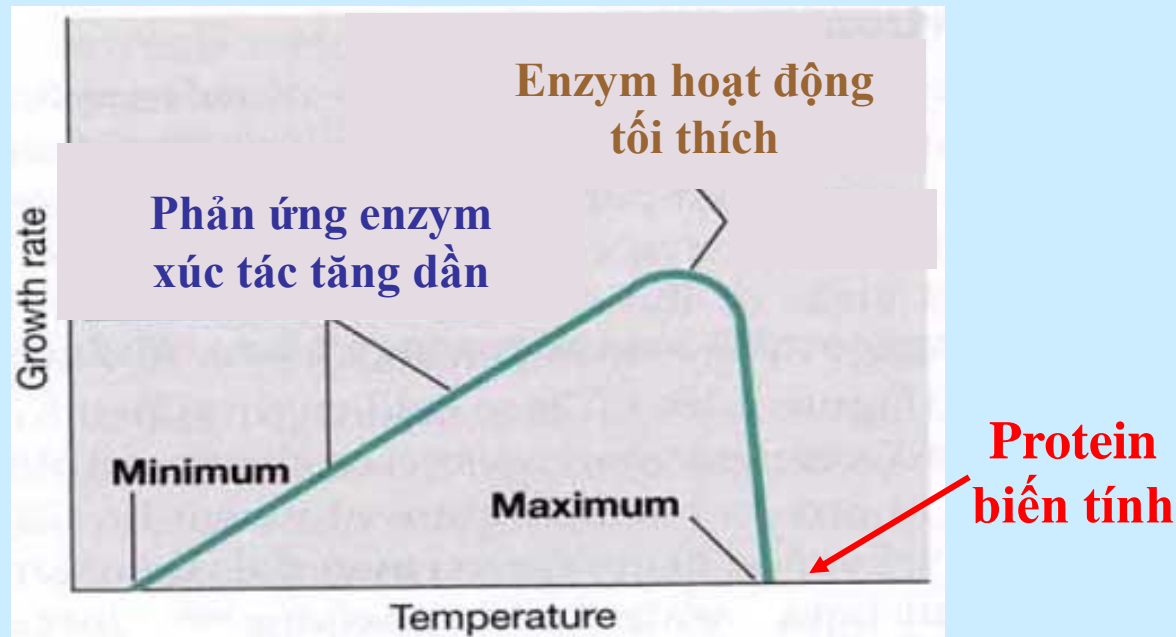
Các yếu tố môi trường

Các yếu tố vật lý	Vai trò	Ứng dụng
Nhiệt độ	<ul style="list-style-type: none">- Ảnh hưởng tốc độ phản ứng hóa học, sinh học trong tế bào- Nhiệt độ cao => VSV chết, nhiệt độ thấp => kìm hãm sinh trưởng của VSV	Diệt khuẩn (khử trùng, thanh trùng), kìm hãm sự hoạt động
Độ ẩm	<ul style="list-style-type: none">- Nước là dung môi của các chất dinh dưỡng, tham gia vào quá trình thủy phân các chất- Mỗi loại VSV có ngưỡng độ ẩm khác nhau	Làm khô => bảo quản lương thực, thực phẩm
pH	<ul style="list-style-type: none">- pH không thích hợp => ức chế sinh trưởng- Ảnh hưởng tính thấm qua màng, sự hình thành ATP	Muối chua rau cải => ức chế VK gây thối Làm khô, muối
Ánh sáng	Cần cho các quá trình tổng hợp, sinh sản	Dùng ánh sáng mạnh để diệt khuẩn
Áp suất thẩm thấu	Môi trường ưu trương => gây co nguyên sinh, VSV không phân chia	Ngâm rau củ quả trong nước muối

Nhiệt độ

- Ảnh hưởng phản ứng hóa học và hoạt động enzym

- Nhiệt độ cao làm biến tính protein
→ tế bào ngừng hoạt động
- Nhiệt độ thấp làm màng phospholipid trở nên **cứng ngắt**



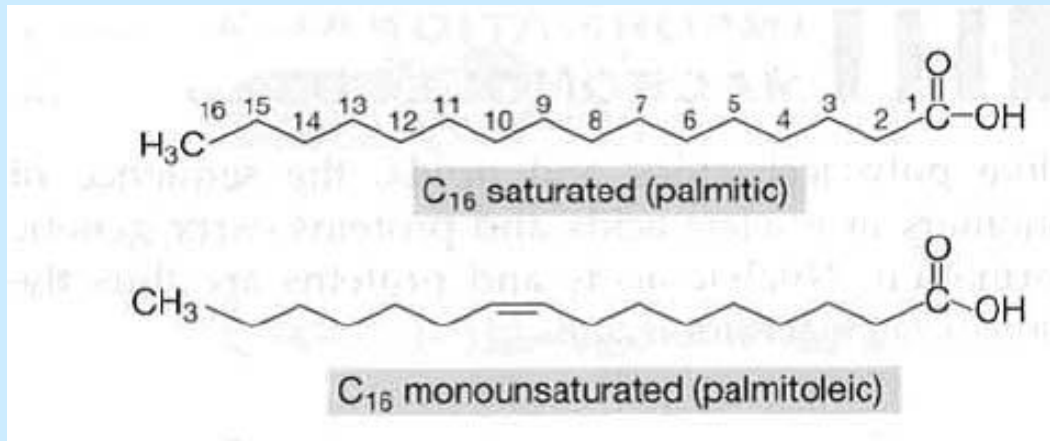
VSV cực đoan

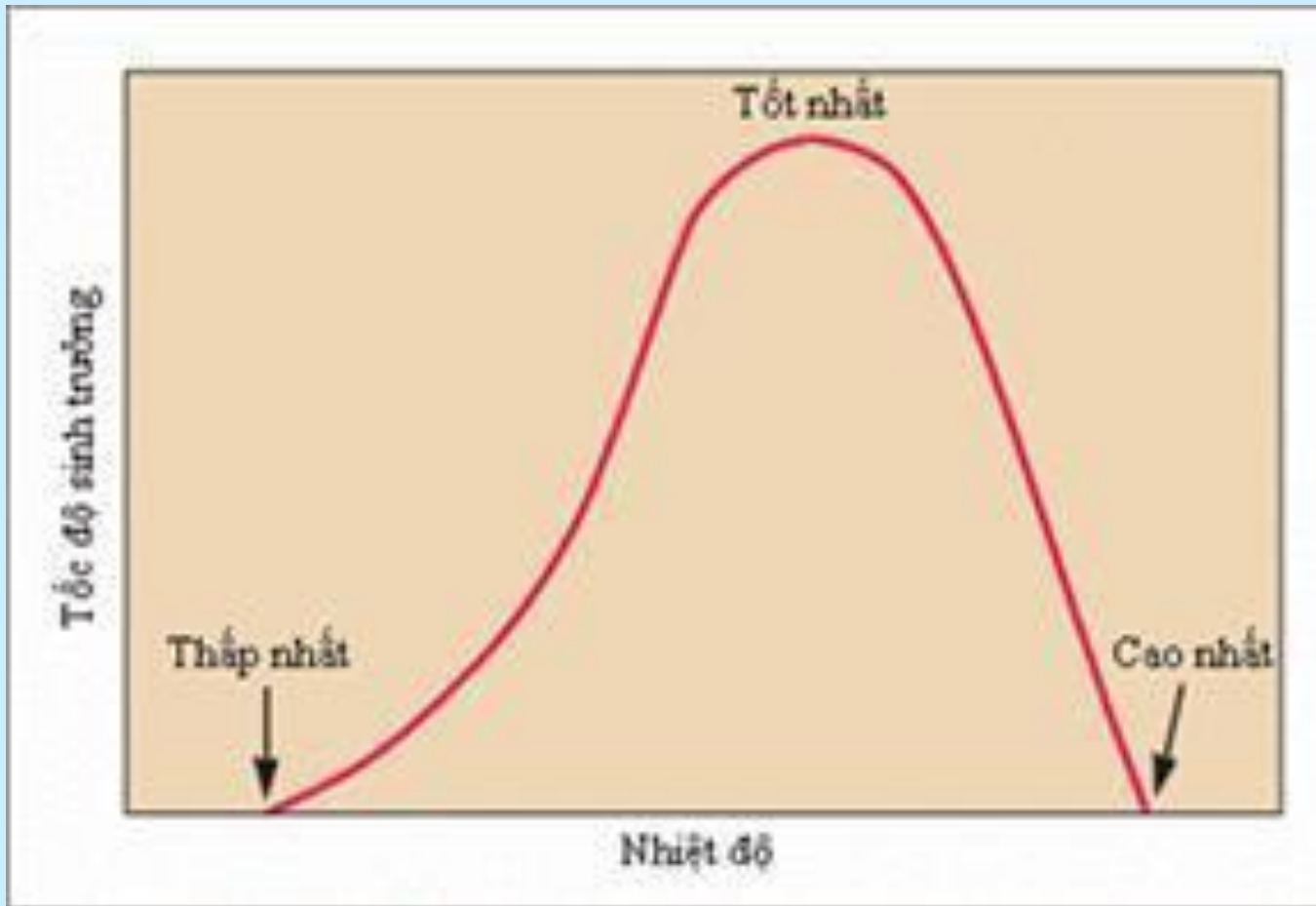
VSV chịu nhiệt:

- Có hệ enzym và protein (có sự gấp cuộn thích hợp) bền với nhiệt độ cao
- Màng tế bào chất bền nhiệt: màng phospholipid với chuỗi acid béo bão hòa cao

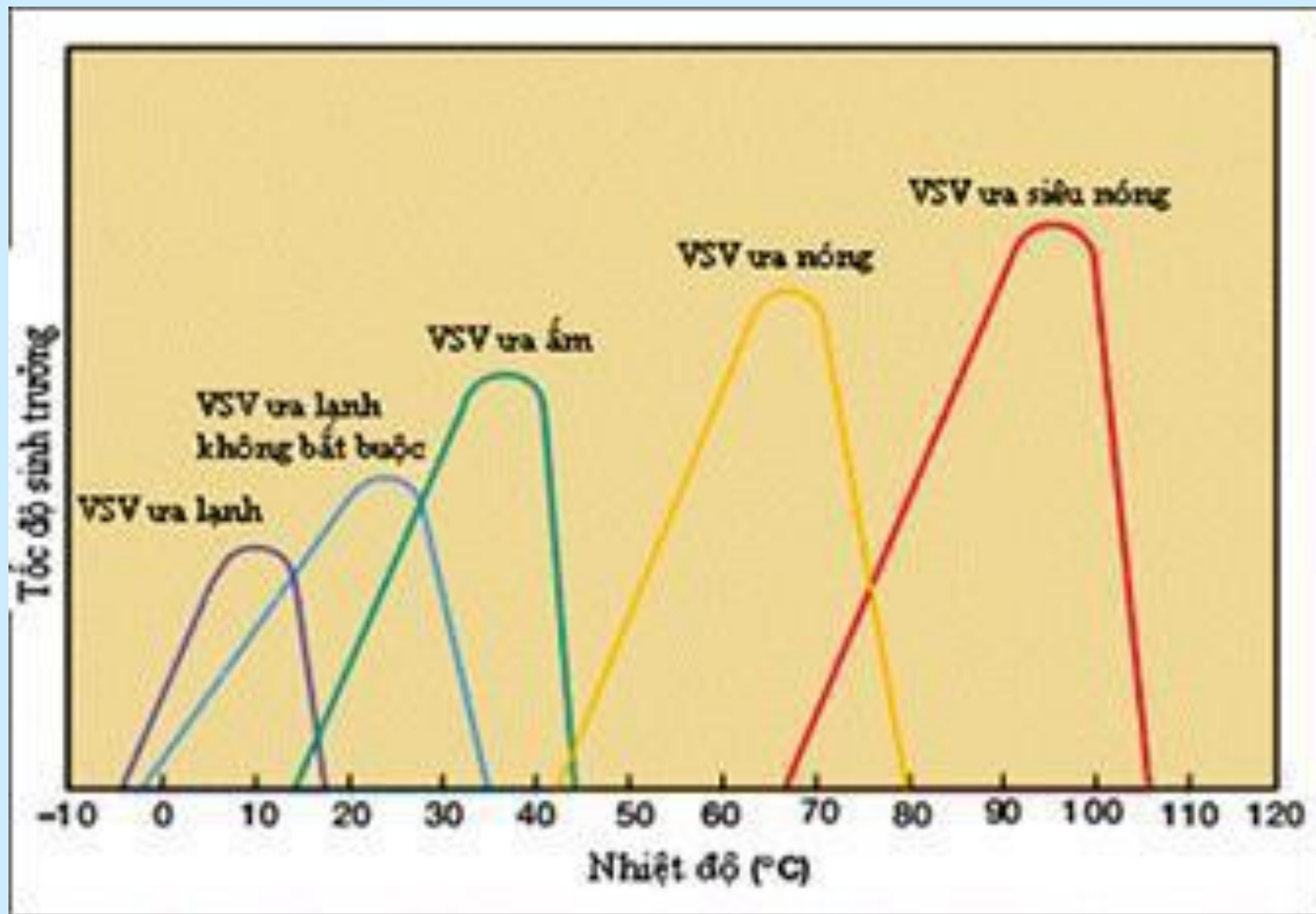
VSV chịu lạnh:

Màng phospholipid với chuỗi acid béo ít bão hòa (nhiều nối đôi)





Ảnh hưởng của nhiệt độ đối với tốc độ sinh trưởng của vi sinh vật



Phạm vi nhiệt độ sinh trưởng của vi sinh vật

pH

(nồng độ ion hydro)

- $\text{pH} = -\log[\text{H}^+]$

($\text{pH} = 7 \rightarrow \text{H}^+ = 10^{-7} \text{ mol/l}$)

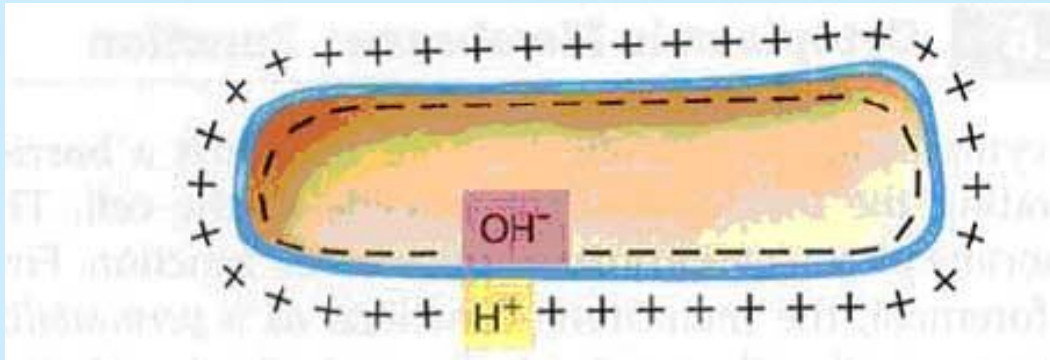
- VSV có thể khả năng phát triển ở khoảng pH dao động
2 - 3 đơn vị

acidophiles (ưa acid): $\text{pH} < 2,0$

alkaliphiles (ưa kiềm): $\text{pH}: >9,0$

VSV cực đoan

Ua acid: đặc tính màng tế bào chất cần H^+ để duy trì tính bền



Ua kiềm:

- cơ chế không rõ
- hệ enzym thủy phân (protease, lipase, ...)

hoạt động **tối ưu tại pH thấp**

Đáp ứng của VSV trong môi trường ưu trương

(VSV chịu mặn)

Table 6.3 Compatible solutes of microorganisms

Organism	Major solute(s) accumulated
<i>Bacteria</i> , nonphototrophic	Glycine betaine, proline (mainly gram-positive), glutamate (mainly gram-negative)
Freshwater cyanobacteria	Sucrose, trehalose
Marine cyanobacteria	α -Glucosylglycerol
Marine algae	Mannitol, various glycosides, proline, dimethylsulfoniopropionate
Salt lake cyanobacteria	Glycine betaine
Halophilic anoxygenic phototrophic <i>Bacteria</i> (<i>Ectothiorhodospira</i> / <i>Halorhodospira</i> and <i>Rhodovibrio</i> species)	Glycine betaine, ectoine, trehalose
Extremely halophilic <i>Archaea</i> (for example, <i>Halobacterium</i>) and some <i>Bacteria</i> (for example, <i>Haloanaerobium</i>)	KCl
<i>Dunaliella</i> (halophilic green alga)	Glycerol
Xerophilic yeasts	Glycerol
Xerophilic filamentous fungi	Glycerol

Oxy

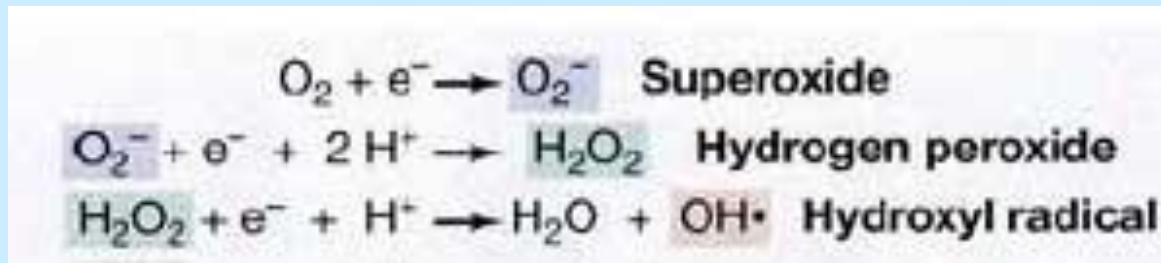
Oxy là nhu cầu / chất ức chế

→ **Phân nhóm VSV**

- **VSV hiếu khí:**
 - Thích hợp với $[O_2]$ **cao** (oxy không khí, 21%)
(Hô hấp **hiếu khí** cần oxy cho quá trình trao đổi chất)
- **VSV vi hiếu khí:**
 - Thích hợp với $[O_2]$ **thấp** (khả năng hô hấp hạn chế, hoặc enzym nhạy cảm với oxy)
- **Hiếu khí tùy ý:**
 - Phát triển ở điều kiện **có hoặc không** có oxy
- **Kỵ khí bắt buộc:**
 - Hô hấp kỵ khí, **bị ức chế bởi oxy**
- **Kỵ khí tùy ý:**
 - Hô hấp kỵ khí, nhưng **vẫn phát triển được với oxy**

Các dạng oxy độc tính

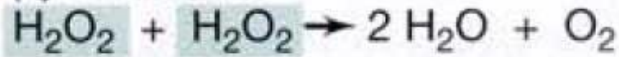
Sản phẩm của quá trình khử O_2 thành H_2O trong hô hấp



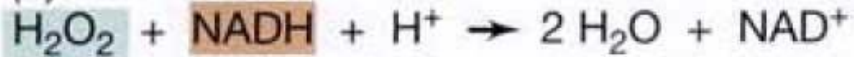
- Superoxid anion (O_2^-)
 - gốc tự do hydroxyl (OH^\bullet)
 - Hydro peroxid (H_2O_2): phá hủy
- oxy hóa tất cả các
hợp chất hữu cơ trong tế bào
thành phần tế bào

Enzym chuyển hóa

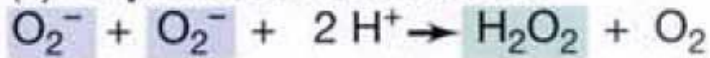
(a) Catalase:



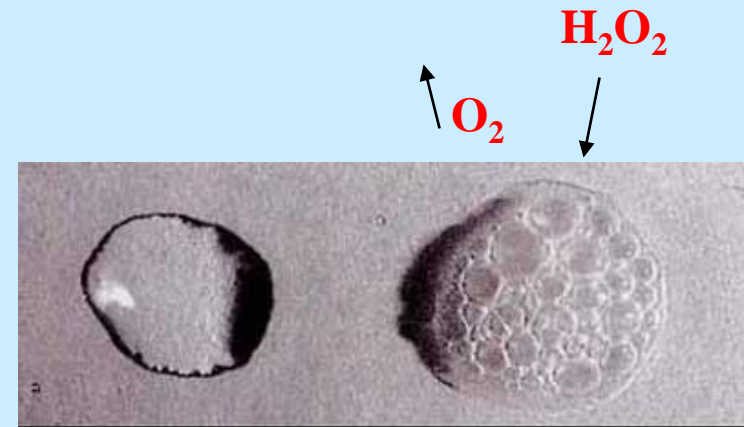
(b) Peroxidase:



(c) Superoxide dismutase:



(d) Superoxide dismutase/catalase in combination:

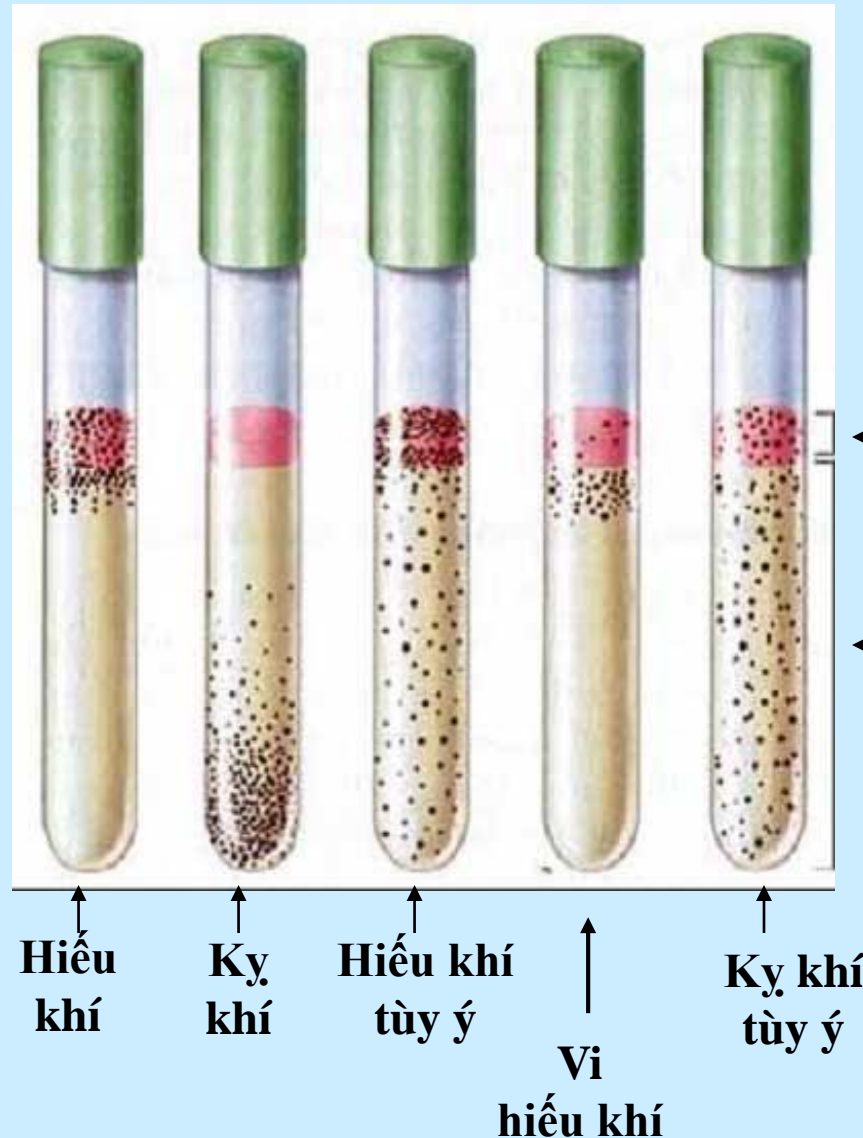


Catalase test

Enzym		Hiếu khí	Hiếu khí tùy ý	Vì hiếu khí	Kỵ khí	Kỵ khí tùy ý
(Chức năng giống dimustase)	Catalase	✓	✓	yếu	—	—
	Dismutase	✓	✓	?	—	—
	Phức	—	—	—	—	✓
	hợp protein	—	—	—	—	✓

Thử nghiệm

ảnh hưởng
của oxy



Resazurin

← **Hiếu khí**

← **Kỵ khí**

	Vai trò	Nguồn cung cấp
Cacbon	<ul style="list-style-type: none"> - Là bộ khung cấu trúc của chất sống, cần cho tất cả các chất hữu cơ. - Chiếm tới 50% khối lượng khô của 1 tế bào. 	<ul style="list-style-type: none"> - VSV hóa dị dưỡng: protein, cacbonhidrat, lipit - VSV hóa dị dưỡng: CO_2
Nitơ, lưu huỳnh và phospho	<ul style="list-style-type: none"> - N, S là thành phần quan trọng trong các phân tử: Protein, ADN, ARN, ATP. - Lưu huỳnh dùng để tổng hợp ATP, các acid amin chứa lưu huỳnh như: xistêin, methionin. - N chiếm 14%, S và P chiếm khoảng 4%. 	<ul style="list-style-type: none"> - Từ ion NH_4^+ trong một số chất hữu cơ hoặc từ NO_3^- - Một số VSV lấy từ N_2: VK lam..
Ôxy	<p>Dựa vào nhu cầu oxi chia VSV thành:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Hiếu khí bắt buộc: chỉ sinh trưởng trong môi trường có oxi. (Nấm, ĐV nguyên sinh) - Kị khí bắt buộc: chỉ sinh trưởng trong môi trường không có oxi. (VK uốn ván) - Kị khí không bắt buộc: sống trong môi trường có thể có oxi hoặc không. (Nấm men rượu) - Vi hiếu khí: có thể sống trong môi trường có nồng độ oxi thấp hơn nồng độ oxi trong khí quyển. (VK giang mai) 	Lấy từ khí quyển.
Các yếu tố sinh trưởng	<ul style="list-style-type: none"> - Là các chất cần cho sự sinh trưởng của VSV nhưng chúng không thể tự tổng hợp: Vitamin, acid amin, base purin.. 	Môi trường nuôi cấy, môi trường tự nhiên.

Định danh VSV

- Hình thái
- Đặc tính sinh lý
- Phản ứng sinh hóa
- Cấu trúc và thành phần hóa học
- Yếu tố di truyền

**Tiêu biểu và
đa dạng**

Hình thái

- hình dạng tế bào
- khả năng di động
- tính gram

Sinh lý

Giới hạn thích hợp cho tăng trưởng

- khoảng nhiệt độ
- khoảng pH
- nồng độ muối



**Đặc tính sinh thái
VSV**

Sinh hóa

Khả năng chuyển hóa

- nguồn Carbon
(50 nguồn carbon)
- nguồn Nito

→ **Hệ enzym đa dạng**

(107 phản ứng enzym với
cơ chất được thiết lập để
phân biệt)



Cấu trúc và thành phần hóa học

Thành phần hóa học

- Loại acid béo (thành phần màng TB)
- Loại quinon (thành phần hệ hô hấp)
- % G+C

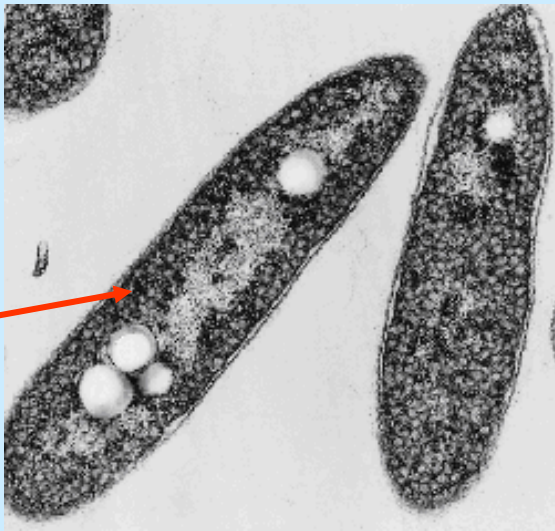
Số lượng Carbon

Mạch thẳng/ nhánh

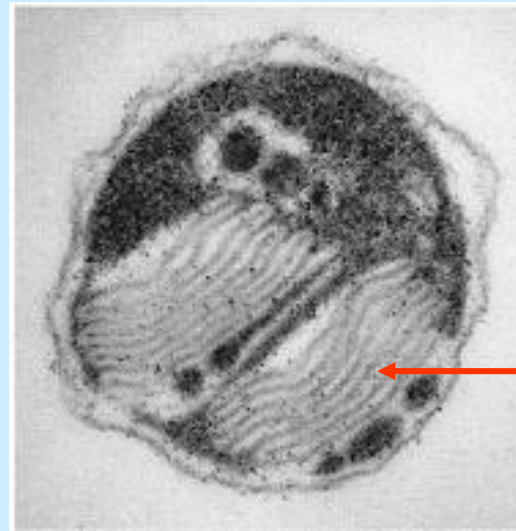
Cấu trúc hóa học

cấu trúc màng trong tế bào chất đa dạng (ở VKQH)

Hình cầu



Hình phiên



Phân tử di truyền phổ quát

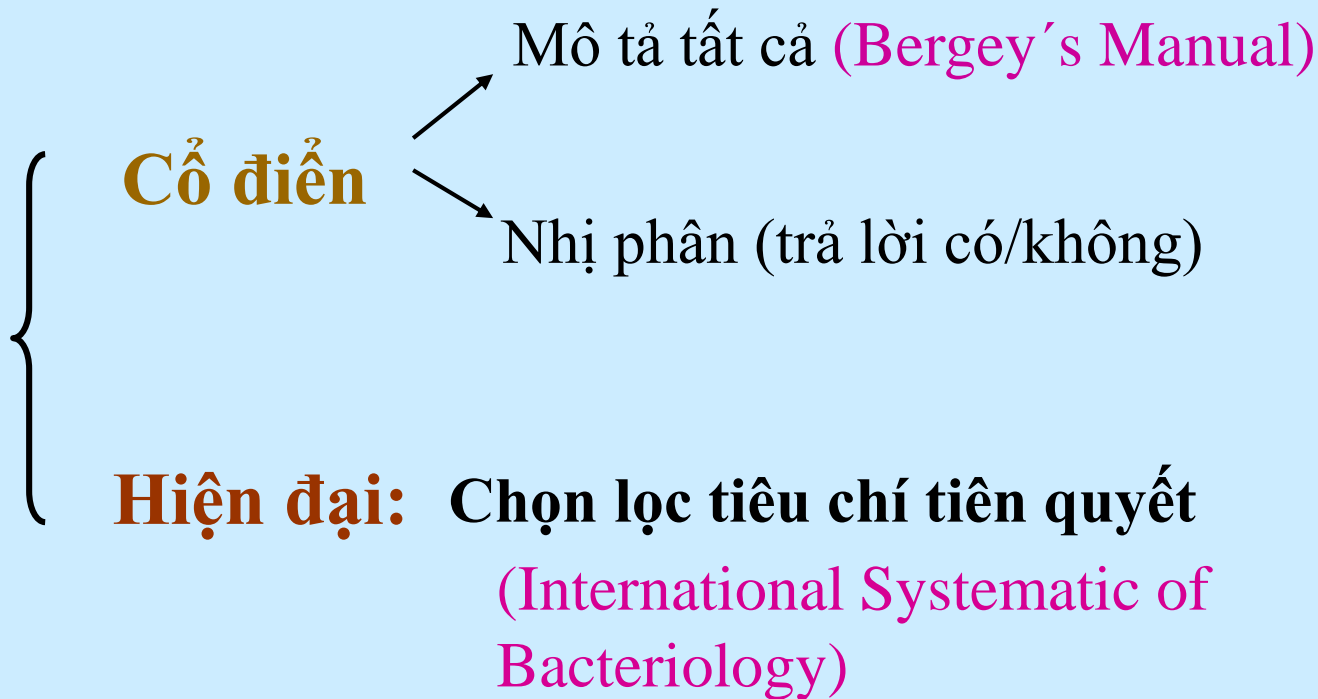
Trình tự gen mã hóa

- 16S rRNA (Vi khuẩn, Xạ khuẩn)
- 18S rRNA (Nấm men)
- 23S rRNA (Nấm mốc)

Đặc tính

- bảo tồn (đặc trưng cho giống) và đa dạng (mức loài)
- có thể nhân bản gen bằng môi phổ quát
- ngân hàng gen này đã thiết lập (~ 90.000 trình tự ở Vi khuẩn)

Chiến lược định danh



Chiến lược định danh

Mô tả

Nhị phân (trả lời có/không)

Hình thái

.....

.....

Sinh lý

.....

.....

Sinh hóa

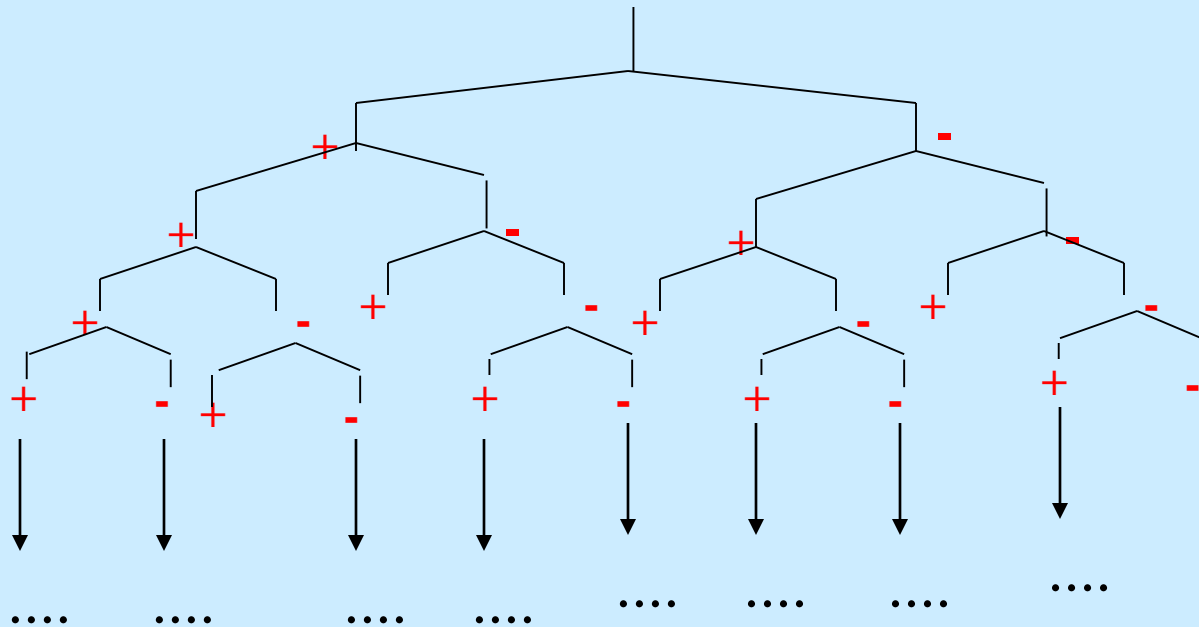
.....

.....

Thành phần hóa học

.....

.....



Chiến lược định danh

→ **Chọn lọc tiêu chí**

Vi khuẩn

- Hình thái
- Đặc tính sinh lý
- Phản ứng sinh hóa
- Cấu trúc và thành phần hóa học
- Phân tử 16S rRNA

Thứ cấp
(Giới hạn
đặc tính cần
kiểm tra)

Tiền cấp

99,8%

< ~95%

Tương đồng với type strain

Loài mới ???

Chiến lược định danh

→ **Chọn lọc tiêu chí**

- **Hình thái**
- **Đặc tính sinh lý**
- **Phản ứng sinh hóa**
- **Cấu trúc và thành phần hóa học**
- **Phân tử di truyền**

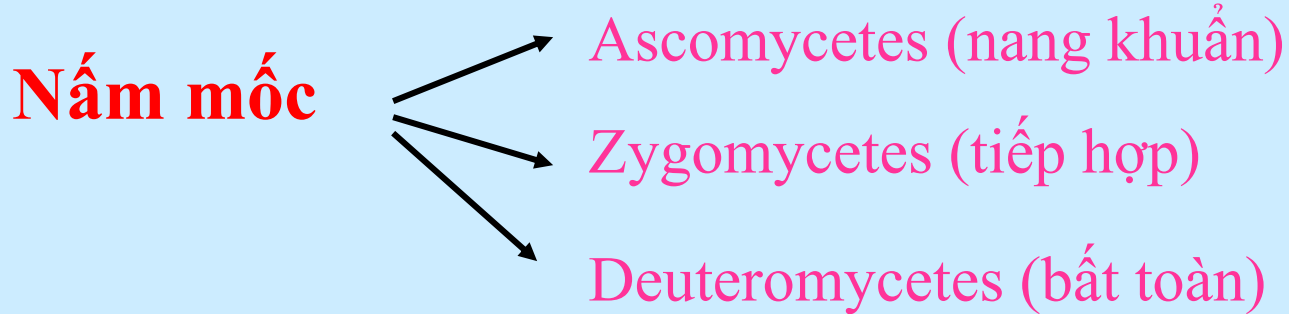
**Nấm mốc/Xạ khuẩn
/Nấm men**

Tiền cấp

Thứ cấp

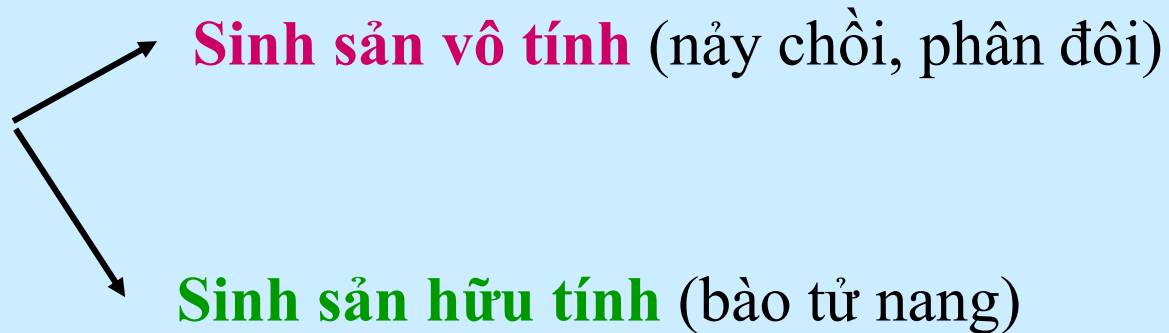
Tiêu chí hình thái

Cấu trúc cơ quan sinh bào tử

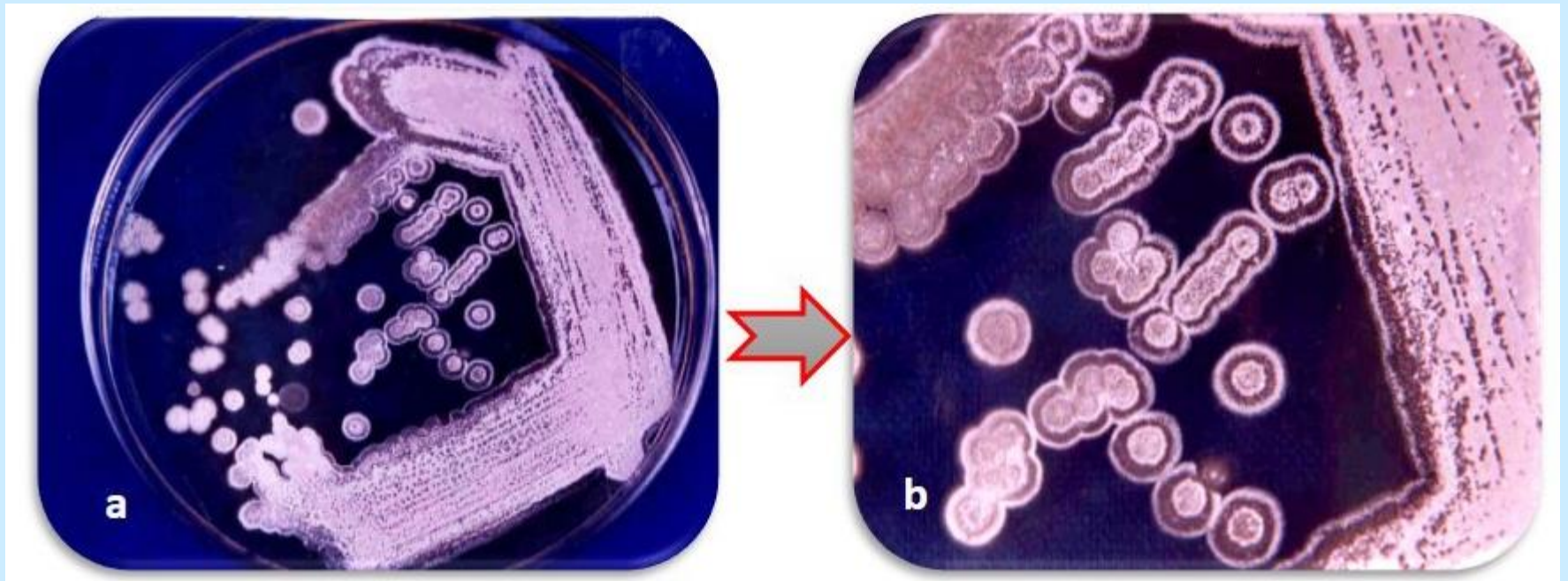


Nấm men

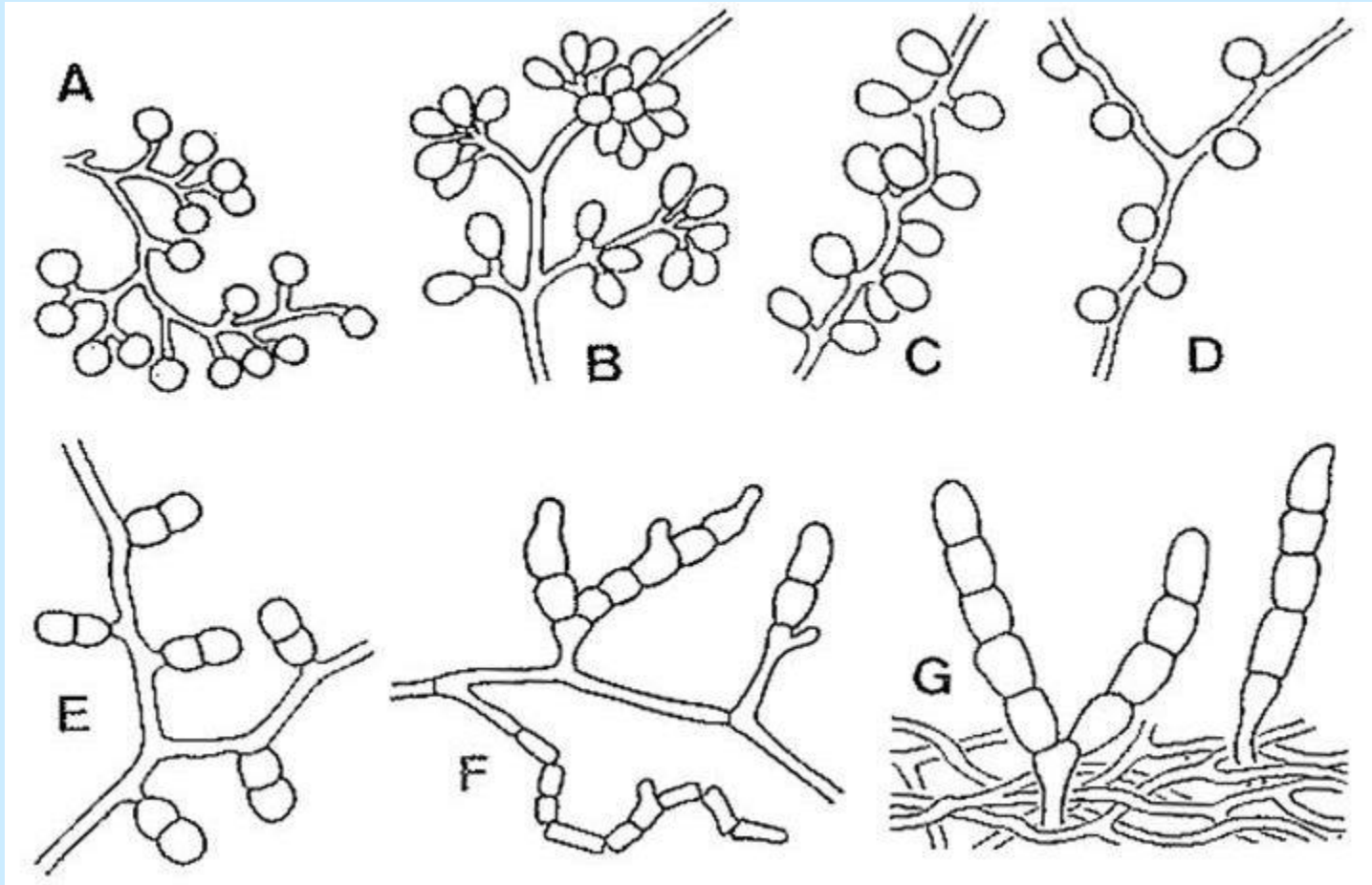
Kiểu nảy chồi/ nang bào tử



Xạ khuẩn



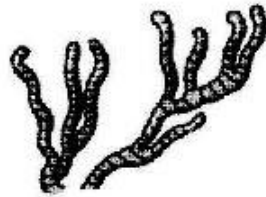
Xạ khuẩn



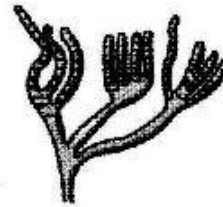
Single spore production and spores in short chains Monosporous:
(A) *Micromonospora*, (B) *Thermomonospora*, (C) *Saccharomonospora*,
(D) *Thermoactinomyces*. **Disporous:** (E) *Microbispora*. **Oligosporous:**
(F) *Nocardia brevicatena*, (G) *Catellatospora*.



Straight



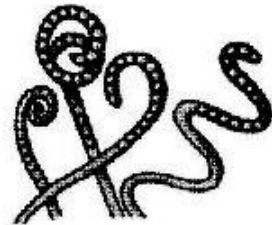
Flexous



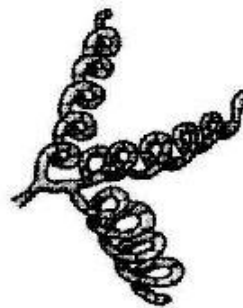
Fascicled



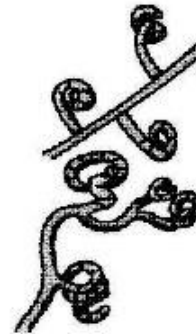
Monoverticillate,
no spirals



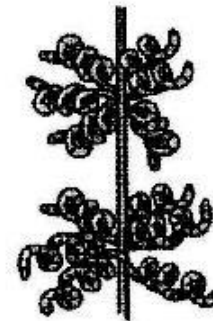
Open loops,
primitive spirals,
hooks



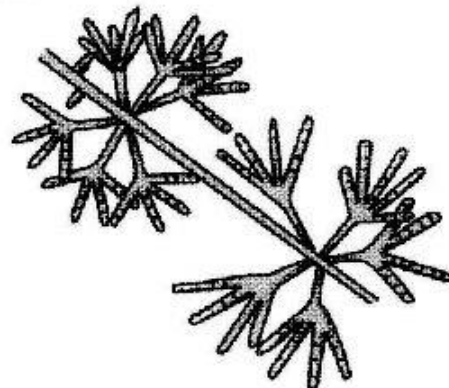
Open
spirals



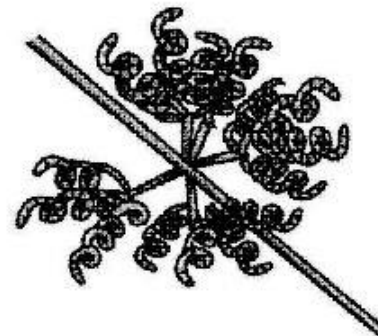
Closed
spirals



Monoverticillate,
with spirals



Biverticillate,
no spirals



Biverticillate,
with spirals

Microbial Art



Microbial Art



Microbial Art



Microbial Art





