

# Chương 6:

## Sinh thái học vi sinh vật

- 1. Mục tiêu của sinh thái học vi sinh vật**
- 2. Đặc điểm của vi sinh vật trong tự nhiên**
- 3. Các phương pháp nghiên cứu sinh thái học vi sinh vật**
- 4. Hoạt động và vai trò của vi sinh vật trong các hệ sinh thái**
- 5. Vai trò của vi sinh vật trong các chu trình sinh địa hóa các nguyên tố**

# Mục tiêu của sinh thái học vi sinh vật

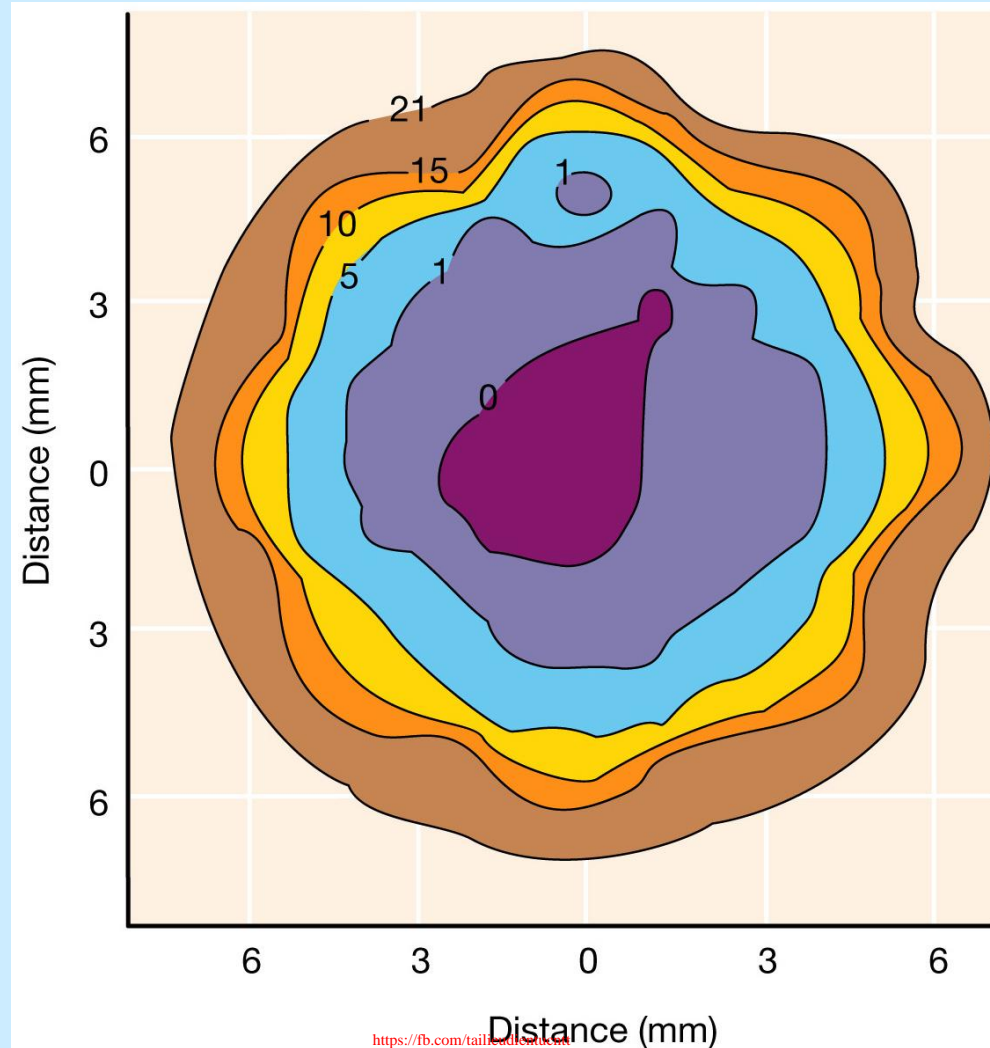
- Sinh thái học (ecology): nghiên cứu sự hình thành tồn tại và phát triển của một hệ thống các sinh vật cùng với các điều kiện không sống nhất định trong mối quan hệ hữu cơ tác động qua lại với nhau.
- Sinh thái học vi sinh vật (microbial ecology): nghiên cứu vi sinh vật về khía cạnh sinh thái học
- Mục tiêu của sinh thái học vi sinh vật:
  - + Nghiên cứu sự đa dạng sinh học (chủng loại, số lượng) của vi sinh vật trong tự nhiên, sự tương tác của các quần dưỡng khác nhau trong quần xã
  - + Nghiên cứu hoạt tính của vi sinh vật trong tự nhiên và giám sát tác động của vi sinh vật lên hệ sinh thái
  - + Vi sinh vật học môi trường (vi sinh môi trường): Environmental Microbiology)

# Ý nghĩa của nghiên cứu sinh thái học VSV

- Vi sinh vật có vai trò thiết yếu cho sự duy trì phát triển của các hệ sinh thái:
  - + Thu lấy năng lượng ánh sáng, cố định đạm, cố định  $\text{CO}_2$ , tạo  $\text{O}_2$ , phân hủy chất hữu cơ
  - + Là tác nhân chính thực hiện các phản ứng trong chu trình sinh địa hóa các nguyên tố cần cho sự sống
  - + Là tác nhân giúp phân hủy độc chất, phục hồi môi trường
- Sinh thái học VSV giúp hiểu được tương tác của VSV với nhau và với môi trường, hiểu vai trò của VSV trong điều kiện tự nhiên của các hệ sinh thái

# Habitat, niche, microenvironment

- Môi trường sống của vi sinh vật:
  - + Habitat: môi trường sống nơi các quần thể, quần dưỡng hình thành quần xã
  - + Niche: là vi môi trường tối ưu cho sự tăng trưởng của VSV
- Trong tự nhiên, vi môi trường (microenvironment) là nơi mà VSV thực tế sống và biến dưỡng:
  - + Các điều kiện hóa lý của vi môi trường biến đổi rất nhanh theo không gian và thời gian
  - + Trong một không gian vật lý hẹp có sự tồn tại nhiều vi môi trường khác nhau
  - + Tính không đồng nhất của vi môi trường quyết định tính đa dạng của VSV



## **Màng sinh khối (biofilm)**

- **Chất dinh dưỡng là nhân tố hạn chế tốc độ tăng trưởng trong hầu hết các môi trường tự nhiên và được cung cấp ở dạng xung**
- **Vi sinh vật thường hiện diện trên bề mặt một giá thể do nồng độ chất dinh dưỡng giới hạn ở đây cao hơn tạo thành màng sinh khối (biofilm) hoặc tập hợp các khuẩn lạc của các quần thể khác nhau**

# Tăng trưởng của VSV trong tự nhiên

- **Chất dinh dưỡng trong tự nhiên - tài nguyên (resources) cho VSV không được cung cấp liên tục**
- **VSV tăng trưởng thành xung theo nguồn tài nguyên của môi trường**
- **Các chất dự trữ trong tế bào (PHA, PHB, polysaccharide, polyphosphate) được sử dụng khi nguồn tài nguyên bị cạn kiệt**
- **Đặc điểm chung của tăng trưởng của VSV trong tự nhiên:**
  - + **Tăng trưởng hàm mũ thường ngắn**
  - + **Tốc độ tăng trưởng nhỏ hơn rất nhiều so với trường hợp nuôi cấy thuần chủng trong phòng thí nghiệm**
- **Tốc độ tăng trưởng chậm do:**
  - + **Nguồn chất dinh dưỡng thấp**
  - + **Phân bố chất dinh dưỡng không đồng đều**
  - + **Bị cạnh tranh bởi các quần thể khác**

# Sự hình thành quần xã vi sinh vật

- Các mức tổ chức của vi sinh vật trong tự nhiên

+ Tế bào

+ Quần thể (population): tập hợp các tế bào cùng loài, được hình thành do sự tăng trưởng của các tế bào riêng biệt trong một vi môi trường nhất định

+ Quần dưỡng (guild): tập hợp các quần thể khác loài có đặc tính chung về nguồn chất dinh dưỡng, các yếu tố hoá lý trong một vi môi trường

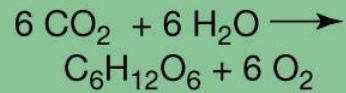
+ Quần xã, hệ vi sinh vật (community): tập hợp nhiều quần dưỡng cùng hiện diện trong một điều kiện môi trường, tiến hành những quá trình sinh lý hỗ trợ nhau để cùng tăng trưởng

+ Hệ sinh thái (ecosystem): nhiều quần xã được hình thành có mối quan hệ với nhau về năng lượng và vật chất

### Community 1

Photic zone:

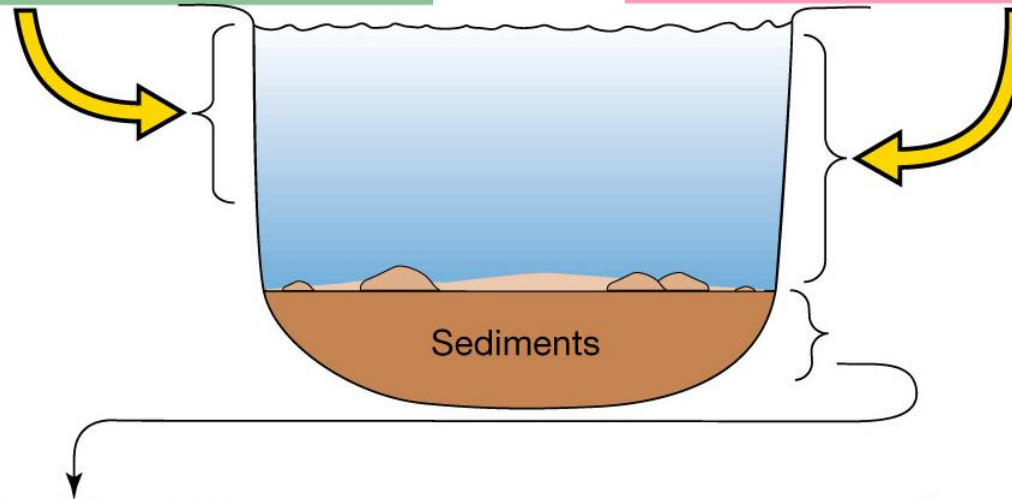
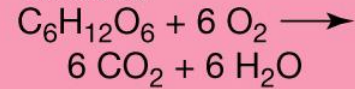
Oxygenic phototrophs



### Community 2

Oxic zone:

Aerobes and facultative aerobes



### Community 3

Anoxic zone: Fermentative and other anaerobes

1. Guild 1: methanogenic bacteria ( $\text{CO}_2 \longrightarrow \text{CH}_4$ )  
homoacetogenic bacteria ( $\text{CO}_2 \longrightarrow \text{acetate}$ )
2. Guild 2: sulfate-reducing bacteria ( $\text{SO}_4^{2-} \longrightarrow \text{H}_2\text{S}$ )  
sulfur-reducing bacteria ( $\text{S}^0 \longrightarrow \text{H}_2\text{S}$ )
3. Guild 3: denitrifying bacteria ( $\text{NO}_3^- \longrightarrow \text{N}_2$ )  
ferric iron-reducing bacteria ( $\text{Fe}^{3+} \longrightarrow \text{Fe}^{2+}$ )
4. Guild 4: fermentative bacteria (fermenting sugars, amino and fatty acids, and so on)



# **Các phương pháp nghiên cứu sinh thái học vi sinh vật**

- **Phương pháp xác định độ đa dạng:**
  - + **Phương pháp nuôi cấy và phương pháp không nuôi cấy**
  - + **Phương pháp dựa trên kiểu hình và phương pháp dựa trên kiểu gen**
  - + **Phương pháp định tính và phương pháp định lượng**
- **Phương pháp xác định hoạt tính:**
  - + **Tốc độ biến dưỡng tài nguyên**
  - + **Tốc độ tăng trưởng**

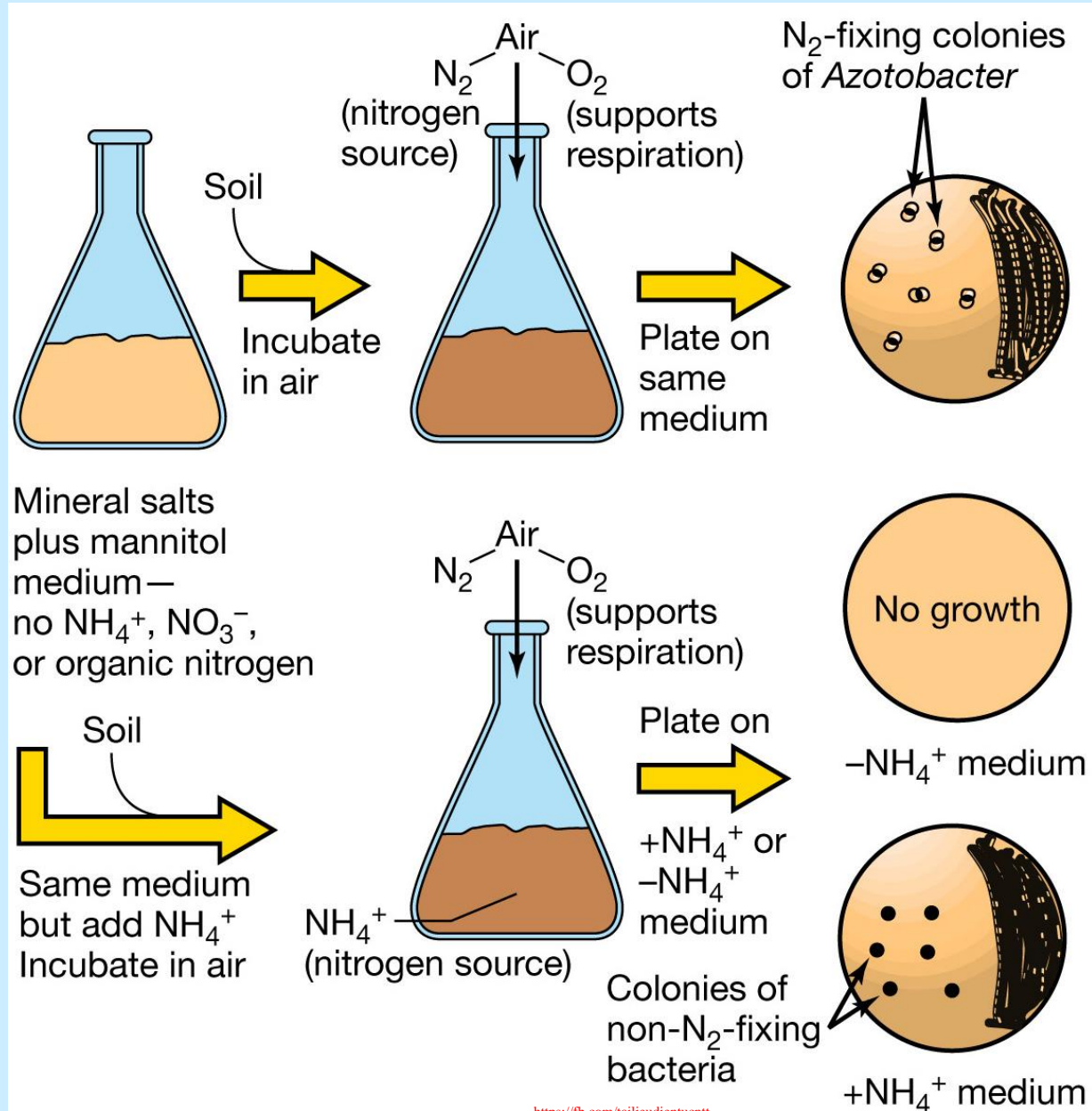
# Phương pháp nghiên cứu tính đa dạng

# Phương pháp nuôi cấy

- Nuôi tích lũy (enrichment culture): dùng môi trường chọn lọc và điều kiện tốt ưu để làm tăng tỷ lệ hiện diện tương đối của vi sinh vật mục tiêu từ một nguồn tự nhiên
- Phân lập và làm thuần vi sinh vật mục tiêu

# Nuôi tích lũy

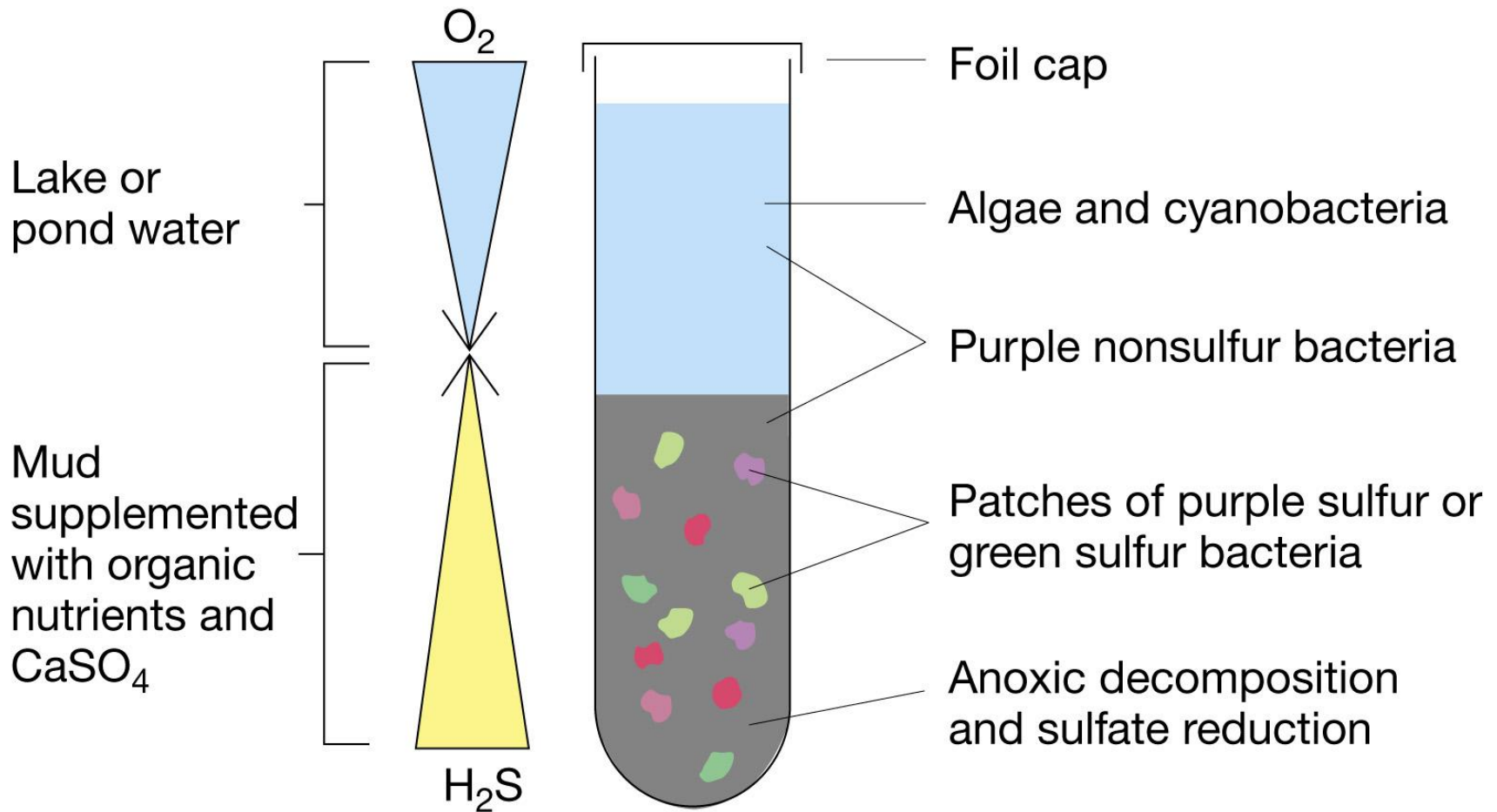
- Nuôi tích lũy = nuôi làm giàu
- Nuôi tích lũy trong hệ kín:
  - + Môi trường chọn lọc lỏng, điều kiện hóa lý chọn lọc, nguồn phân lập thích hợp
  - + Chỉ thu được các quần thể tăng trưởng nhanh của một quần dưỡng
- Nhược điểm của phương pháp nuôi tích lũy trong phân tích tính đa dạng: quần thể thu được trong nuôi tích lũy không chắc là quần thể chiếm ưu thế trong mẫu



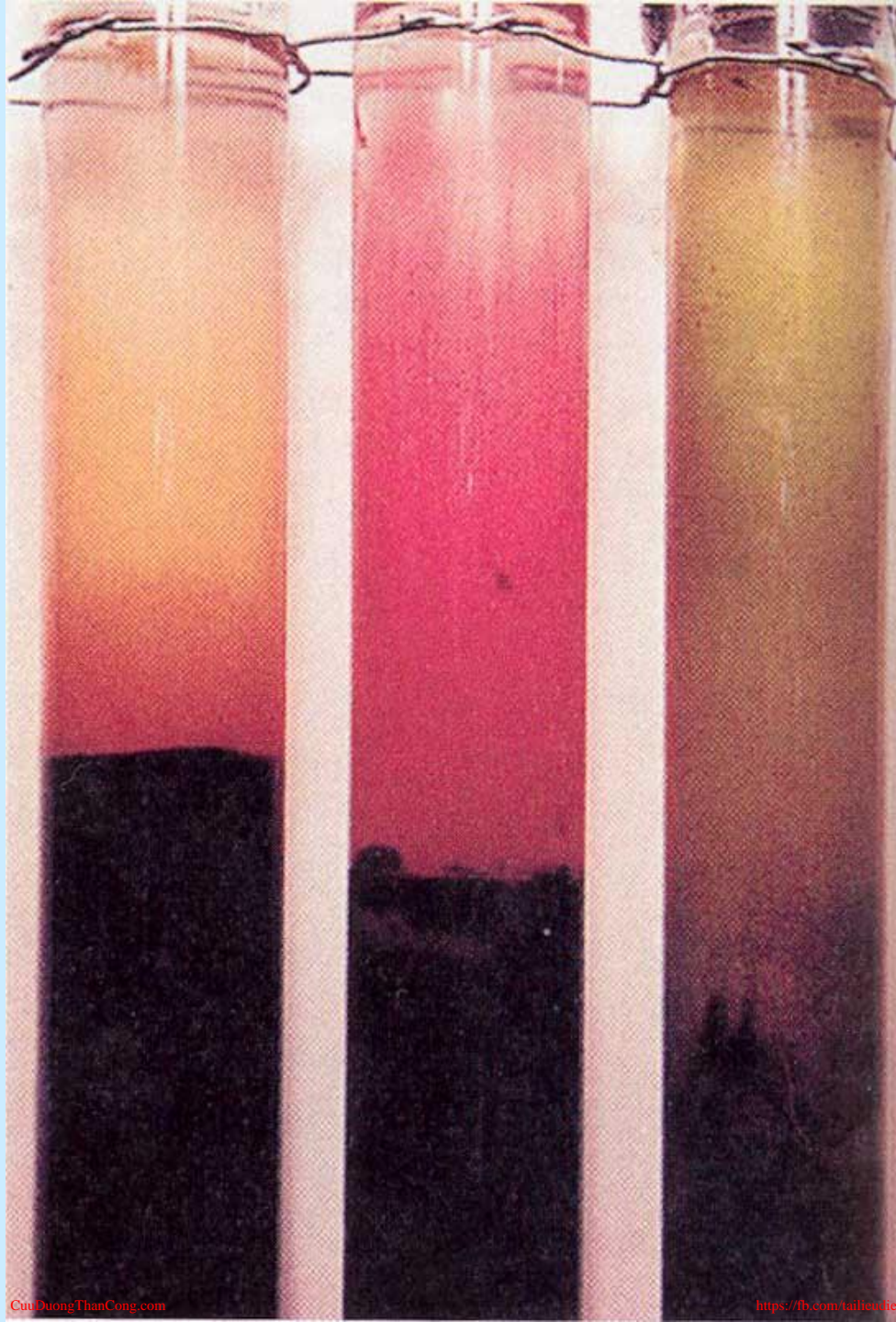
# Nuôi tích lũy bằng cột Winogradski

## - Cột Winogradski:

- + Bùn, nước ao hồ có bổ sung chất hữu cơ quan tâm
- + Thu được nhiều quần thể đa dạng của nhiều quần dưỡng



(a)

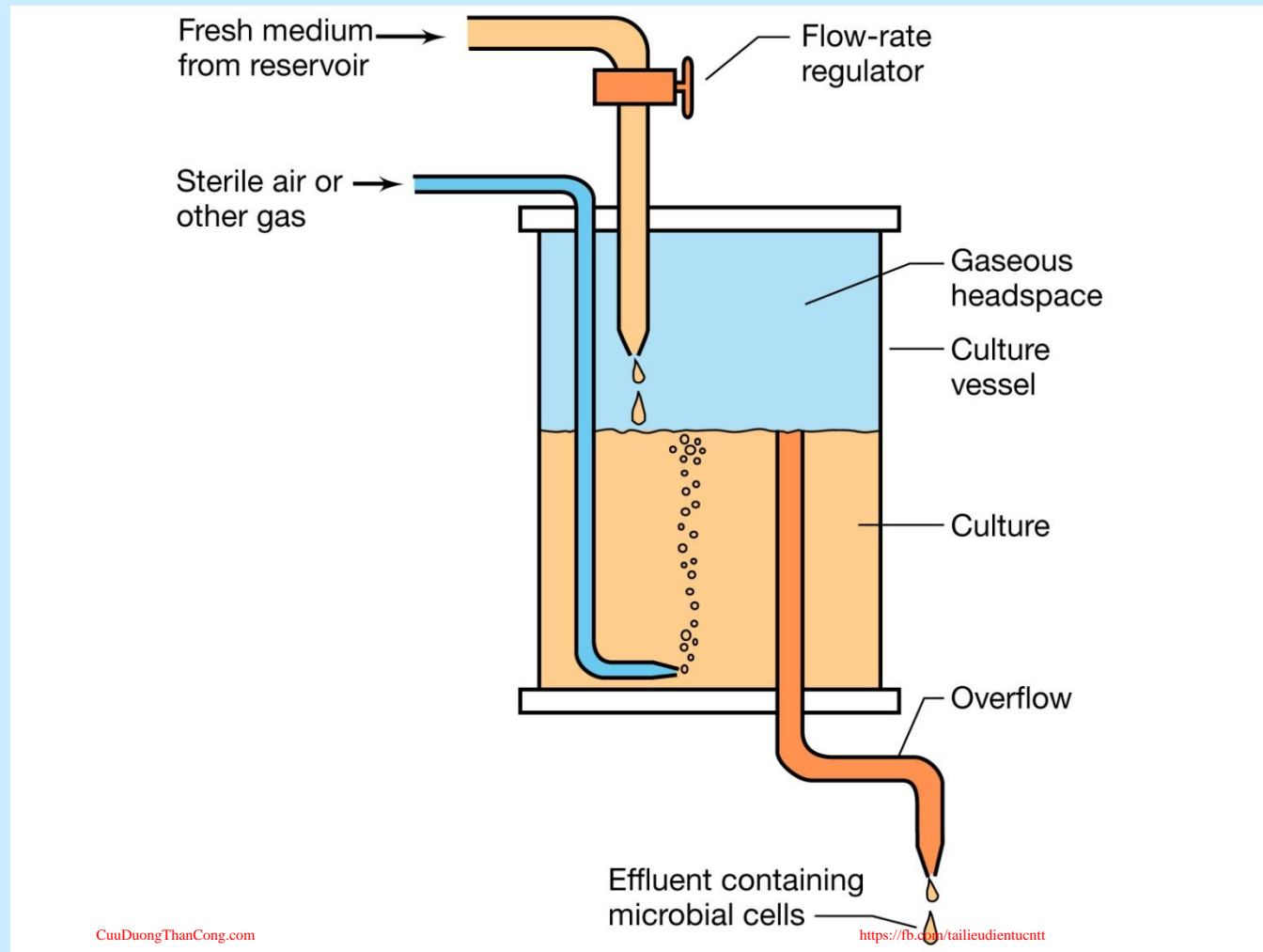




# Nuôi tích lũy bằng hệ ổn hóa

## - Hệ ổn hóa (chemostat):

- + Nuôi cấy liên tục trong môi trường lỏng chứa nguồn carbon quan tâm
- + Làm giàu và phân lập quần thể biến dưỡng đặc chất



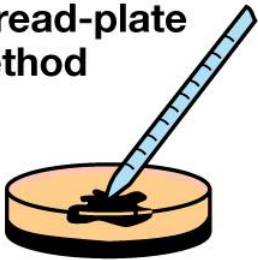




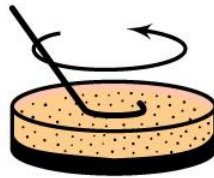
# Phân lập và làm thuần

- + **Hộp ria (streak plate):** phân lập các chủng hiếu khí hoặc kỵ khí không nghiêm ngặt
- + **Pha loãng tới hạn (extincting dilution):** phân lập các chủng hiếu khí
- + **Pha loãng trong ống thạch mềm (agar shake tube method):** phân lập các chủng kỵ khí
- **Các phương pháp pha loãng có thể được dùng để xác định quần thể chiếm ưu thế trong mẫu**

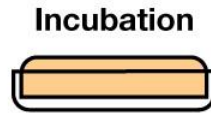
## Spread-plate method



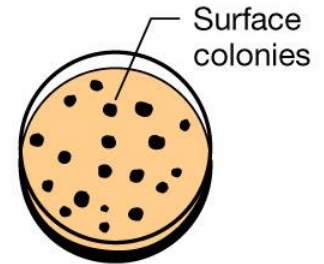
Sample is pipetted onto surface of agar plate (0.1 ml or less)



Sample is spread evenly over surface of agar using sterile glass spreader

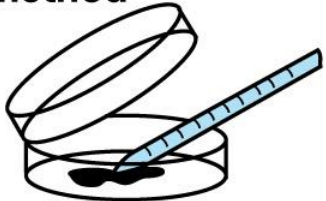


Incubation



Typical spread-plate results

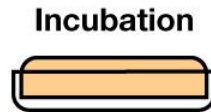
## Pour-plate method



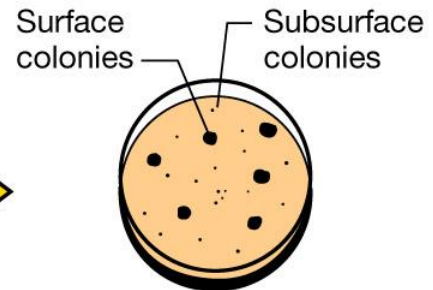
Sample is pipetted into sterile plate



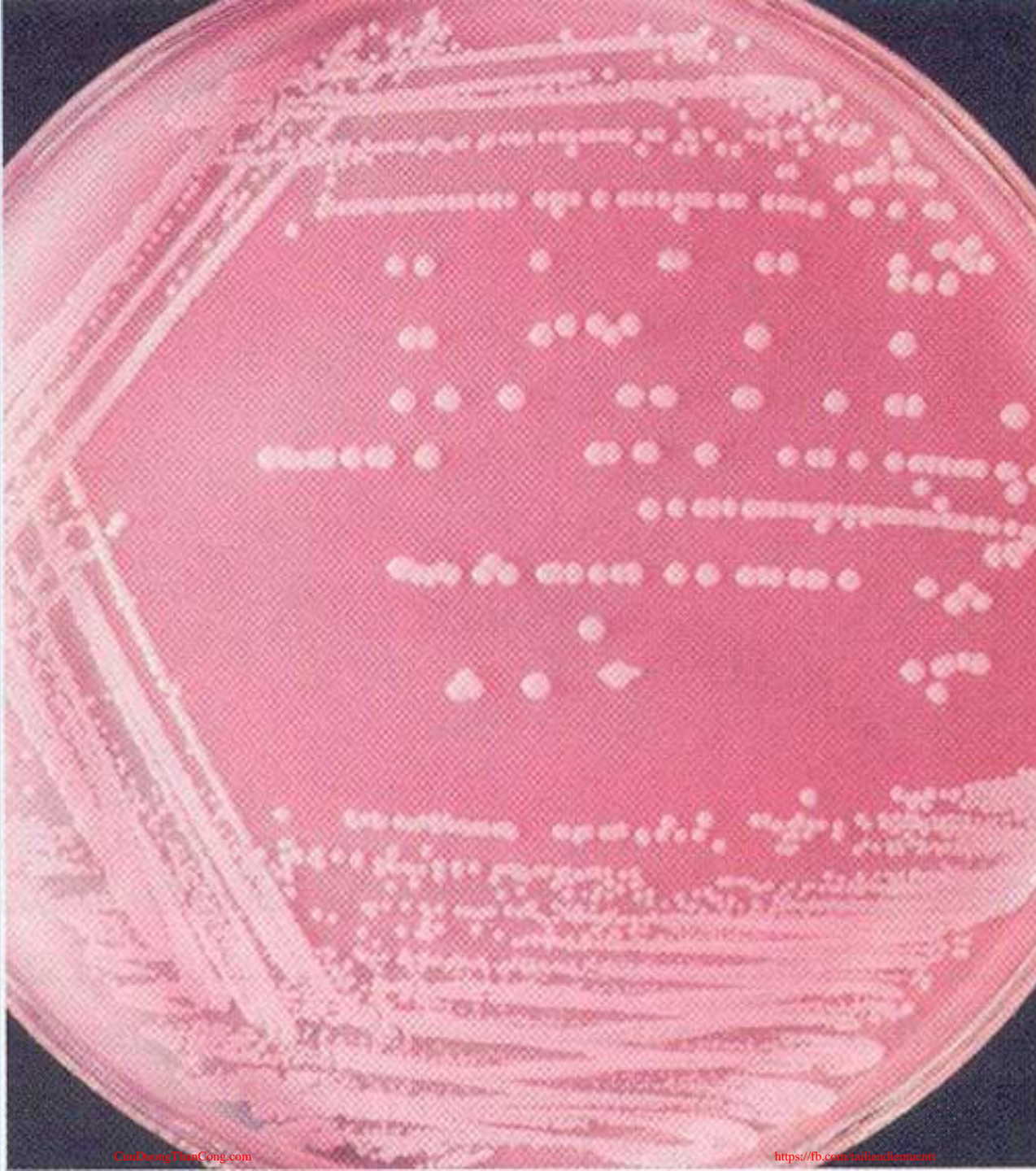
Sterile medium is added and mixed well with inoculum

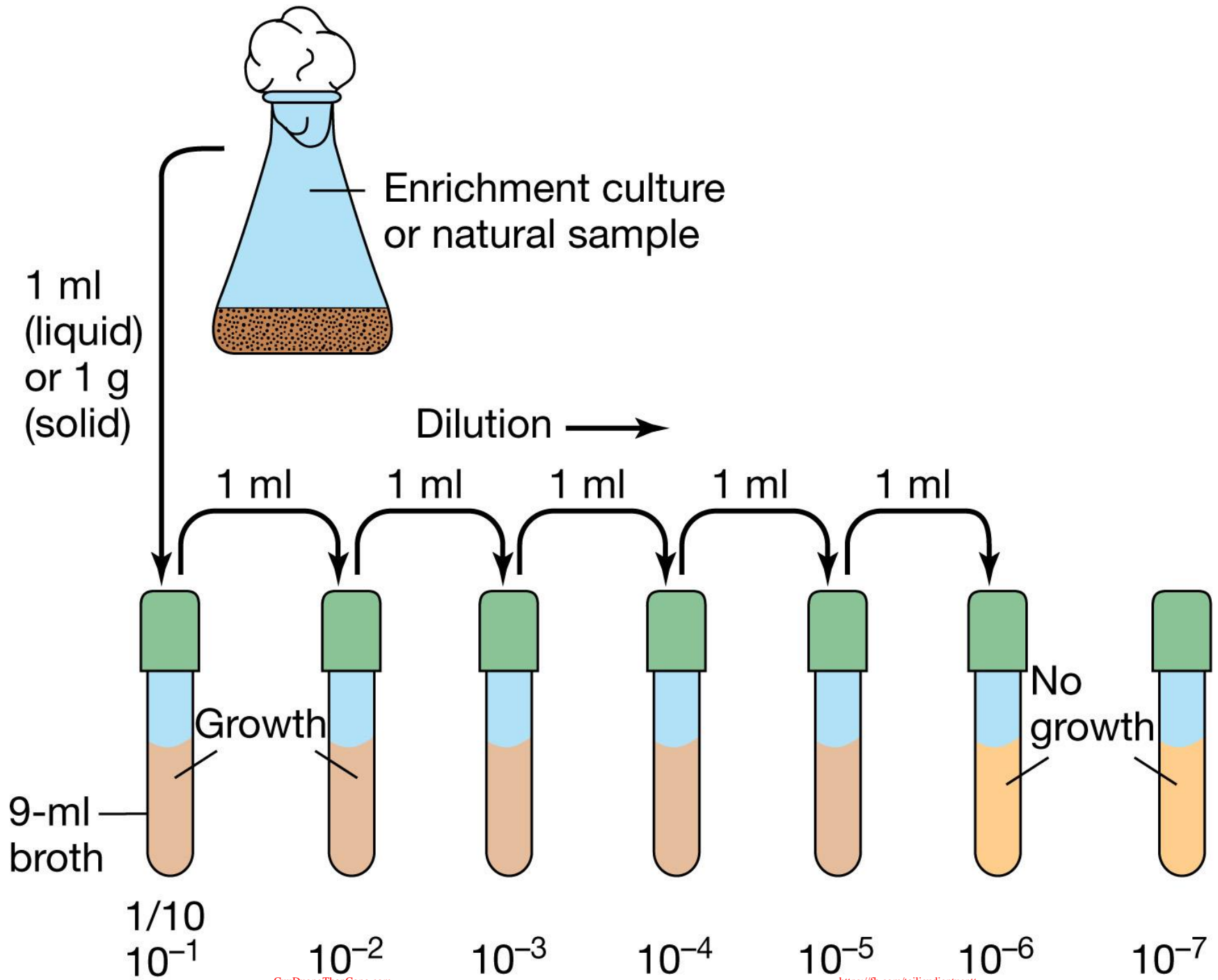


Incubation

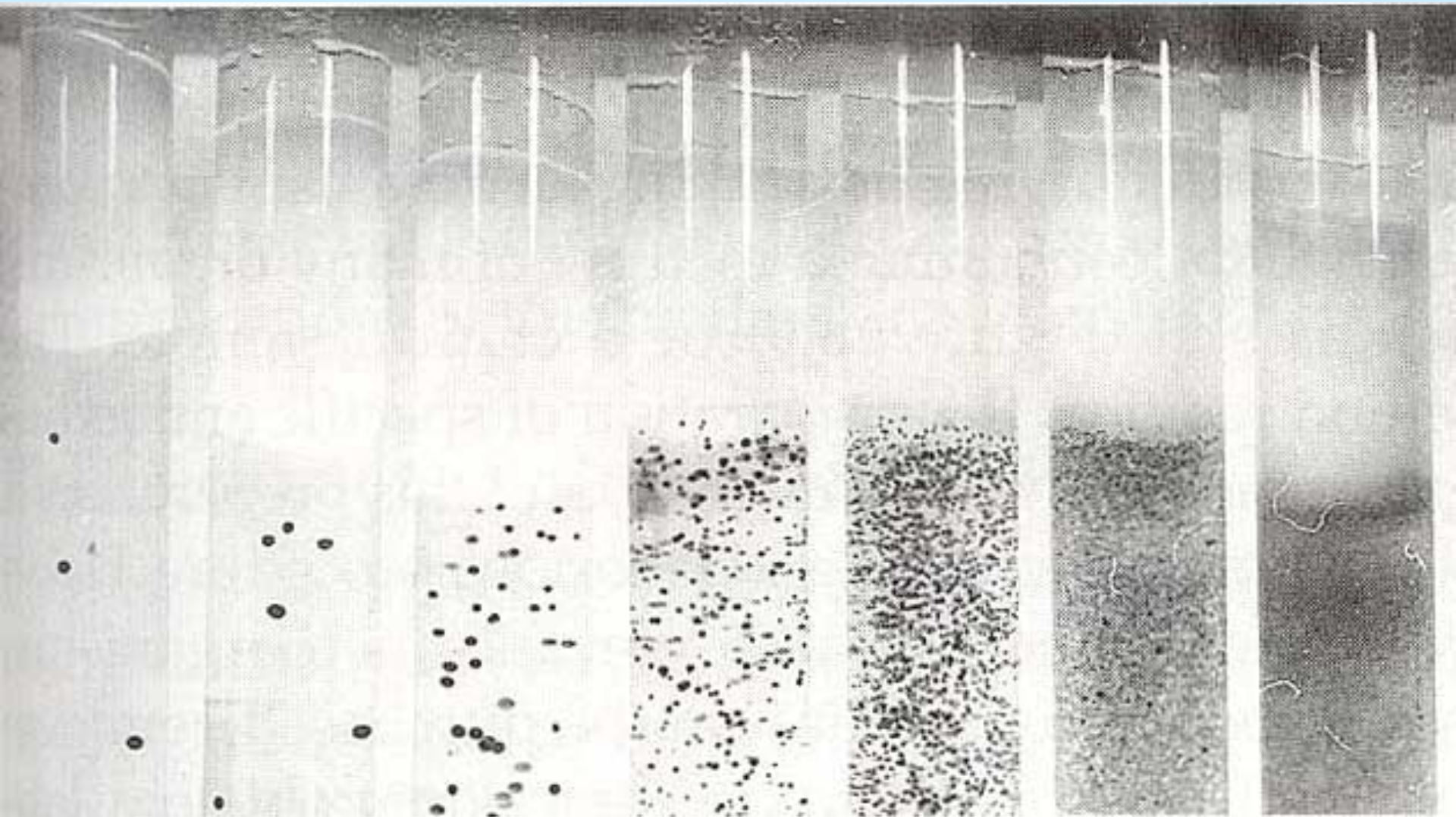


Typical pour-plate results







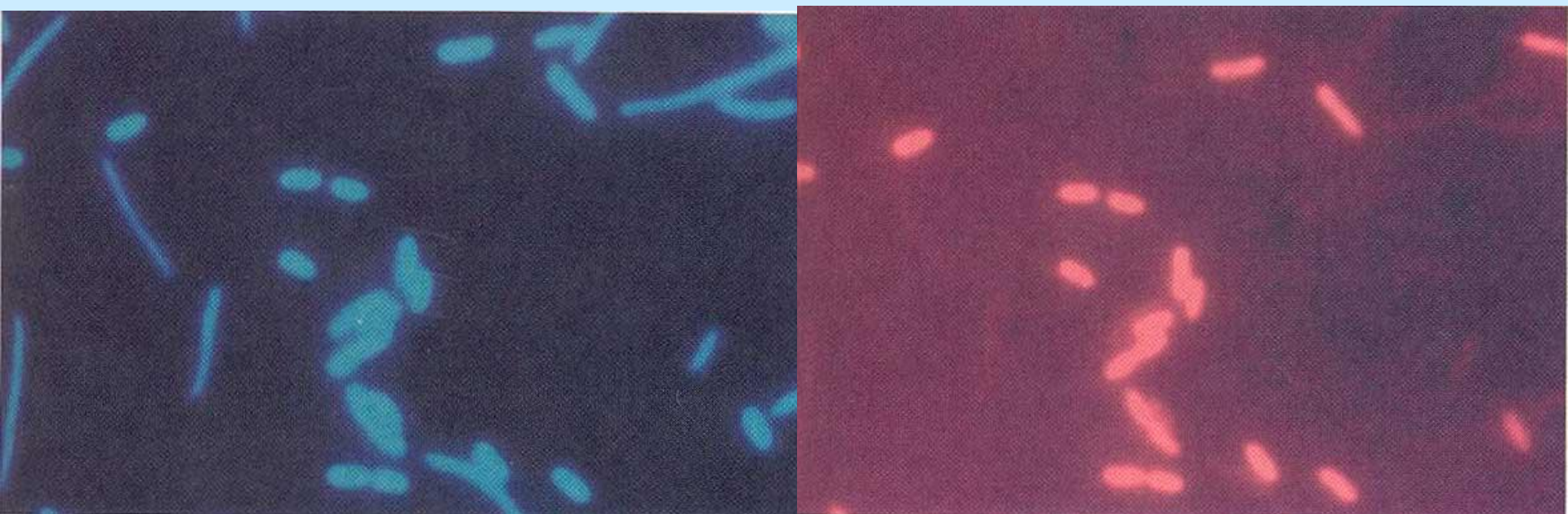


# **Định danh chủng thuần**

- Phương pháp sinh hóa, miễn dịch
- Phương pháp giải trình tự SSU-rRNA (small subunit ribosomal RNA)
- Phương pháp lai phân tử với mẫu dò chuyên biệt
- Phương pháp lai với mẫu dò phát sinh loài (phylogenetic probe)
- Phương pháp FISH (fluorescent in situ hybridization)

# Kỹ thuật FISH

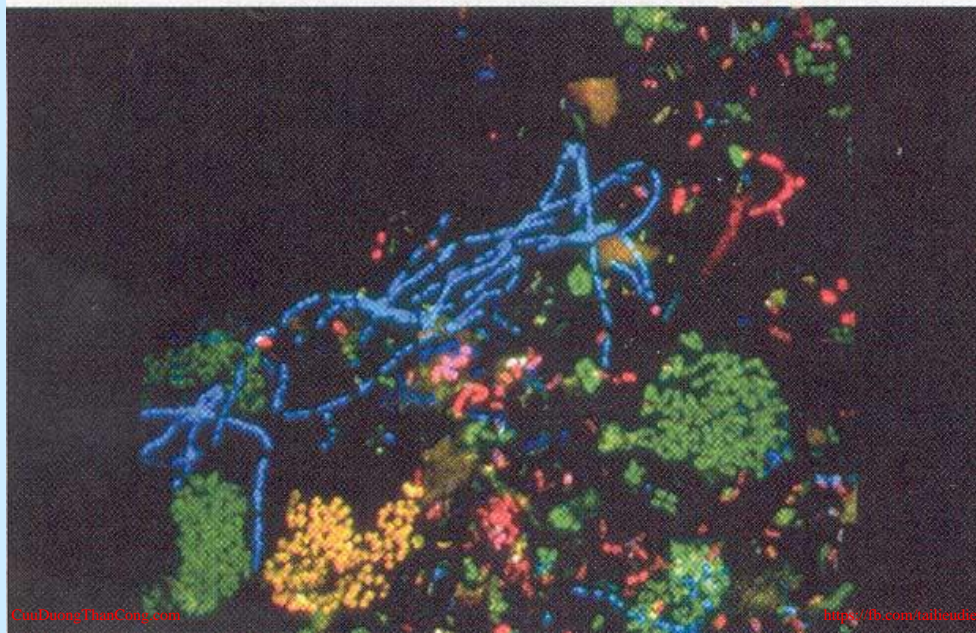
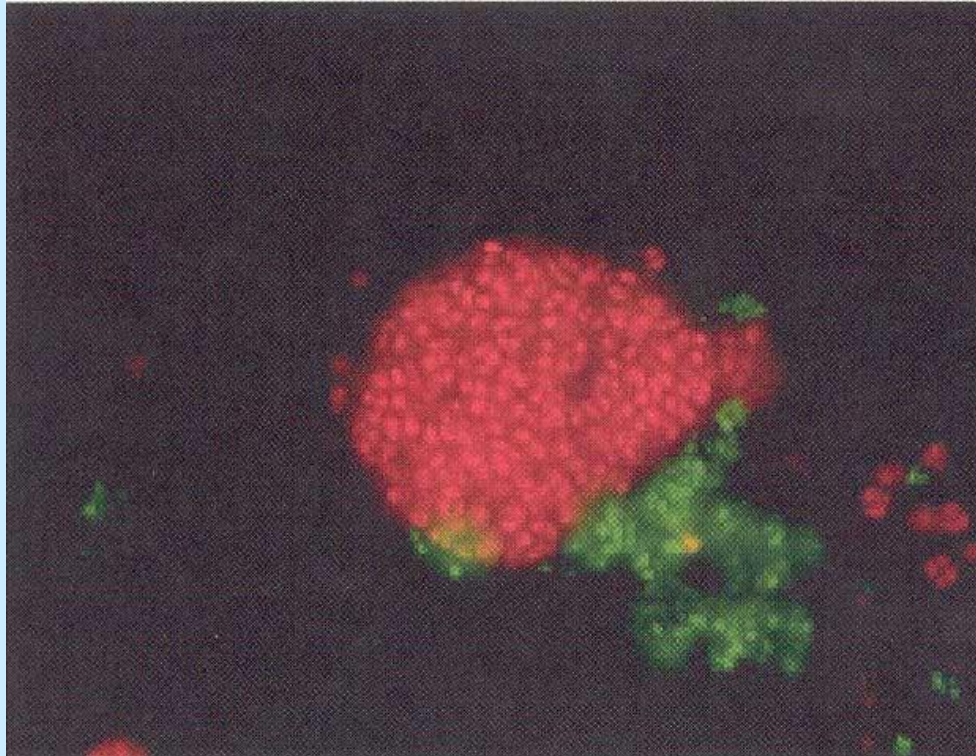
- Kỹ thuật FISH: lai phân tử trên mẫu tự nhiên bằng mẫu dò được đánh dấu huỳnh quang
- Mẫu dò:
  - + Mẫu dò phát sinh loài: các trình tự nhận diện vi sinh vật ở các mức phân loại khác nhau
  - + Mẫu dò chuyên biệt đối với một gen mục tiêu
- Sử dụng đồng thời nhiều mẫu dò phát sinh loài được đánh dấu huỳnh quang khác nhau.



# Ứng dụng của FISH trong nghiên cứu sinh thái học vi sinh vật

- Phân lập vi sinh vật
- Định tính và định lượng vi sinh vật
- Nghiên cứu thành phần và tương tác của vi sinh vật:
  - + Sử dụng đồng thời nhiều mẫu dò phát sinh loài được đánh dấu huỳnh quang khác nhau: quan sát và đặc trưng hóa thành phần của vi sinh vật
  - + Kết hợp FISH với confocal laser microscope: quan sát và đặc trưng hóa thành phần, sự tương tác của các nhóm vi sinh vật khác nhau trong mẫu tự nhiên
  - + Đối với các vi sinh vật chưa thể nuôi cấy: mô tả hình thái, mật độ và tương tác với các sinh vật khác
- Nghiên cứu hoạt tính của vi sinh vật: kỹ thuật ISRT

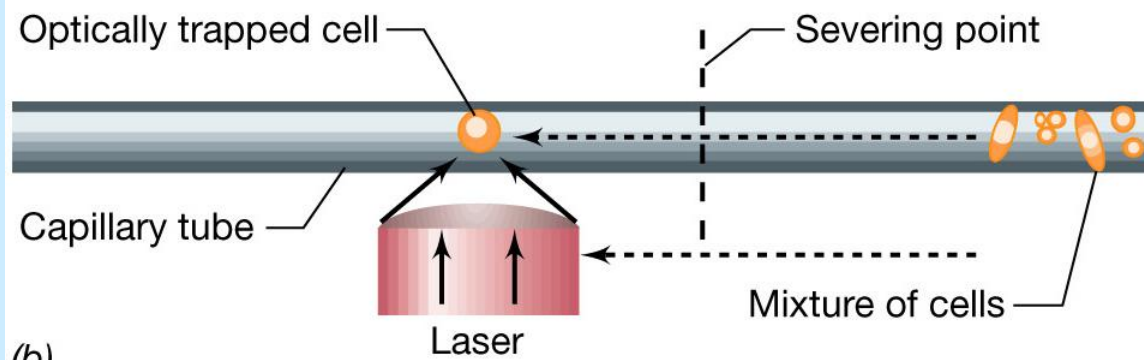
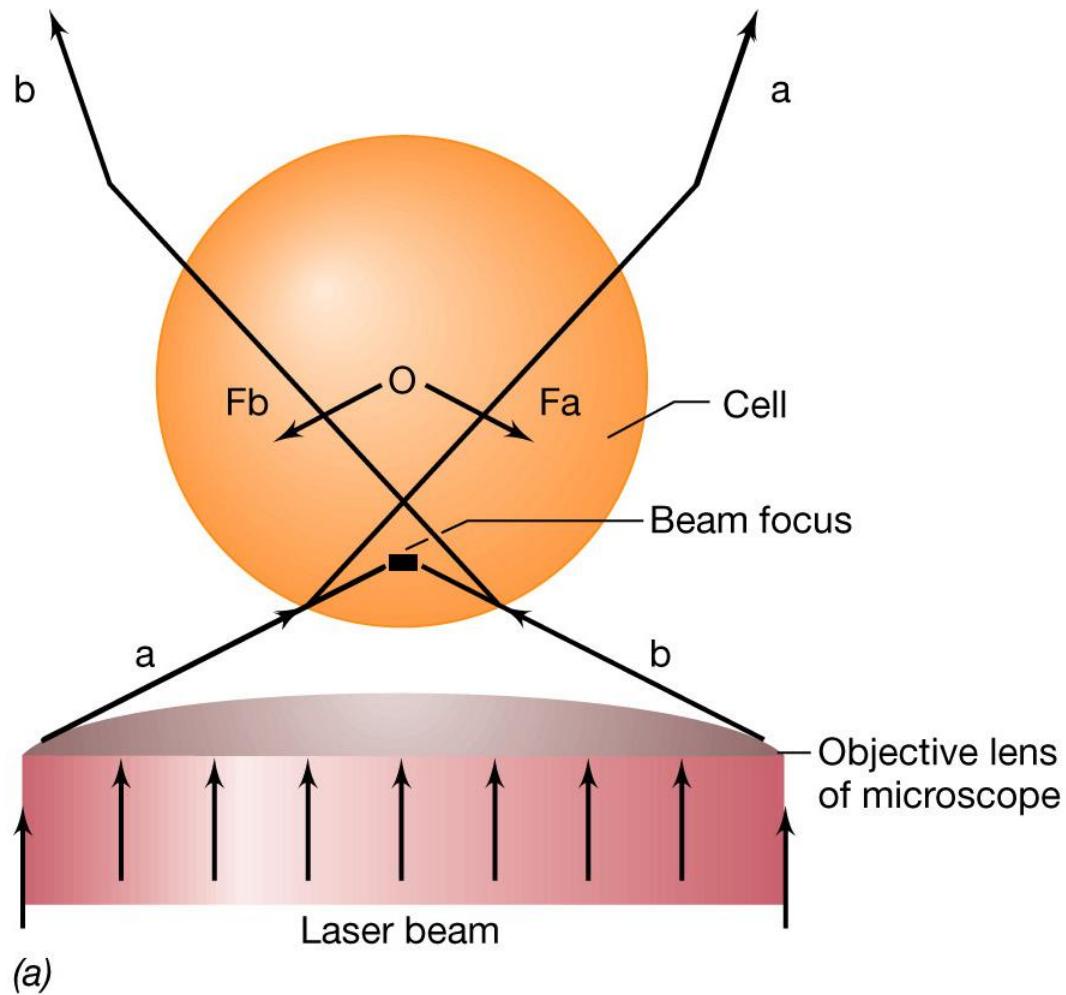




# **Phân lập bằng kỹ thuật Nhíp quang học**

- Nhíp quang học (Optical tweezer):
  - + Kính hiển vi đảo được trang bị một nguồn laser hồng ngoại mạnh và bộ vi thao tác chứa ống mao quản
- Phân lập bằng nhíp quang học:
  - + Tế bào mục tiêu đã được đánh dấu huỳnh quang sẽ được phát hiện, tách khỏi các tế bào khác trong ống mao quản bằng lực của chùm ánh sáng laser
  - + Cắt ống mao quản và thu nhận tế bào mục tiêu
- Ứng dụng:
  - + Phân lập các chủng vi sinh vật có tốc độ tăng trưởng chậm
  - + Phân lập các vi sinh vật thiểu số trong quần xã
  - + Ứng dụng khác: phân lập, tách nhóm các phân tử mục tiêu, định vị trứng và tinh trùng trong thụ tinh in vitro...

- FACS: fluorescence-assisted cell sorter
- Metagenome: bộ gen phức, đa bộ gen



# Phát hiện vi sinh vật bằng kỹ thuật Nhuộm nhiễm sắc thể

## - Nhuộm NST (Chromosome painting):

- + Gen, một nhóm các gen, một bộ gen được cắt thành những đoạn mẫu dò 50 - 200bp và đánh dấu huỳnh quang
- + Lai in situ và dùng kỹ thuật kính hiển vi huỳnh quang để phát hiện vi sinh vật mục tiêu

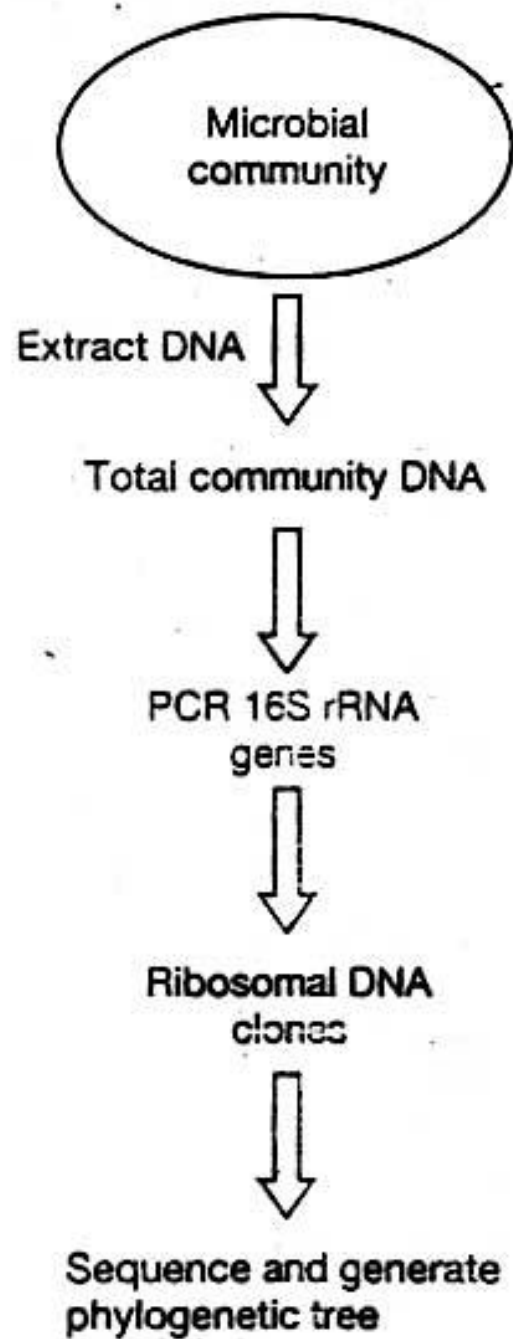
## - Ứng dụng:

- + Tìm sự hiện diện của một nhóm sinh lý (quần dưỡng) trong môi trường (vi sinh vật có mang một gen, một nhóm gen nhất định: nitrogenase, các thành phần của hệ quang...)
- + Định lượng nhóm sinh lý

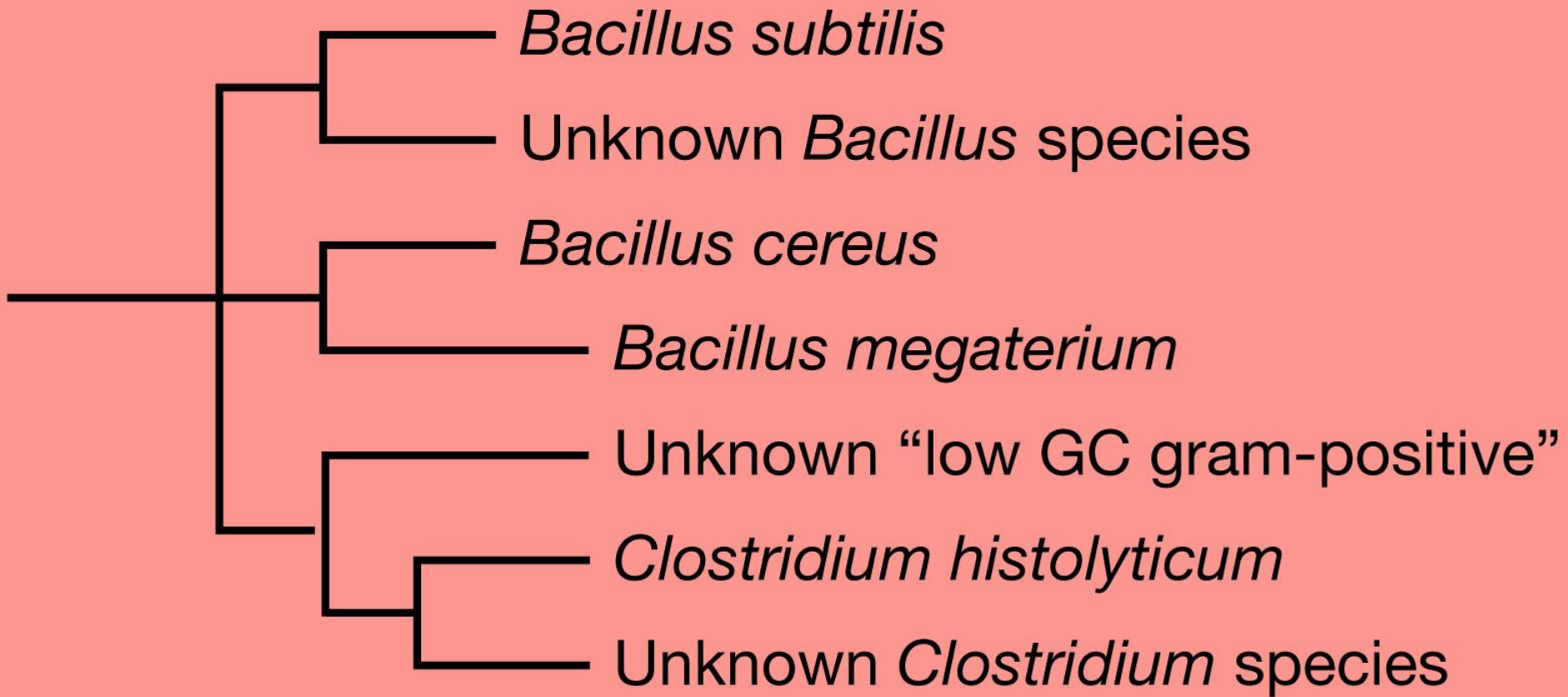
# **Xác định thành phần của quần xã bằng giải trình tự SSU-rRNA**

- Kỹ thuật giải trình tự rRNA được dùng trong sinh thái học vi sinh vật để phân tích thành phần các quần xã vi sinh vật mà không cần phân lập, nuôi cấy chủng vi sinh vật
- Quy trình:
  - + Thu nhận DNA tổng
  - + Dùng các cặp mồi chuyên biệt (Bacteria, Archea, Eukarya, hoặc của các mức phân loại thấp hơn) để khuếch đại SSU-rRNA
  - + Lập ngân hàng các dòng SSU-rRNA
  - + Tuyển chọn các dòng mục tiêu bằng lai in situ với mẫu dò phát sinh loài
  - + Giải trình tự SSU-rRNA
  - + Lập cây phát sinh loài





(a)



(b)

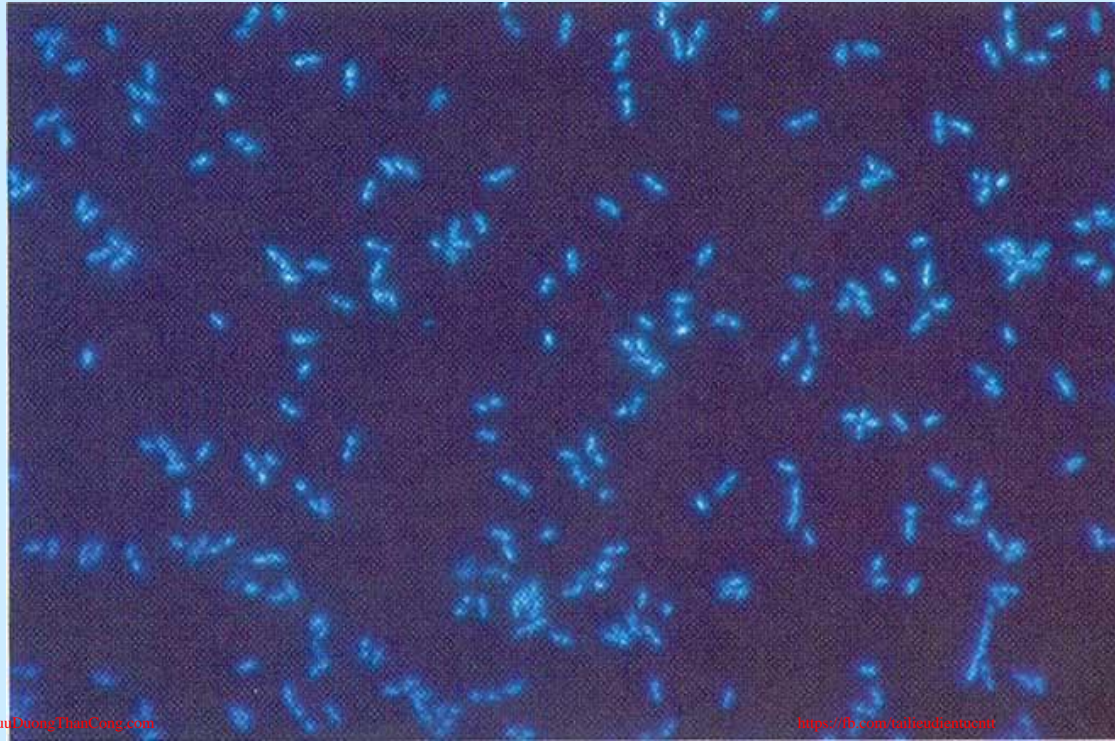


# **Định lượng bằng phương pháp truyền thống**

- **Định lượng một nhóm vi sinh vật chọn lọc**
- **Nuôi cấy trên môi trường chọn lọc và đếm khuẩn lạc**
- **Phương pháp MPN:**
  - + **Pha loãng tối hạn mẫu tự nhiên (pha loãng bậc 10)**
  - + **Lập các dãy ống thử nghiệm có độ lặp lại 3 hoặc 5 ống với 3 hoặc 5 độ pha loãng bậc 10**
  - + **Định tính sự hiện diện của nhóm vi sinh vật mục tiêu dựa trên các tín hiệu dễ quan sát**
  - + **Tra bảng MPN**

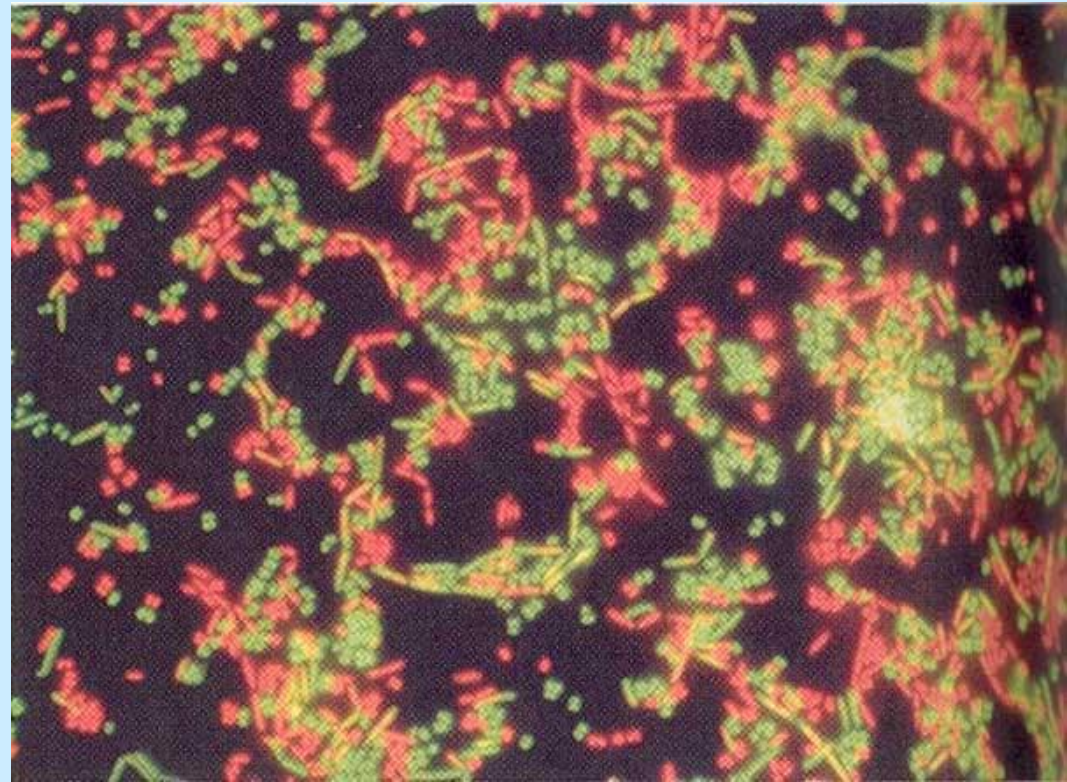
# **Định lượng bằng phương pháp nhuộm huỳnh quang**

- Dùng phẩm nhuộm huỳnh quang và kính hiển vi huỳnh quang
- Tín hiệu nền thấp ở các mẫu tự nhiên
- Định lượng tổng tế bào:
  - + Nhuộm huỳnh quang và đếm dưới kính hiển vi huỳnh quang: acridine orange, DAPI (4',6-diamido-2-phenylindole) nhuộm nucleic acid
  - + Không phân biệt tế bào sống - chết



# Định lượng tế bào sống bằng nhuộm huỳnh quang

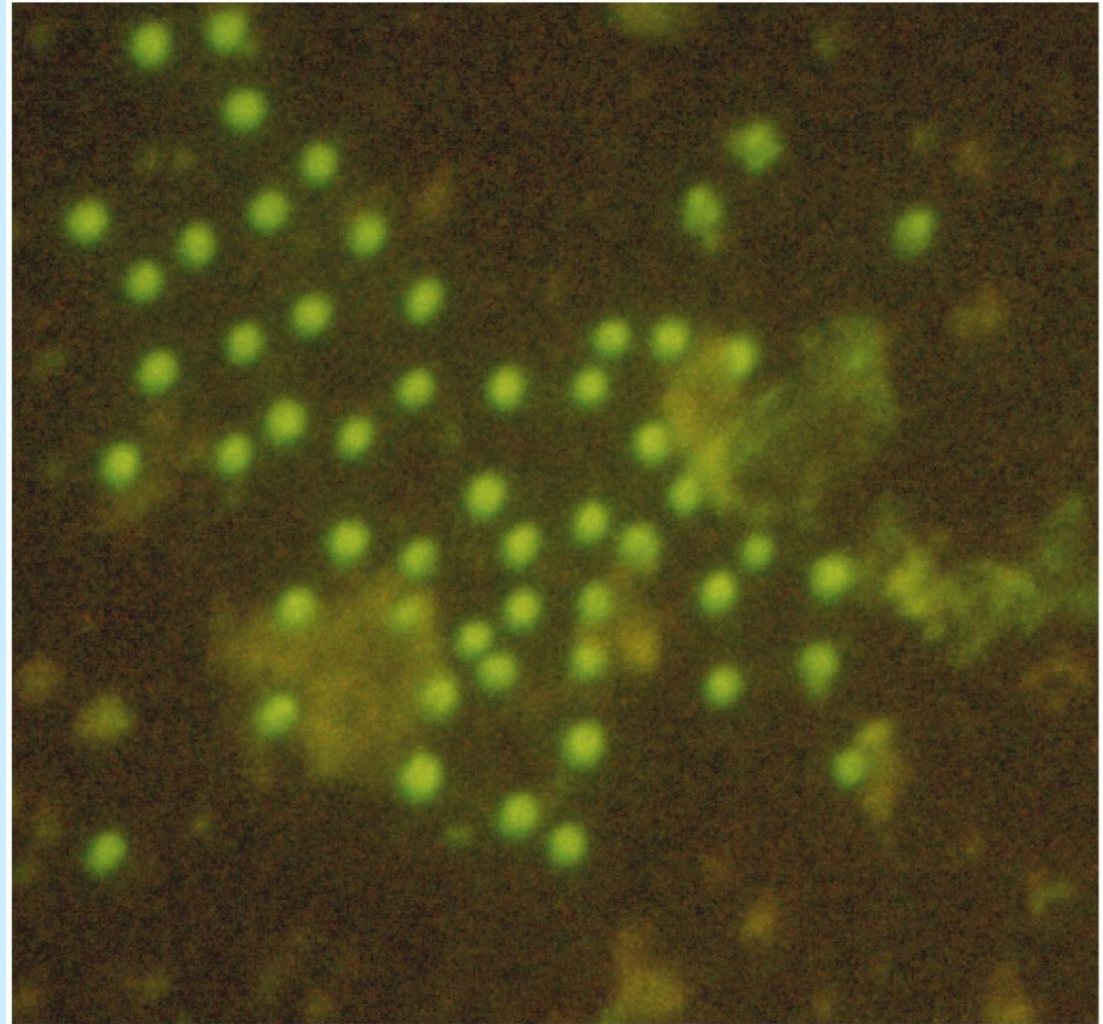
- Định lượng phân biệt tế bào sống/chết:
  - + Nhuộm tổng tế bào bằng phẩm phát huỳnh quang và tế bào chết bằng propidium iodide
  - + Cho tín hiệu nền cao trên mẫu tự nhiên
- Định lượng bằng kháng thể phát huỳnh quang:
  - + Dùng kháng thể được đánh dấu huỳnh quang
  - + Phát hiện vi sinh vật mục tiêu, tính chuyên biệt cao
- Định lượng bằng kỹ thuật FISH





# Định lượng bằng kháng thể huỳnh quang

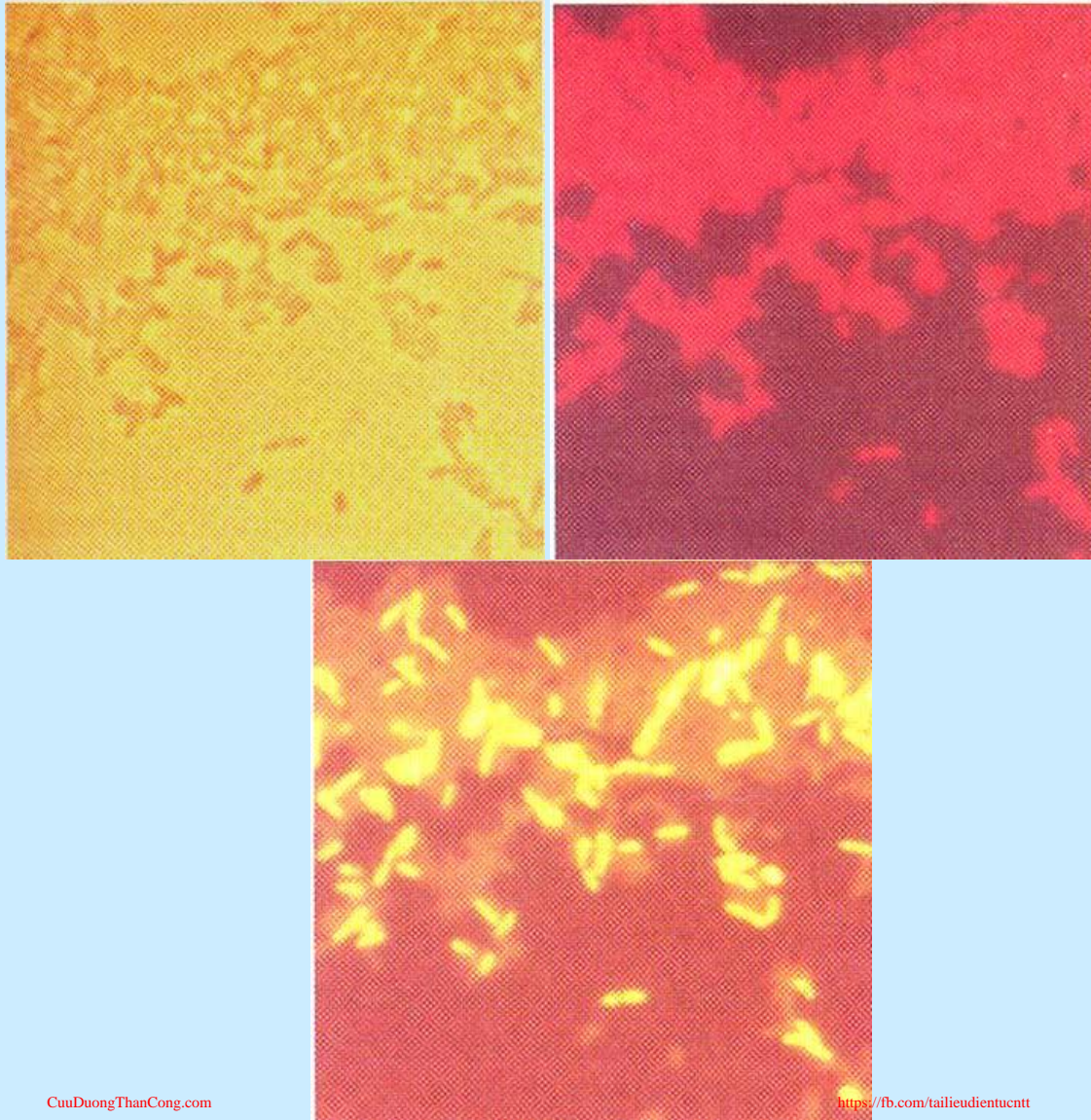
- Định lượng bằng kháng thể phát huỳnh quang:
  - + Dùng kháng thể được đánh dấu huỳnh quang
  - + Phát hiện vi sinh vật mục tiêu, tính chuyên biệt cao
- Định lượng bằng kỹ thuật FISH



T. D. Brock

# Định lượng bằng mẫu dò phát sinh loài huỳnh quang

- Định lượng bằng kỹ thuật FISH



# Phương pháp nghiên cứu hoạt tính vi sinh vật trong tự nhiên

# Các phương pháp truyền thống

- Thông thường là các phương pháp ex situ: mẫu được thu, bảo quản và xác định hoạt tính tại phòng thí nghiệm
- Đo hoạt tính tổng của vi sinh vật dựa trên mức độ tăng trưởng:
  - + Tổng  $O_2$  tiêu thụ, tổng  $CO_2$  phóng thích
  - + Tổng ATP
- Đo tổng hoạt tính các enzyme chủ yếu trong các chuyển hóa vật chất do một hoặc một số quần thể

# Các phương pháp in situ

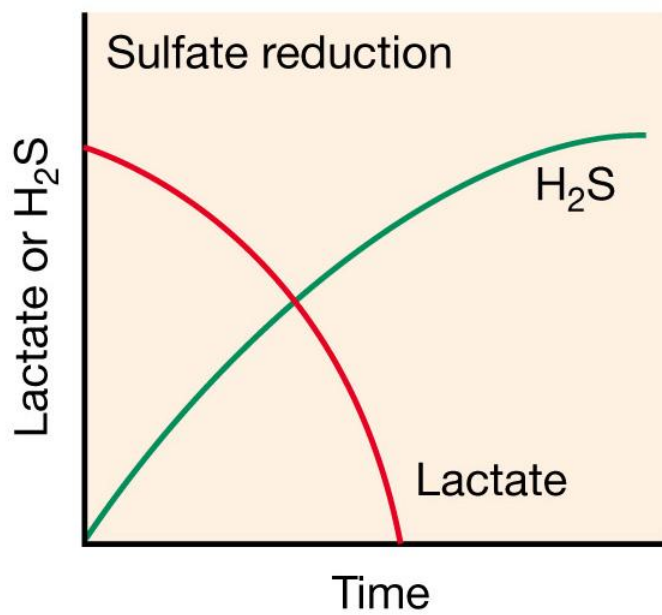
- Phương pháp in situ: đo đạt hoạt tính của vi sinh vật ngay trong môi trường và vi môi trường
- Phương pháp đo in situ tổng hoạt tính dựa trên hô hấp, ATP, đo hoạt tính chuyển hóa
- Phương pháp đồng vị phóng xạ: đo hoạt tính chuyển hóa với độ nhạy cao
- + Hoạt tính riêng (specific activity): tỷ lệ hoạt tính trên cơ chất đồng vị so với hoạt tính tổng
- + Loại bỏ hoạt tính do phản ứng phi sinh vật: đối chứng tế bào chết (killed cell control)
- Phương pháp vi điện cực (microelectrode): theo dõi biến đổi về thành phần hóa học trong vi môi trường
- + Các vi điện cực pH, oxygen,  $N_2O$ ,  $CO_2$ ,  $H_2$ ,  $H_2S$
- + Di chuyển theo các bước  $\leq 1mm$  bằng micromanipulator
- + Dùng để nghiên cứu các chuyển hóa trong các lối sinh khối (micromat)



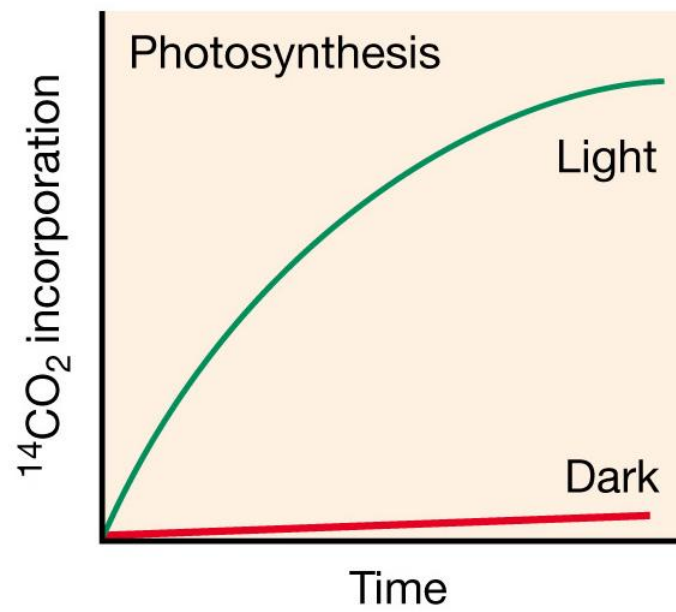
(a)



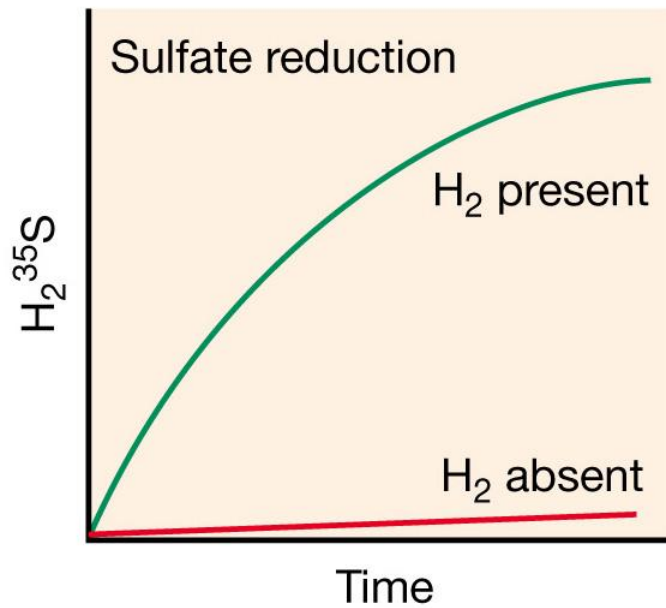
David M. Ward



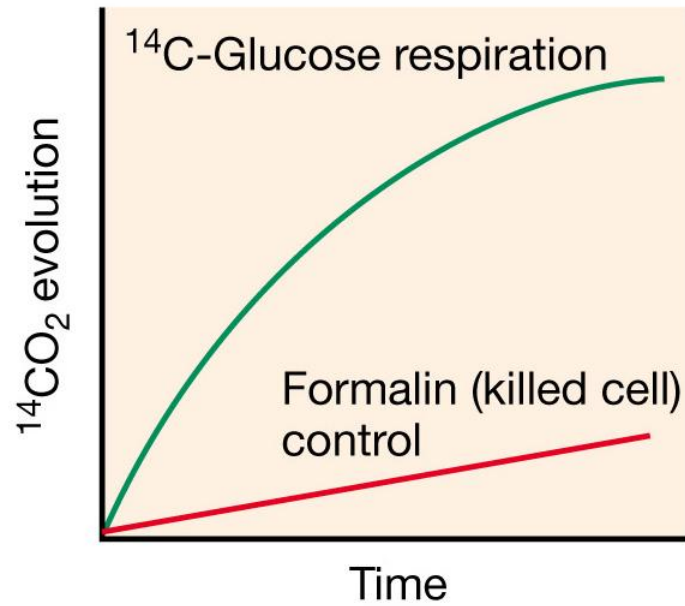
(a)



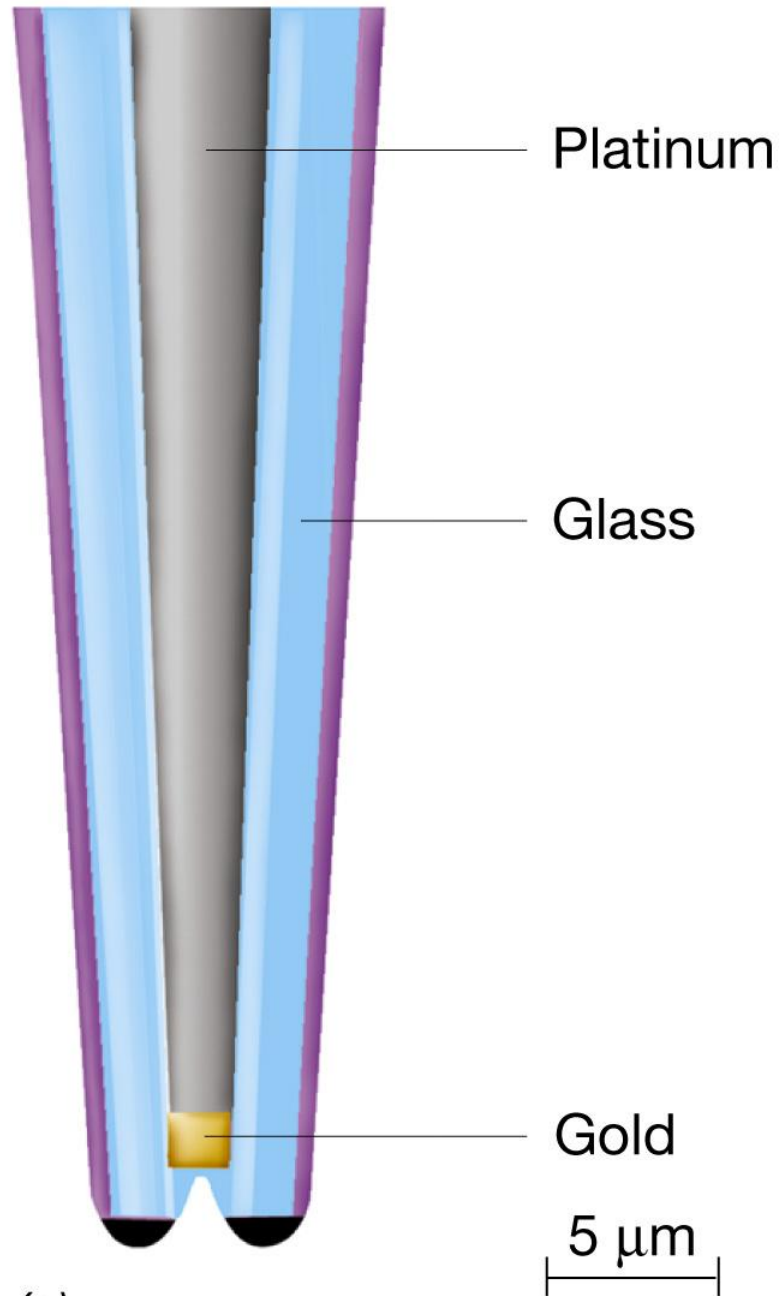
(b)



(c)



(d)



(a)



# Ứng dụng FISH để nghiên cứu hoạt tính của quần dưỡng trong kỹ thuật ISRT

## - ISRT (In situ Reverse transcriptase):

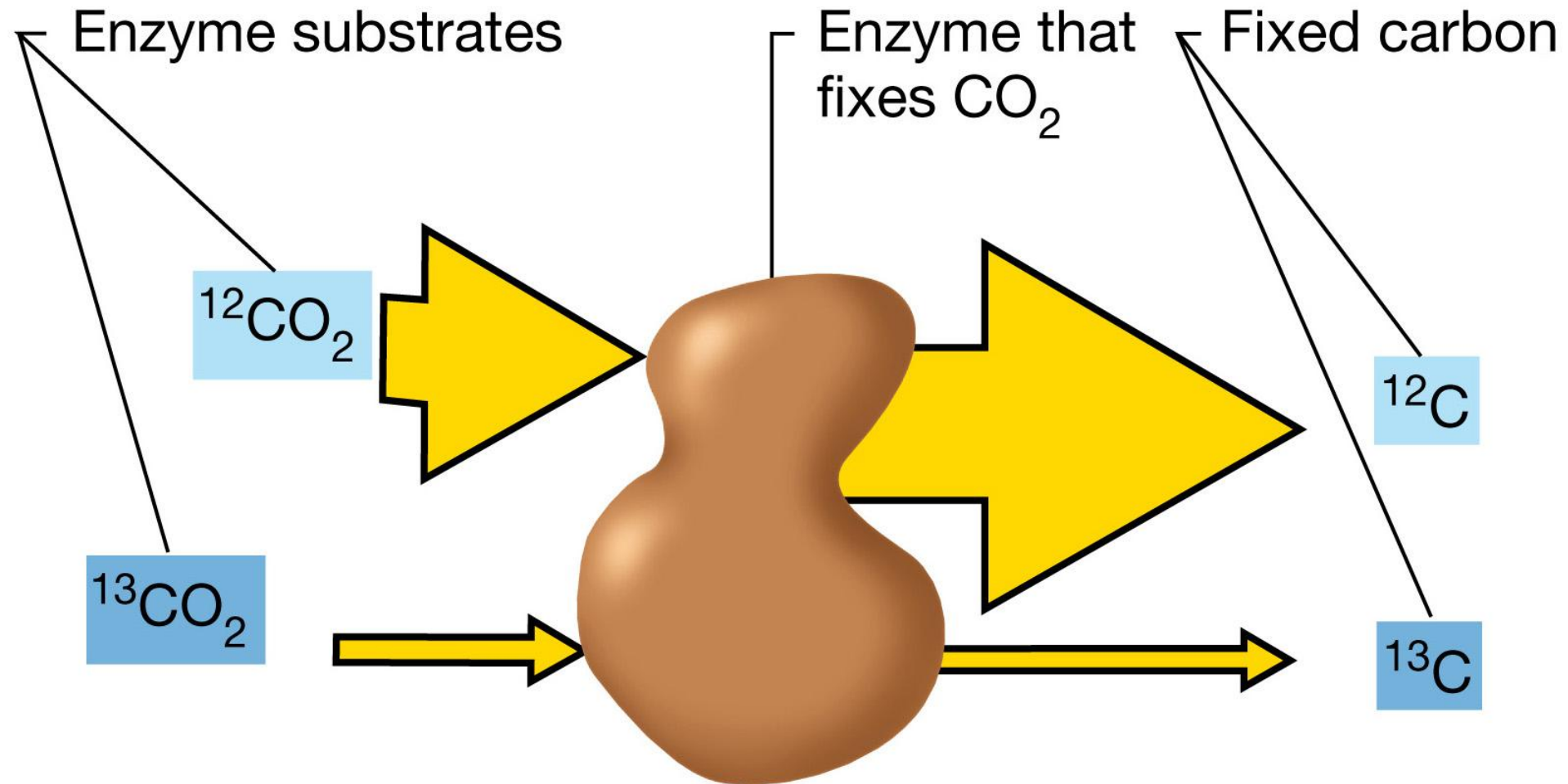
- + Lai in situ mRNA bằng primer chuyên biệt
- + Thực hiện phiên mã ngược tạo cDNA và khuếch đại bằng PCR
- + Lai với mẫu dò đánh dấu huỳnh quang

## - Ứng dụng:

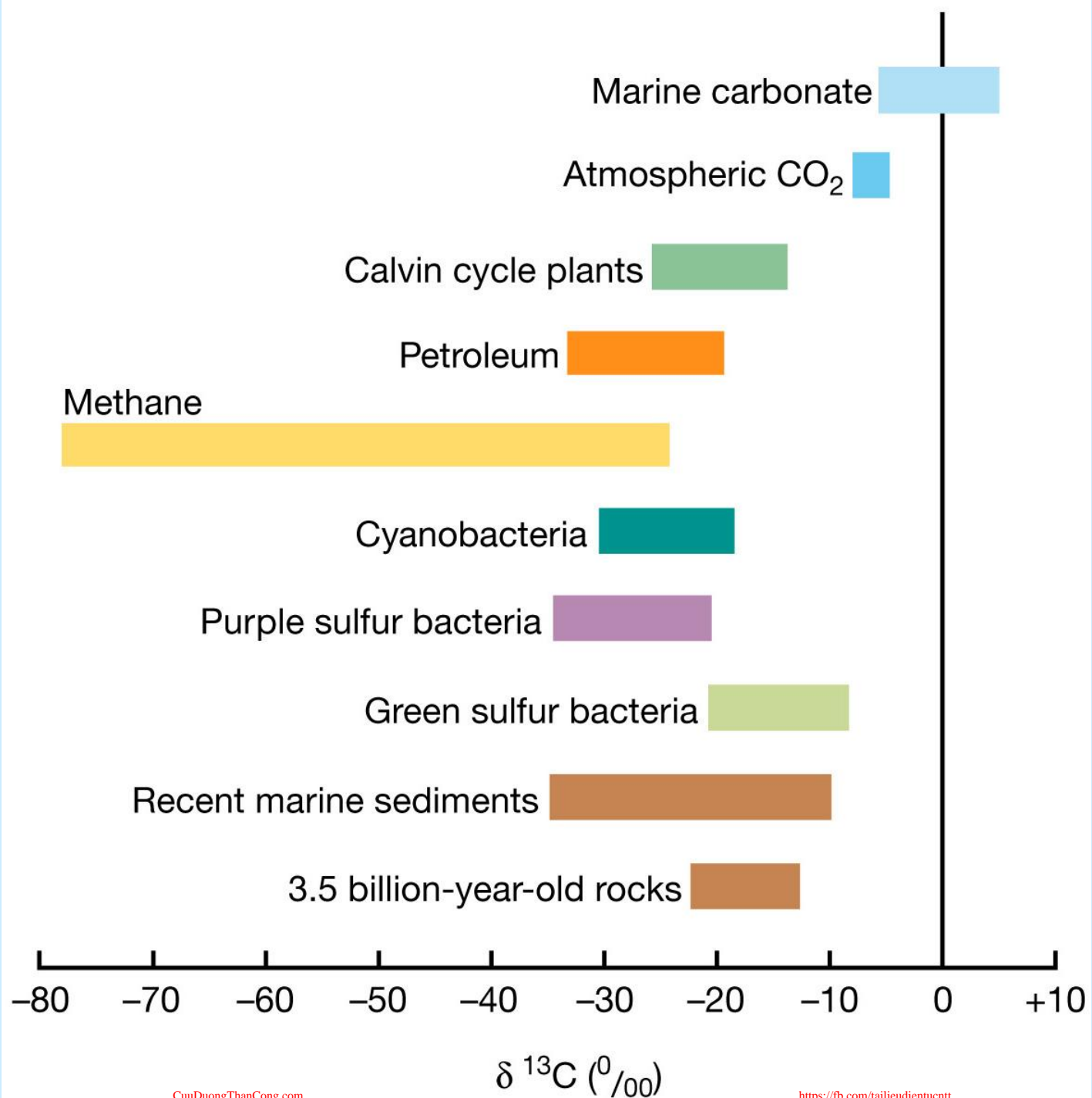
- + Nghiên cứu xác định vi sinh vật có biểu hiện gen trong quần xã ở một thời điểm nhất định
- + Xác định quần thể có hoạt tính trong quần dưỡng và quần xã
- + Nghiên cứu ảnh hưởng của các yếu tố môi trường lên sự biểu hiện của gen trong quần xã

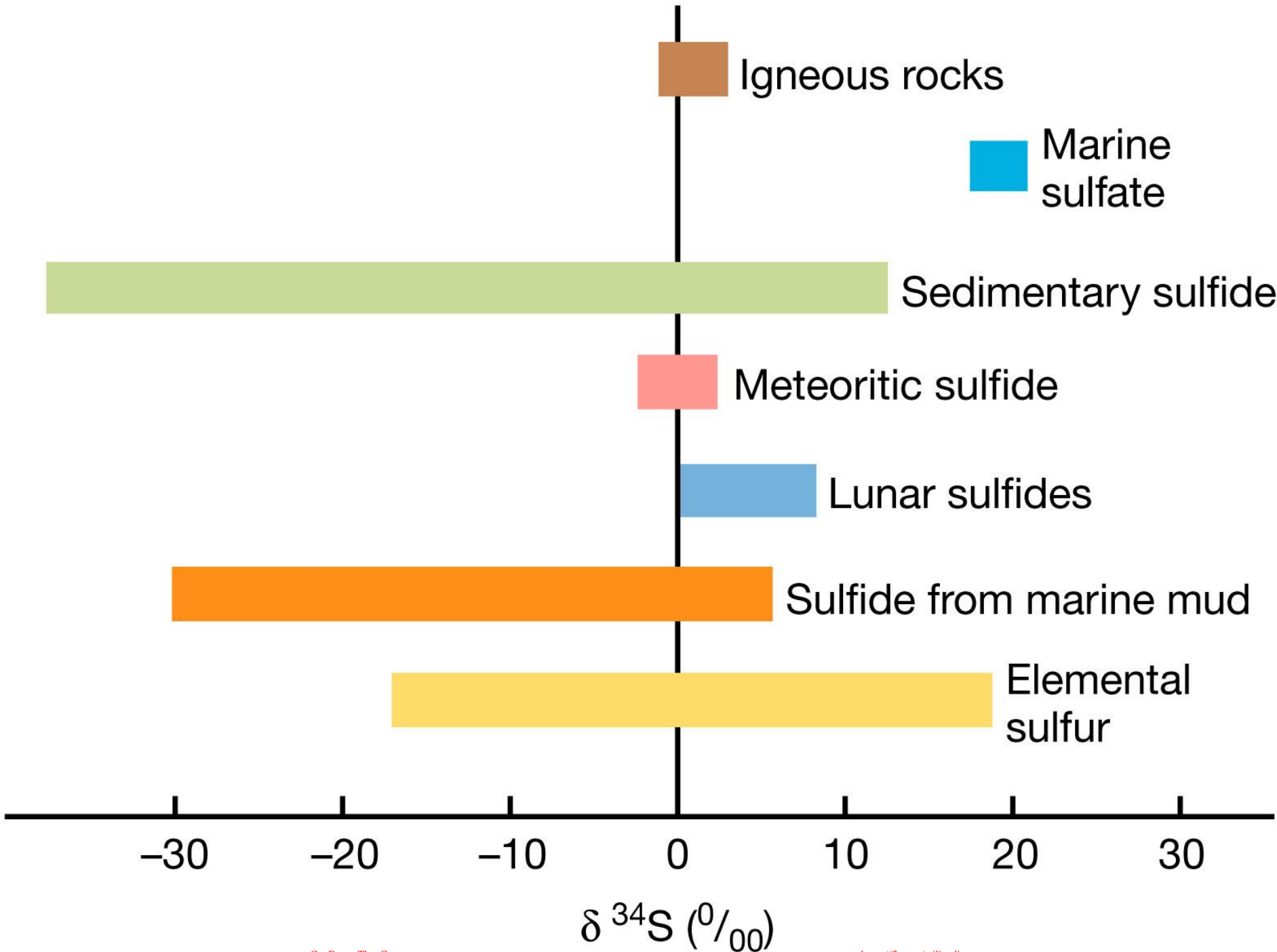
# Định hoạt tính vi sinh vật bằng đồng vị bền

- Đồng vị bền (stable isotope): đồng vị bền mang nhiều neutron hơn dạng bình thường
- Hiệu ứng phân đoạn đồng vị (isotope fractionation): phản ứng sinh hóa có xu hướng dùng đồng vị nhẹ hơn đồng vị nặng, làm giảm tỷ lệ tương đối của đồng vị nặng so với đồng vị nhẹ trong sản phẩm
- Tỷ số đồng vị  $\delta$  (‰): tỷ số đồng vị nặng so với đồng vị nhẹ trong vật chất
- Dạng đồng vị bền dùng trong nghiên cứu sinh thái học vi sinh vật:  $^{13}\text{C}$ ,  $^{34}\text{S}$ ,  $^{18}\text{O}$
- Ứng dụng:
  - + Xác định thời điểm xuất hiện sự sống dựa vào tỷ số đồng vị C trong đá cổ
  - + Xác định thời điểm môi trường trái đất từ trạng thái khử sang trạng thái ôxi hóa









# Hoạt động và vai trò của vi sinh vật trong các hệ sinh thái

# **Vi sinh vật trong các môi trường trên cạn**

- Vi sinh vật tăng trưởng chủ yếu trên bề mặt các hạt đất
- Độ đa dạng cao vì tồn tại nhiều vi môi trường khác nhau
- Các phương pháp nghiên cứu:
  - + Tìm sự hiện diện của vi sinh vật: nhuộm bằng cam acridine, DAPI, quan sát bằng kính hiển vi huỳnh quang
  - + Tìm một vi sinh vật mục tiêu: dùng kỹ thuật miễn dịch huỳnh quang hoặc FISH
  - + Quan sát trạng thái hiện diện trên bề mặt giá thể: kính hiển vi điện tử quét SEM
  - + Các phương pháp xác định hoạt tính của vi sinh vật

Micro-  
colony

Quartz

Air

Organic  
matter

Quartz

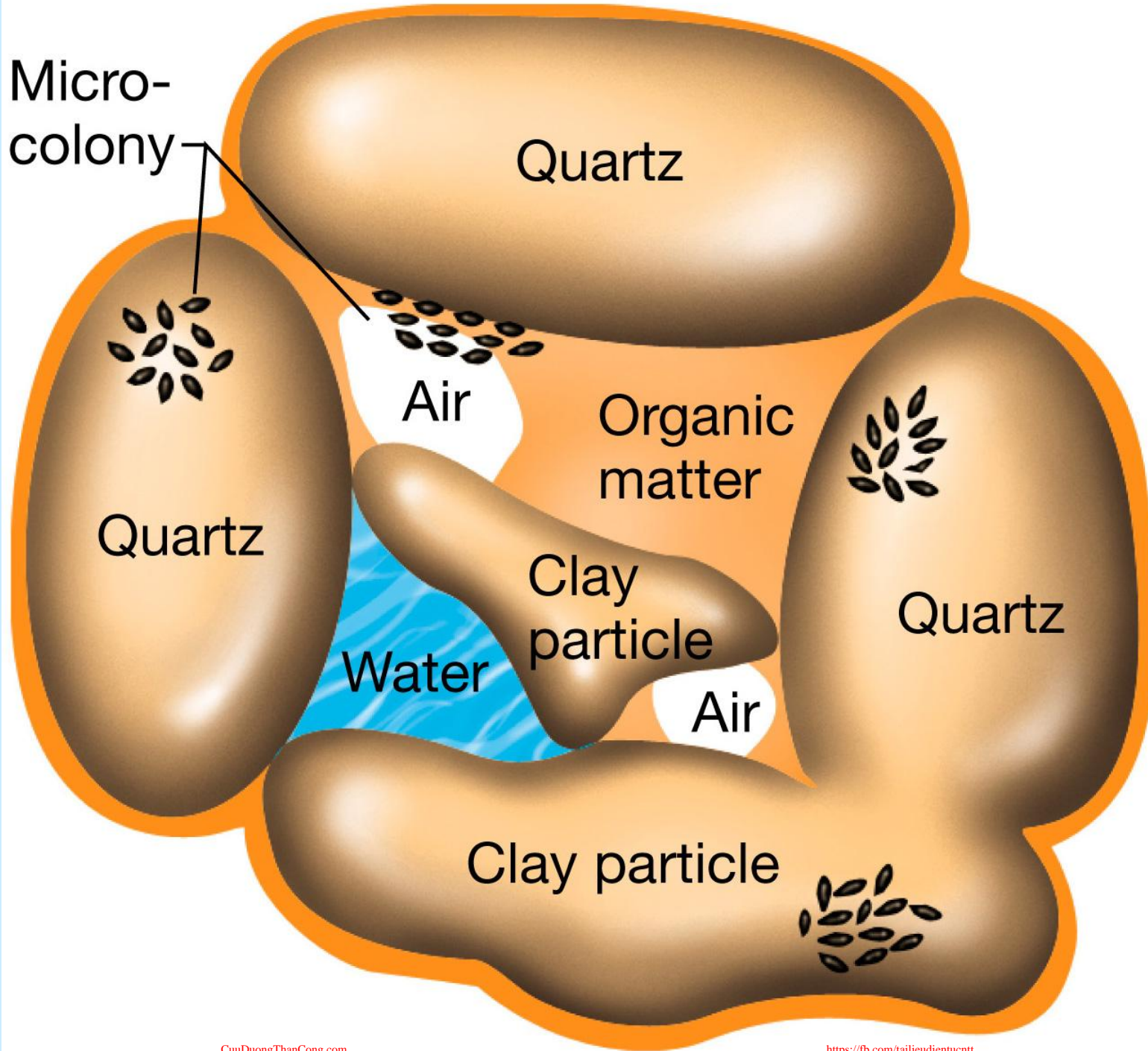
Water

Clay  
particle

Air

Quartz

Clay particle



# **Yếu tố ảnh hưởng đến hoạt tính vi sinh vật trong môi trường đất**

- **Độ ẩm:** ảnh hưởng mạnh đến hoạt tính vi sinh vật
  - + Thay đổi với phạm vi rộng trong môi trường đất
  - + Ảnh hưởng đến ôxi trong đất: đất ráo nước có nồng độ ôxi khuếch tán cao, đất nhiều nước thường làm môi trường kỵ khí
- **Chất dinh dưỡng:** ảnh hưởng mạnh đến mật độ và hoạt tính vi sinh vật
  - + Chất dinh dưỡng hữu cơ tập trung ở bề mặt các hạt đất và vùng quanh rễ cây
  - + Chất dinh dưỡng giới hạn thường là các chất dinh dưỡng vô cơ, đặc biệt là P, N



# Vi sinh vật ở các tầng sâu

- Mẫu đất ở độ sâu đến 300m có sự đa dạng cao của các vi sinh vật kỵ khí, kỵ khí tùy ý và hiếu khí:
  - + Chất dinh dưỡng từ nước ngầm thấm qua
  - + Hoạt tính biến dưỡng thấp hơn rất nhiều so với vi sinh vật trên mặt đất
- Mẫu đất ở độ sâu 1.500m có sự đa dạng của vi khuẩn kỵ khí:
  - + Chứng minh có hoạt động của các dạng hóa năng vô cơ (khử sulfate, sinh methane, sinh acetate đồng hình) bằng phân tích tỷ số đồng vị trong  $\text{CH}_4$
  - + Chất cho điện tử là  $\text{H}_2$ , chất nhận điện tử là  $\text{CO}_2$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$
  - + Nguồn tạo chất cho điện tử phản ứng hóa học giữa  $\text{H}_2\text{O}$  và  $\text{FeO}$
- Ý nghĩa:
  - + Vô cơ hóa hợp chất hữu cơ tạo thành phần hóa học của nước ngầm +
  - + In situ bioremediation các chất ô nhiễm

# **Vi sinh vật trong hệ sinh thái ao hồ**

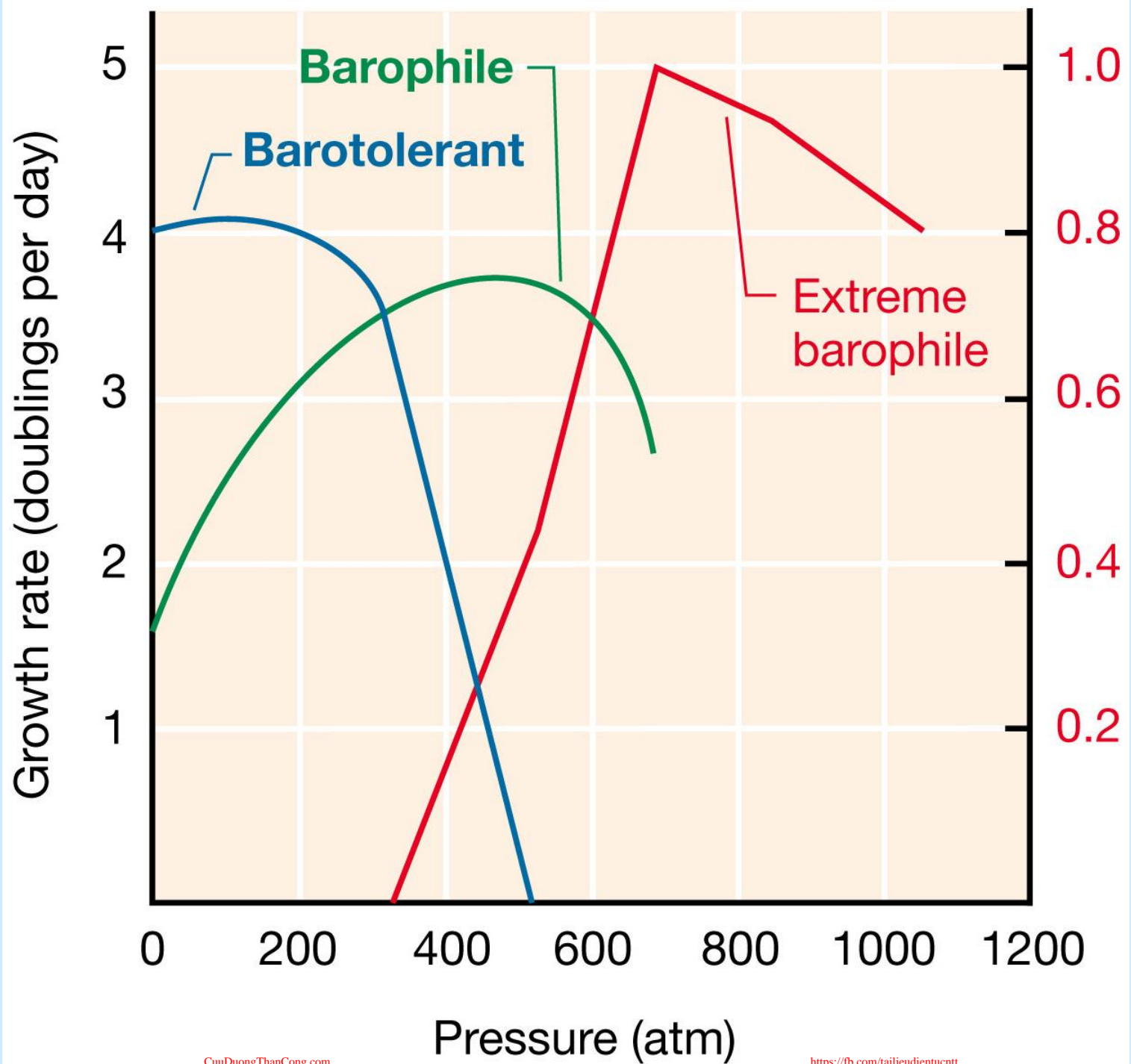
- Thành phần và hoạt tính vi sinh vật thay đổi theo tính chất hóa lý của môi trường nước:
- Hầu hết các vi sinh vật tham gia vào các chu trình sinh địa hóa các nguyên tố đều hiện diện
- Vi sinh vật là thành phần quang năng quan trọng nhất:
  - + Quang hợp sinh ôxi: tảo lam, tảo
  - + Quang hợp không sinh ôxi: vi khuẩn quang dưỡng
- Hình thành một chuỗi thực phẩm trong đó năng suất sinh học phụ thuộc vào tốc độ của sản xuất sơ cấp
- Các yếu tố quan trọng ảnh hưởng đến thành phần và hoạt tính vi sinh vật:
  - +  $O_2$  tan làm thay đổi môi trường và vận tốc chuyển hóa chất hữu cơ
  - + Các chất vô cơ ( $NO_3^-$ ,  $PO_4^{3-}$ ) tạo sự phát triển bùng nổ của tảo, ảnh hưởng đến  $O_2$  tan

# **Ảnh hưởng của ôxi tan và chất hữu cơ lên vi sinh vật trong môi trường nước**

- Ôxi và chu trình carbon có quan hệ chặt chẽ với nhau: nồng độ ôxi tan tỷ lệ nghịch với nồng độ chất hữu cơ tan
- BOD (biochemical oxygen demand) biểu thị lượng chất hữu cơ tan
- Nồng độ ôxi tan trong nước còn chịu ảnh hưởng của các yếu tố thủy triều, tốc độ dòng chảy, nhiệt độ theo mùa
- Ôxi tan làm môi trường nước trở nên hiếu khí hay yếm khí, ảnh hưởng đến thành phần và hoạt tính của vi sinh vật, thành vật thực, động vật thủy sinh và chất lượng môi trường nước

# Vi sinh vật trong biển sâu

- Đặc điểm hóa lý của môi trường biển sâu:
  - + Độ sâu trên 1000m, chiếm hơn 75% tổng dung tích nước của đại dương
  - + Ít chất dinh dưỡng, không có ánh sáng, lạnh ( $2 - 3^{\circ}\text{C}$ ), áp suất thủy tĩnh cao (+1atm/10m sâu)
- Đặc điểm của vi sinh vật:
  - + Ưa hàn (psychrophilic) và ưa hàn cực đoan (extreme psychrophilic)
  - + Chịu áp (barotolerant): tăng trưởng được ở áp suất bình thường cho đến 300atm
  - + Ưa áp (barophilic): tăng trưởng tối ưu ở 400atm
  - + Ưa áp cực đoan (extreme barophilic): chỉ tăng trưởng được ở áp lực trên 300atm, tối ưu ở 700 - 800atm



# **Ý nghĩa của nghiên cứu vi sinh vật trong biển sâu**

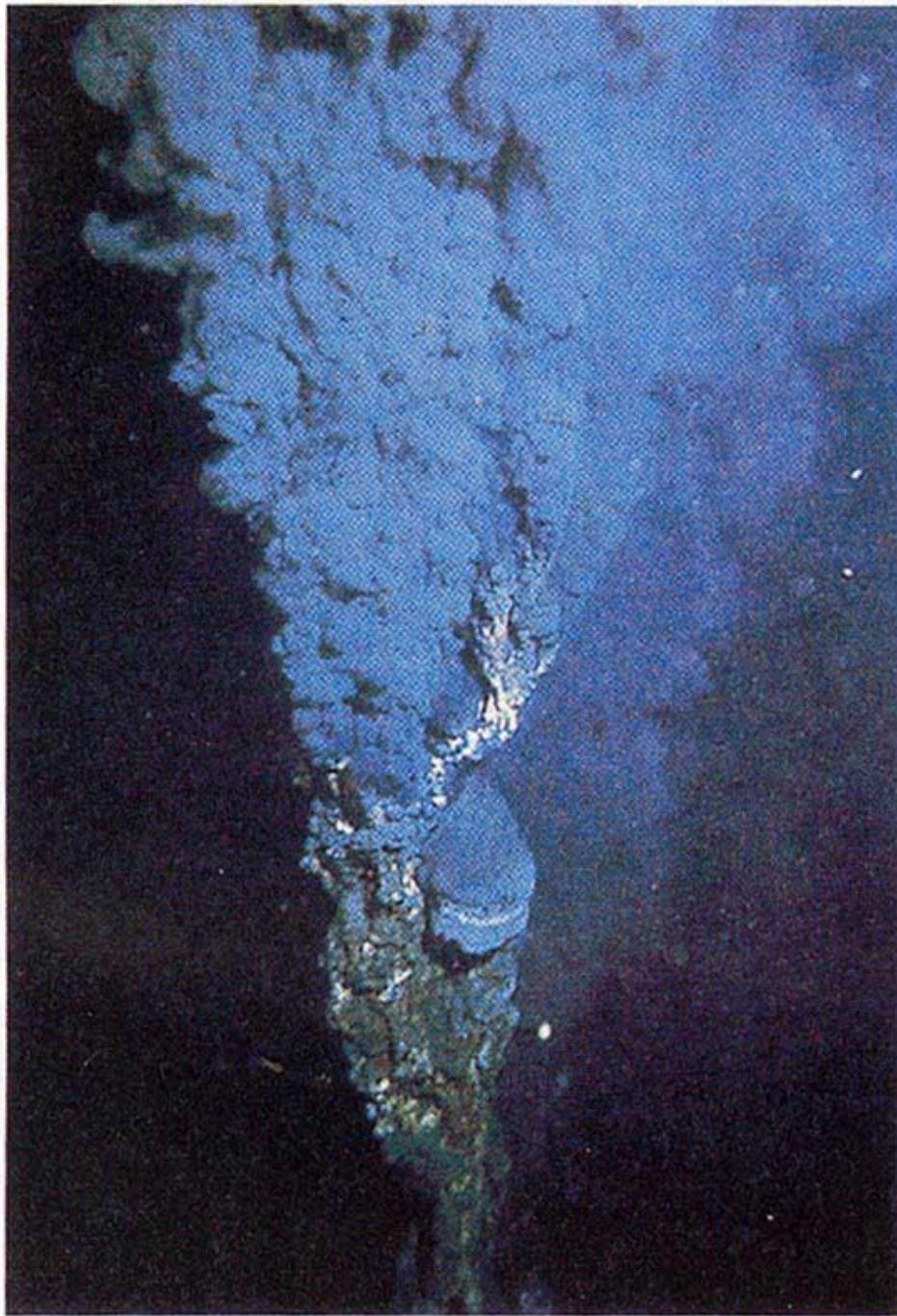
- Barophile là mô hình để nghiên cứu ảnh hưởng của áp suất lên sự biểu hiện của gen, hoạt động của protein và hoạt động của màng
- Áp suất cao:
  - + Làm giảm hoạt tính của enzyme do làm giảm ái lực với cơ chất
  - + Làm tăng thành phần axit béo không bão hòa
  - + Cảm ứng tổng hợp porin OmpH trên màng ngoài
- Gen mã hóa OmpH từ một barophile được cảm ứng biểu hiện ở mức phiên mã trong *E. coli* ở áp suất 200atm:
  - + Omp H là một porin khác với các porin được tổng hợp ở 1atm
  - + Cơ chế cảm ứng sự biểu hiện của gen: bất hoạt repressor hoặc hoạt hóa activator bởi áp suất cao?



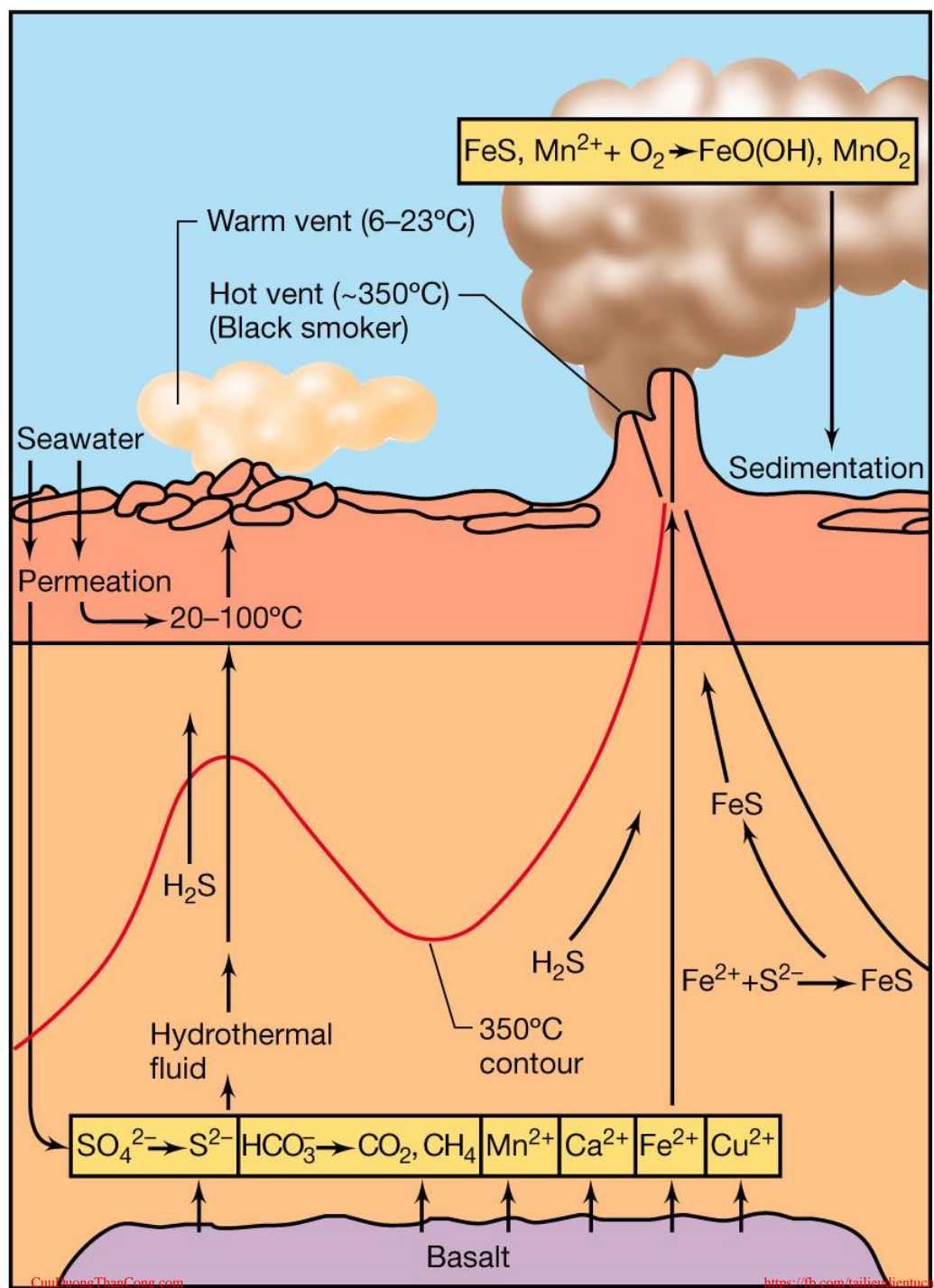
# Vi sinh vật tại các khe thủy nhiệt

- Khe thủy nhiệt (hydrothermal vent): dòng phun nước nóng mang nhiều chất khoáng được tạo ra tại các vết nứt trong lòng biển sâu:
    - + Khe ấm: dòng phun tốc độ 0,2 - 5cm/giây có nhiệt độ 6 - 23°C (so với 2°C)
    - + Khe nóng: dòng phun tốc độ 1 - 2m/giây màu đen do chứa nhiều khoáng chất, nhiệt độ 270 - 380°C
  - Vi sinh vật tại khe thủy nhiệt: sinh vật sản xuất bằng hóa năng vô cơ
    - + Mật độ cao của vi khuẩn hóa năng vô cơ ôxi hóa  $H_2$ , các hợp chất khử của lưu huỳnh, nitrogen, carbon, sắt
    - + Có khả năng cố định  $CO_2$
  - Sự cộng sinh của vi khuẩn Thiovulum trong các dưỡng thể (trophosome) của trùn khổng lồ Pogonophora: trùn thu thập, cung cấp  $O_2$ , các khoáng chất cho vi khuẩn, vi khuẩn cung cấp các dưỡng chất cho trùn
- Chuỗi thực phẩm tại các khe thủy nhiệt:
- Chuỗi thực phẩm hai thành phần:
    - + Sinh vật sản xuất hóa năng vô cơ
    - + Sinh vật tiêu thụ: động vật cộng sinh với sinh vật sản xuất

(a)



Robert D. Ballard

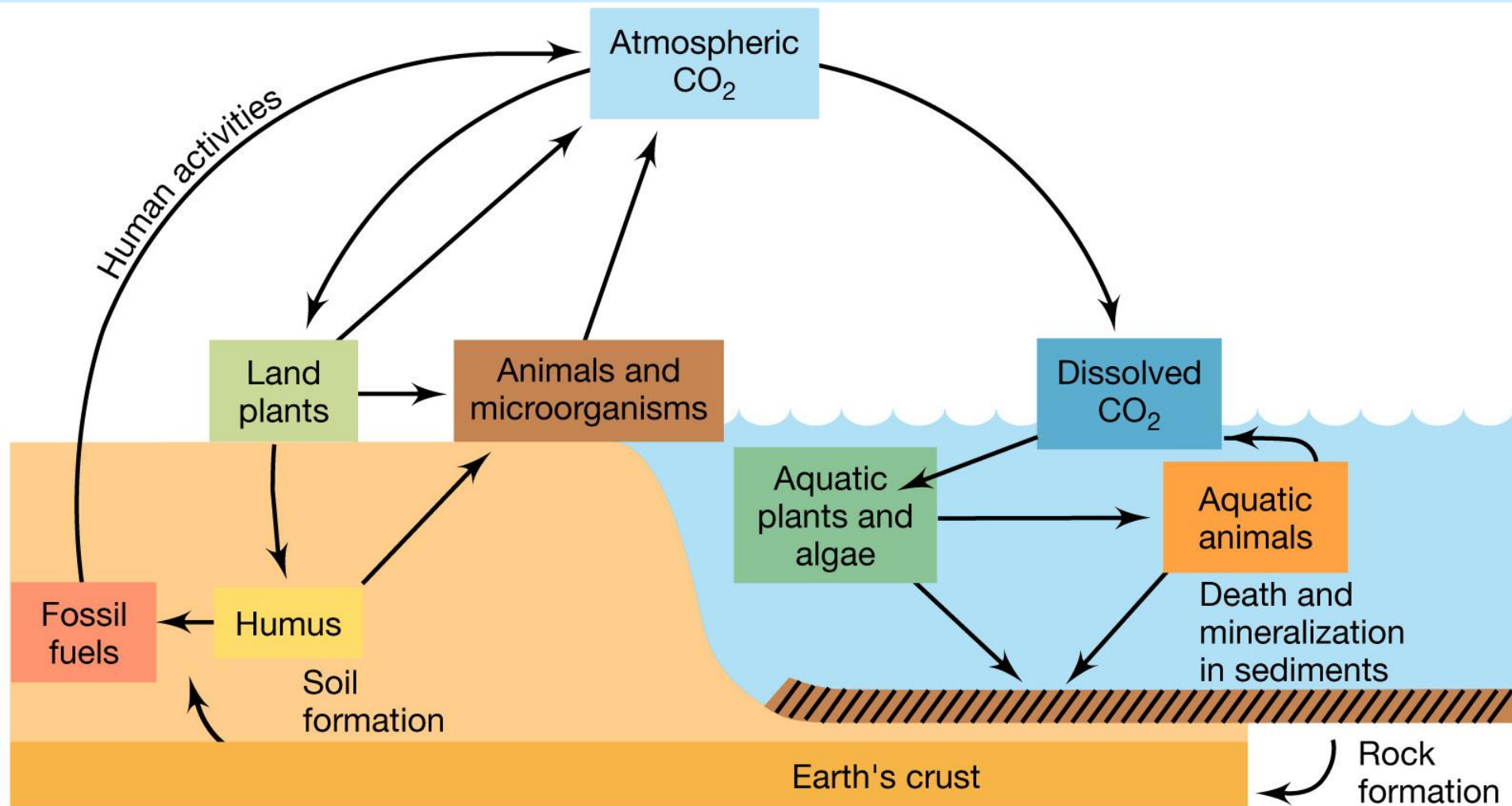


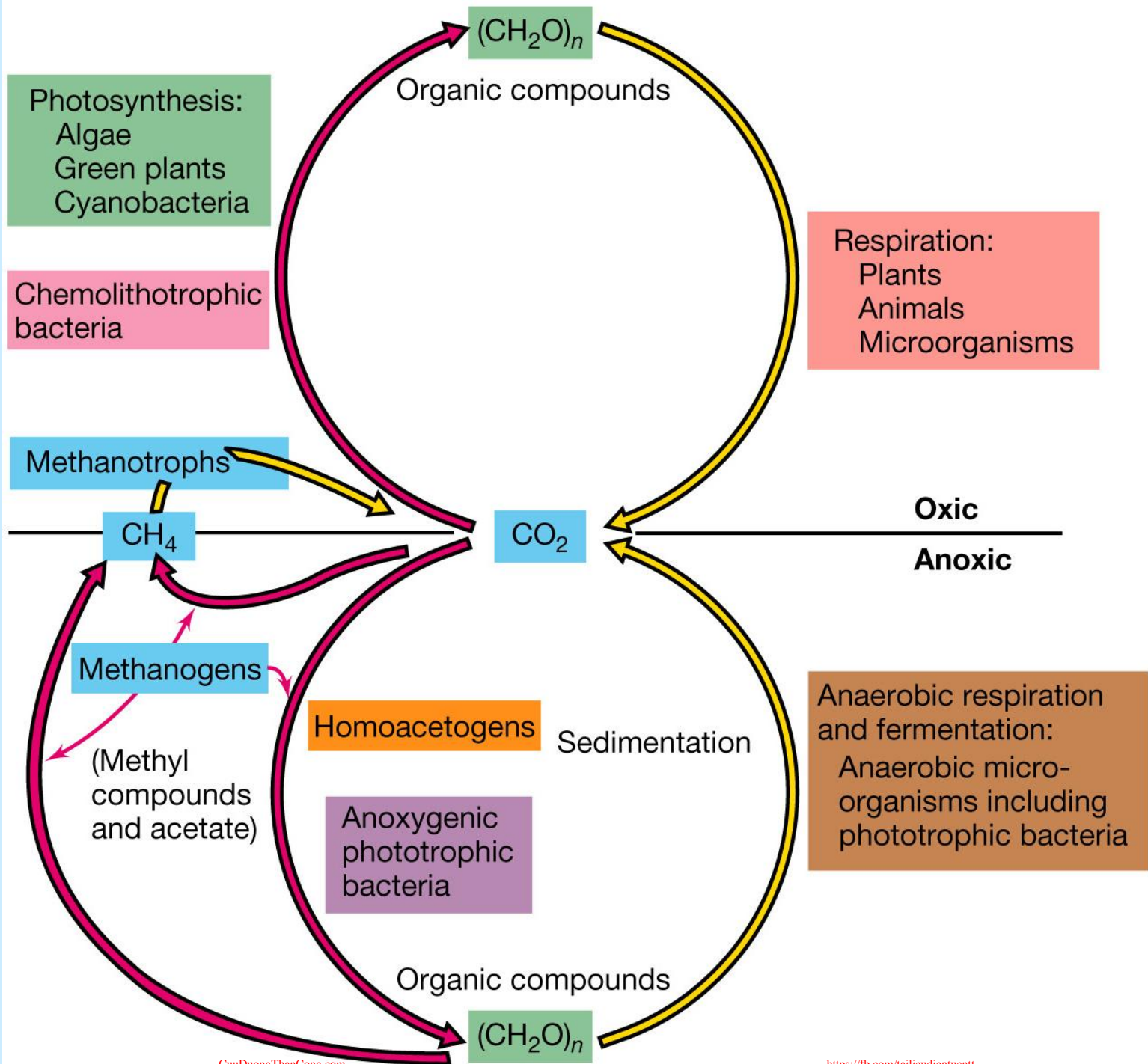
# **Vai trò của vi sinh vật trong các chu trình sinh địa hóa các nguyên tố cần cho sự sống**

# Chu trình carbon

- Chu trình C có quan hệ chặt chẽ với chu trình O thông qua hoạt tính bổ trợ của các sinh vật tự dưỡng (cố định  $\text{CO}_2$  tạo  $\text{O}_2$ ) và sinh vật dị dưỡng (phóng thích  $\text{CO}_2$ , tiêu thụ  $\text{O}_2$ )
- Các dự trữ C trong tự nhiên: khí quyển, đất, đại dương, trầm tích, đá và sinh khối
- Tốc độ lưu chuyển C qua các dự trữ rất khác nhau, tốc độ cao nhất là giữa khí quyển và sinh khối do các phương thức cố định  $\text{CO}_2$  của tự dưỡng và hô hấp hữu cơ hiếu khí của dị dưỡng
- Sự chuyển hóa C qua thế khử khác nhau  $\text{CH}_4$ ,  $(\text{CH}_2\text{O})_n$ ,  $\text{CO}_2$  trong điều kiện có và không có ôxi đều có sự tham gia của vi sinh vật





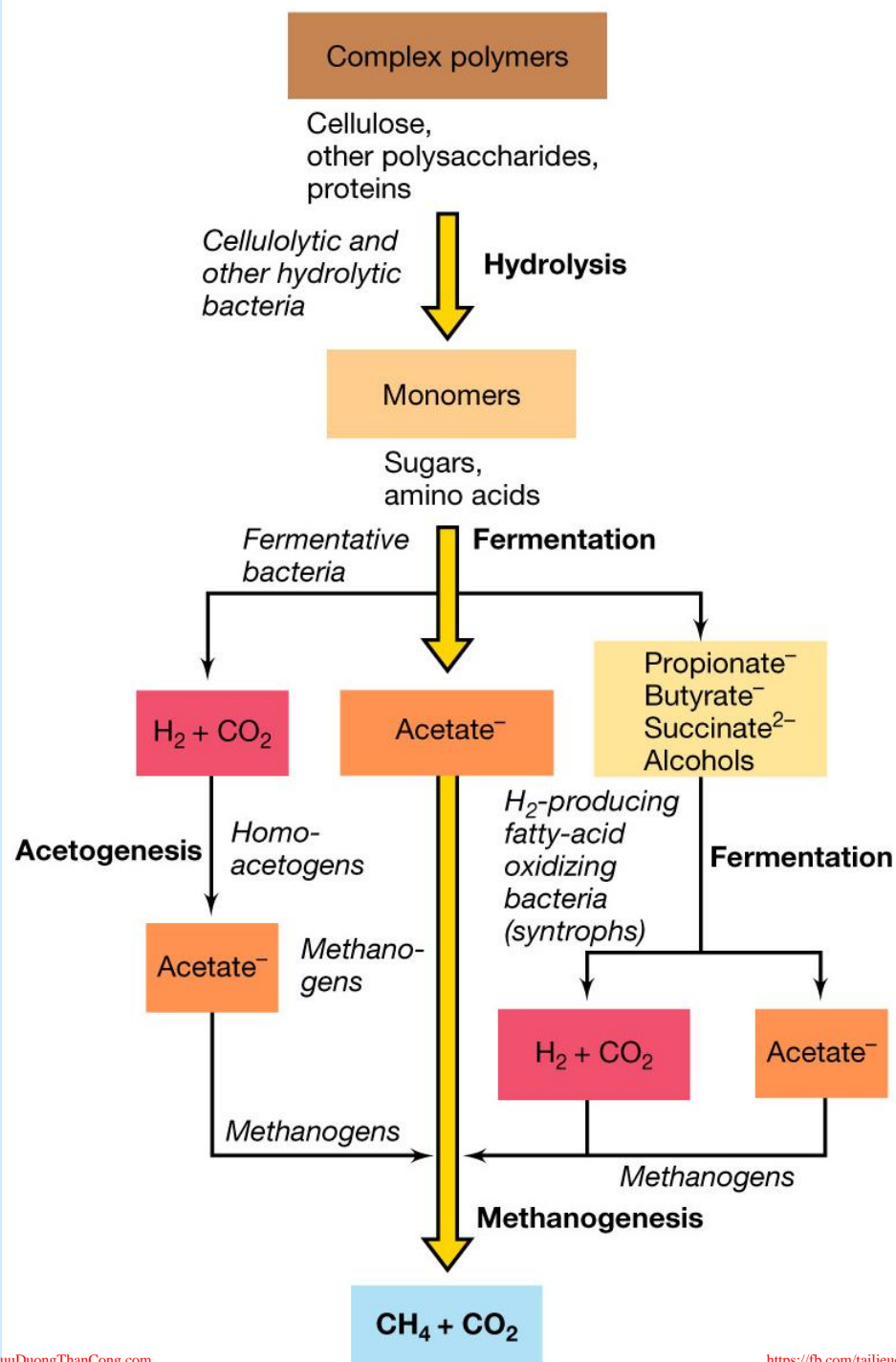


# **Các chuyển hóa có ý nghĩa sinh thái trong chu trình C**

- Cố định  $\text{CO}_2$  ở vi sinh vật quang năng và vi sinh vật hóa năng vô cơ là bước chuyển hóa quan trọng nhất:
  - + Hình thành chất hữu cơ mới
  - + Luân chuyển C từ khu vực phi sinh học (khí quyển) sang khu vực sinh học (sinh khối)
  - + Sinh quyển được hình thành trên cơ sở hai chuyển hóa C ngược nhau là quang hợp và hô hấp, trong đó cân cân quang hợp nặng hơn hô hấp
- Sự phân hủy sinh khối, chất hữu cơ bởi vi sinh vật thành  $\text{CO}_2$ :
  - + Phân hủy kỵ khí chất hữu cơ thành  $\text{CH}_4$  và  $\text{CO}_2$
  - + Ôxi hóa  $\text{CH}_4$  thành  $\text{CO}_2$
  - +  $\text{CO}_2$  do sự phân hủy bởi vi sinh vật chiếm phần quan trọng nhất trong sự phóng thích  $\text{CO}_2$  vào khí quyển

# **Phân hủy kỵ khí chất hữu cơ và vai trò của sự cộng dưỡng**

- **Phân hủy hợp chất hữu cơ trong điều kiện kỵ khí:**
  - + Thủy phân đại phân tử thành đơn phân
  - + Lên men sơ cấp tạo  $H_2$ ,  $CO_2$ , cồn và axit béo
  - + Tiêu thụ  $H_2$ ,  $CO_2$  và chuyển hóa cộng dưỡng cồn, axit béo
  - + Tạo  $CH_4$
- **Cạnh tranh tiêu thụ  $H_2$  trong điều kiện kỵ khí:**
  - + Tạo  $CH_4$  (methanogenesis), tạo acetate (acetogenesis) và tạo  $H_2S$  (sulfidogenesis)
  - + Trong môi trường không có sulfate: cạnh tranh giữa sinh methane và sinh acetate (Methanogen chiếm ưu thế trong dạ dày động vật nhai lại; Homoacetogen chiếm ưu thế trong ruột mối)
  - + Trong môi trường có sulfate: vi khuẩn khử sulfate chiếm ưu thế
- **Sự cộng dưỡng (syntrophism):**
  - + Có ý nghĩa quan trọng trong chuyển hóa kỵ khí tiếp tục các chất hữu cơ là sản phẩm của lên men sơ cấp
  - + Cộng dưỡng giữa syntroph và các loài methanogen tiêu thụ  $H_2$



# Chu trình nitrogen

- Nitrogen là một nguyên tố thiết yếu trong sinh chất
- Trong tự nhiên hiện diện ở các thể khử khác nhau:  $\text{NH}_3$ ,  $\text{NH}_2^-$ ,  $\text{N}_2$ ,  $\text{N}_2\text{O}$ ,  $\text{NO}$ ,  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ . Dự trữ nitrogen quan trọng nhất là  $\text{N}_2$  trong khí quyển
- Sự chuyển hóa qua lại giữa các dạng này cần có vai trò của vi sinh vật
- Cố định nitrogen:
  - + Được thực hiện bởi một số vi sinh vật cố định đạm tự do và cộng sinh
  - + Chuyển N từ dạng không thể sử dụng bởi đa số sinh vật thành dạng có thể sử dụng được
  - + Dạng cố định  $\text{NH}_3$  được chuyển từ khu vực phi sinh vật vào sinh khối ( $\text{NH}_2^-$ ) bởi vi sinh vật, thực vật
- Ammôn hóa:  $\text{NH}_3$  được tạo ra do sự phân hủy N hữu cơ
  - +  $\text{NH}_3$  được tái sử dụng bởi thực vật, vi sinh vật, tồn tại bền ở dạng  $\text{NH}_4^+$  trong điều kiện kỵ khí hấp phụ mạnh bởi các hạt đất, ít tan trong nước
- Nitrate hóa  $\text{NH}_3$ :  $\text{NH}_3$  bị ôxi hóa bởi vi khuẩn nitrite hóa và nitrate hóa thành  $\text{NO}_2^-$  và  $\text{NO}_3^-$ 
  - +  $\text{NO}_3^-$  tan tốt trong nước và dễ bị rửa trôi, làm thất thoát đạm trong đất
- Phản nitrate hóa:
  - +  $\text{NO}_3^-$  bị khử bởi vi sinh vật kỵ khí thành  $\text{N}_2$  làm thất thoát đạm trong đất
  - + Giảm  $\text{NO}_3^-$  trong nước, cản trở hiện tượng nở hoa của tảo làm ô nhiễm nước



# Key Processes and Prokaryotes in the Nitrogen Cycle

## Processes

## Example organisms

**Nitrification** ( $\text{NH}_4^+ \rightarrow \text{NO}_3^-$ )



*Nitrosomonas*



*Nitrobacter*

**Denitrification** ( $\text{NO}_3^- \rightarrow \text{N}_2$ )

*Bacillus, Paracoccus, Pseudomonas*

**N<sub>2</sub> Fixation** ( $\text{N}_2 + 8\text{H} \rightarrow \text{NH}_3 + \text{H}_2$ )

Free-living

Aerobic

*Azotobacter*

Cyanobacteria

Anaerobic

*Clostridium*, purple and green bacteria

Symbiotic

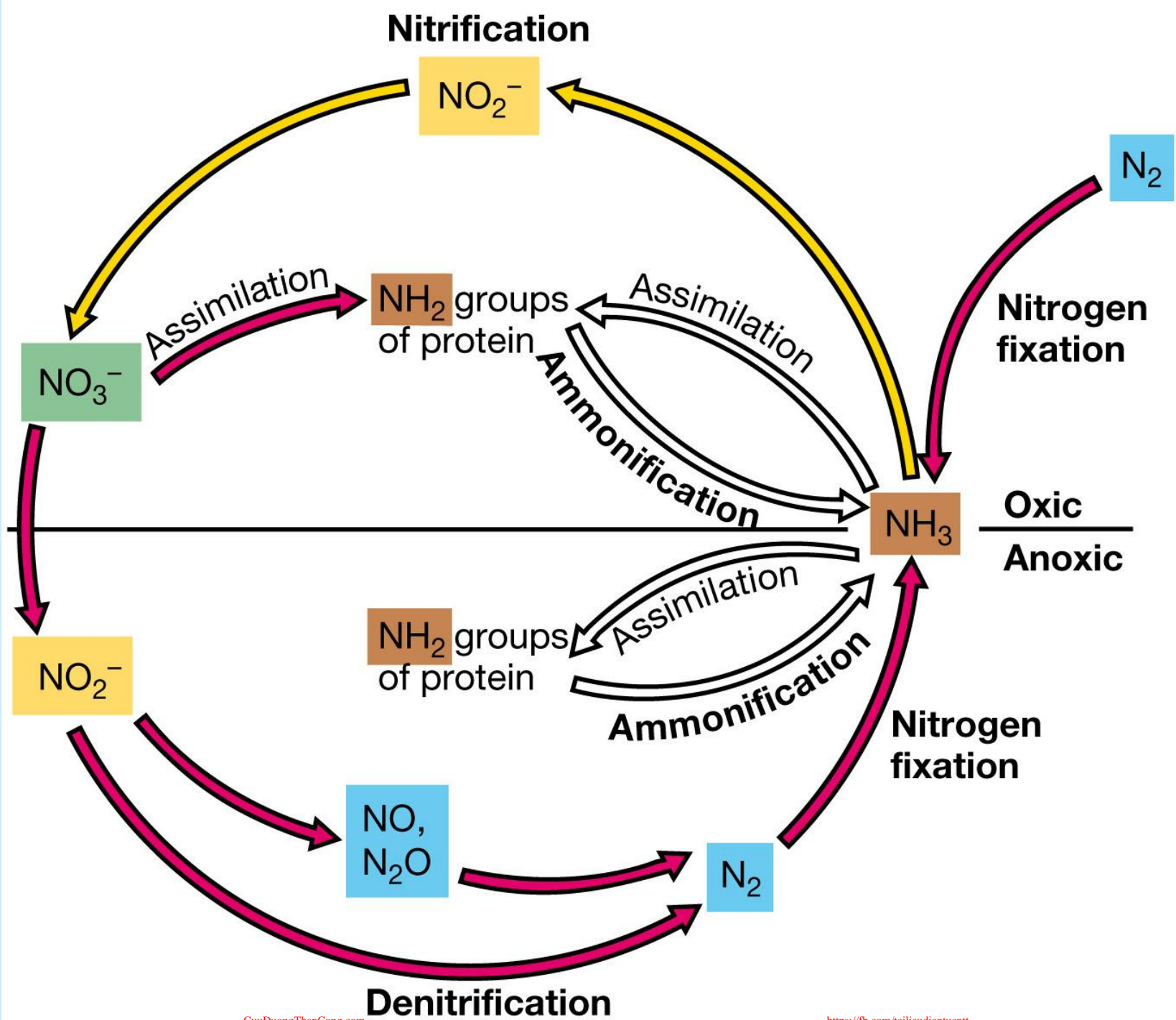
*Rhizobium*

*Bradyrhizobium*

*Frankia*

**Ammonification** (organic-N  $\rightarrow \text{NH}_4^+$ )

Many organisms can do this





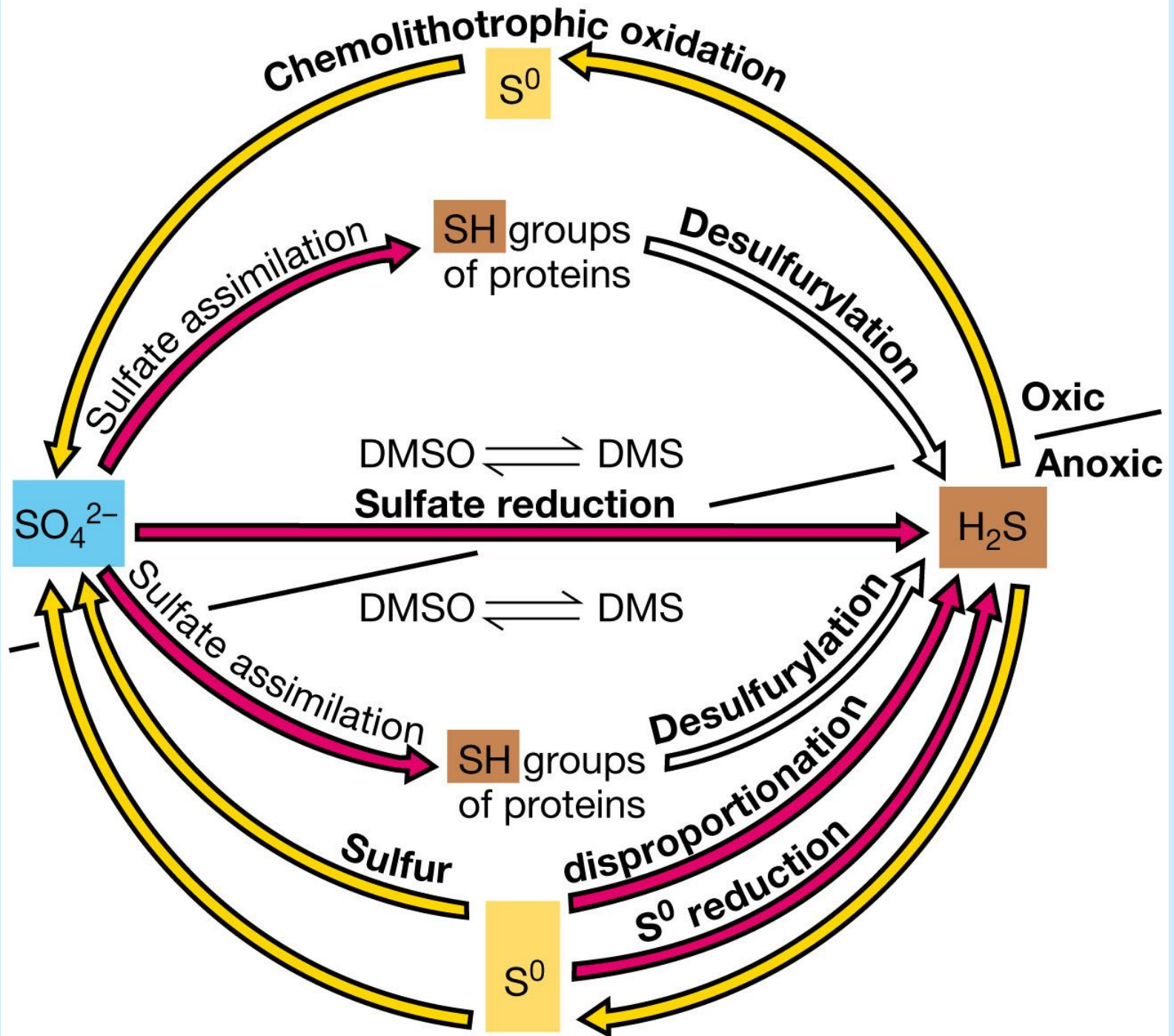
# Chu trình lưu huỳnh

- Lưu huỳnh tồn tại chủ yếu ở ba dạng thế khử  $S^{2-}$ ,  $S^0$  và  $S^{+6}$
- Dự trữ chủ yếu ở dạng  $CaSO_4$  và  $FeS_2$
- Các phản ứng chuyển hóa các dạng của S là do vi sinh vật và các phản ứng hóa chất
- $H_2S$ :
  - + Được tạo ra bởi sự khử sulfate và bởi sự phân hủy các amino acid chứa  $-SH$ :
  - + Môi trường kỵ khí có sự hiện diện của sulfate và các chất hữu cơ
  - + Có độc tính đối với sinh vật hiếu khí
- Ôxi hóa các hợp chất sulfide:
  - +  $H_2S$  bị ôxi hóa hóa học trong điều kiện có ôxi
  - + Trong môi trường vi hiếu khí bị ôxi hóa bởi vi sinh vật
  - + Trong môi trường có ánh sáng, không có ôxi, bị ôxi hóa kỵ khí bởi vi khuẩn quang hợp
- Ôxi hóa lưu huỳnh bởi vi sinh vật thành  $SO_4^{2-}$  và  $H^+$  làm giảm pH
- Chuyển hóa của lưu huỳnh hữu cơ (dimethyl sulfide) bởi vi sinh vật:
  - + Chất cho điện tử để tạo lực khử ở vi khuẩn tía
  - + Chất cho điện tử để thu năng lượng
  - + Chất nhận điện tử trong hô hấp kỵ khí
  - + Cơ chất lên men sinh methane

## Key Processes and Prokaryotes in the Sulfur Cycle

Process	Organisms
<b>Sulfide/sulfur oxidation</b> ( $\text{H}_2\text{S} \rightarrow \text{S}^0 \rightarrow \text{SO}_4^{2-}$ )	
Aerobic	Sulfur chemolithotrophs ( <i>Thiobacillus</i> , <i>Beggiatoa</i> , many others)
Anaerobic	Purple and green phototrophic bacteria, some chemolithotrophs
<b>Sulfate reduction</b> (anaerobic) ( $\text{SO}_4^{2-} \rightarrow \text{H}_2\text{S}$ )	<i>Desulfovibrio</i> , <i>Desulfobacter</i> ,
<b>Sulfur reduction</b> (anaerobic) ( $\text{S}^0 \rightarrow \text{H}_2\text{S}$ )	<i>Desulfuromonas</i> , many hyperthermophilic <i>Archaea</i>
<b>Sulfur disproportionation</b> ( $\text{S}_2\text{O}_3^{2-} \rightarrow \text{H}_2\text{S} + \text{SO}_4^{2-}$ )	<i>Desulfovibrio</i> , and others
<b>Organic sulfur compound oxidation or reduction</b> ( $\text{CH}_3\text{SH} \rightarrow \text{CO}_2 + \text{H}_2\text{S}$ ) ( $\text{DMSO} \rightarrow \text{DMS}$ )	
<b>Desulfurylation</b> (organic-S $\rightarrow \text{H}_2\text{S}$ )	Many organisms can do this







## Atmosphere

Sea to land 170/year

Land to sea 180/year

(160 artificial)

All figures should be multiplied by  $10^{11}$  to give grams sulfur (global scale)

30/year

650/year

700/year  
(490 artificial)

30/year

440/year

340/year

350/year  
(160 artificial)

Emissions from water-logged soils and lake sediments (mainly  $\text{H}_2\text{S}$  and dimethyl sulfide)\*

Artificial emissions (mainly  $\text{SO}_2$ )

Dry and wet deposition (mainly  $\text{SO}_4^{2-}$ )

Volcanoes

Rivers\* (mainly  $\text{SO}_4^{2-}$ )

Sea spray

Emissions from biological decay (mainly  $\text{H}_2\text{S}$  and dimethyl sulfide)\*

Wet, dry, and gaseous deposition (mainly  $\text{SO}_4^{2-}$ )

Land

1220/year

Oceans

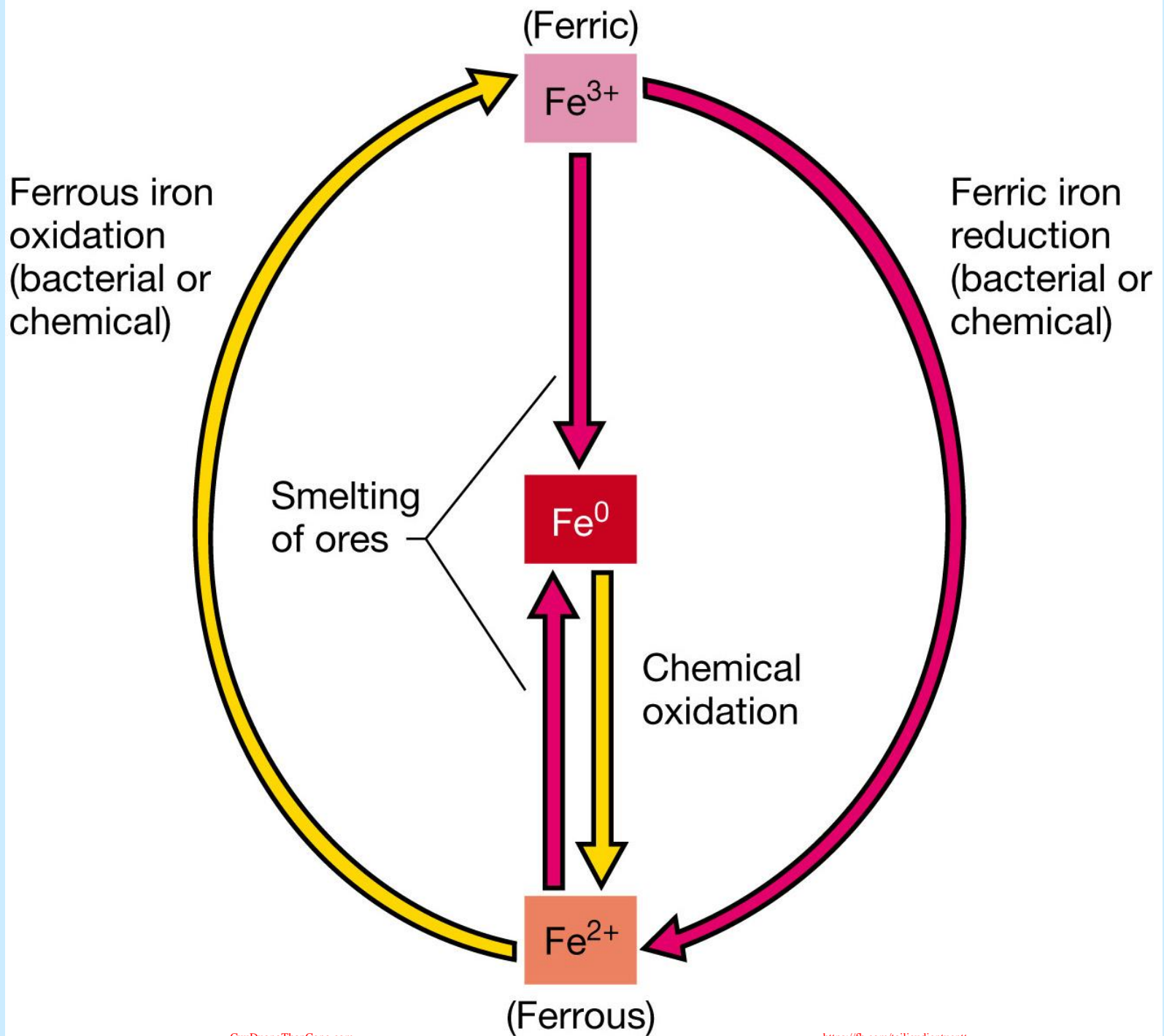
Weathering  
660/year

Crust

Sedimentation?

# Chu trình sắt

- Hai dạng thế khử chính của sắt trong tự nhiên là  $\text{Fe}^{2+}$  và  $\text{Fe}^{3+}$  phụ thuộc vào pH và  $\text{O}_2$
- $\text{Fe}^{3+}$ : chỉ tan trong nước ở pH axit hoặc ở dạng phức hợp với các hợp chất hữu cơ; bị khử thành  $\text{Fe}^{2+}$  bằng phản ứng hóa học hoặc bởi vi sinh vật
- $\text{Fe}^{2+}$  bị ôxi hóa bởi  $\text{O}_2$  thành  $\text{Fe}^{3+}$ 
  - + Bền trong điều kiện không có  $\text{O}_2$  hoặc trong môi trường có  $\text{O}_2$  ở pH axit
  - + Trong không khí ở pH axit,  $\text{Fe}^{2+}$  là chất cho điện tử của vi sinh vật (*Thiobacillus ferrooxidans*) tạo  $\text{Fe}^{3+}$



Ferrous iron

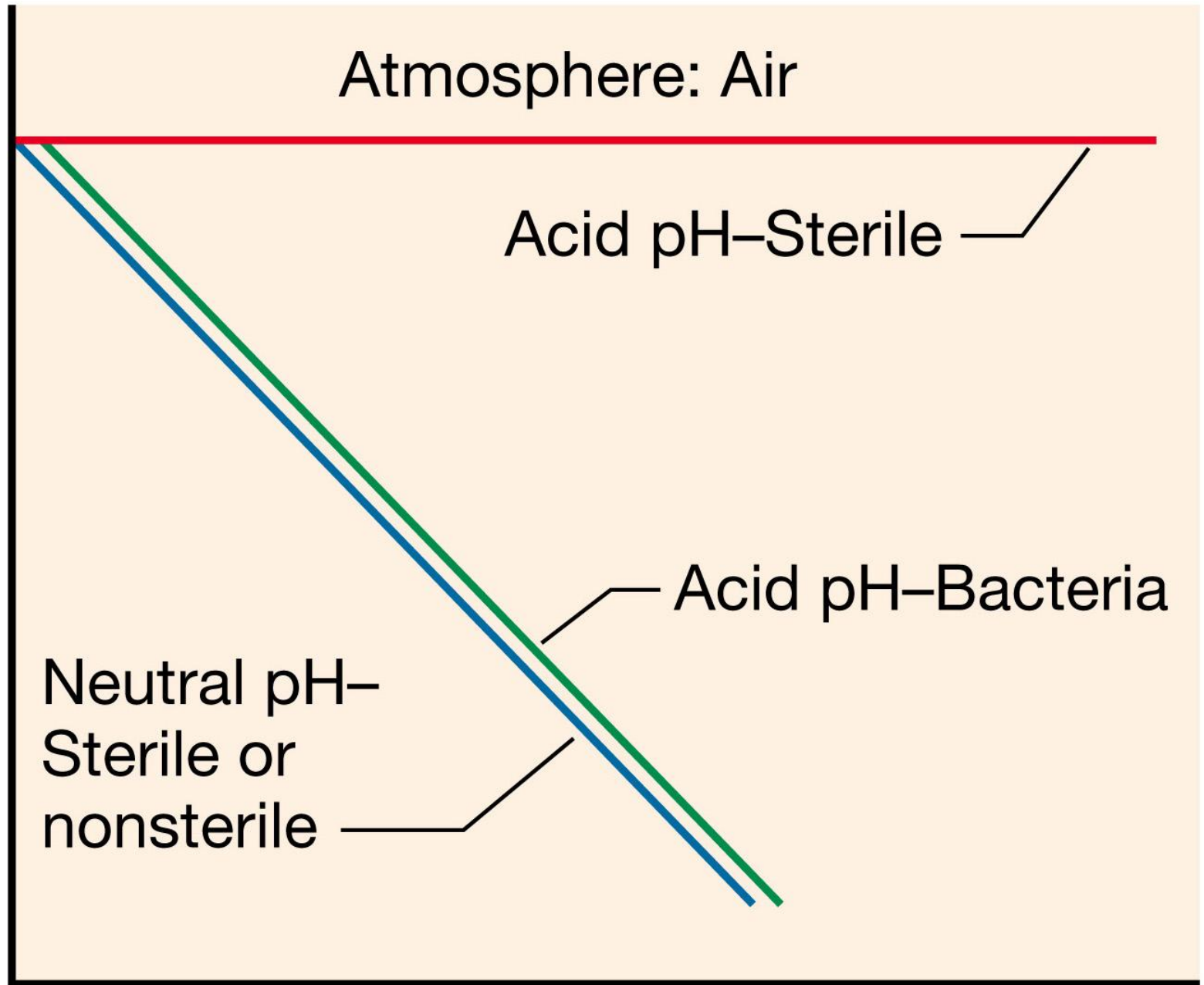
Atmosphere: Air

Acid pH–Sterile

Acid pH–Bacteria

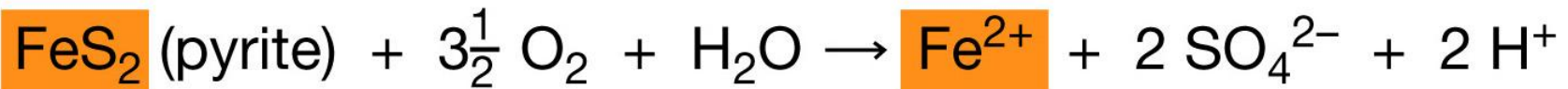
Neutral pH–  
Sterile or  
nonsterile

Time



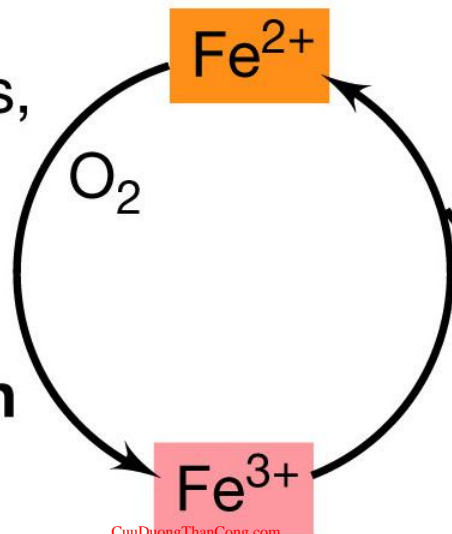
# Chu trình sắt và hiện tượng nước rỉ chứa axít ở các mỏ khoáng

- + Pyrite  $\text{FeS}_2$  hiện diện trong quặng khoáng bị ôxi hóa thành  $\text{Fe}^{2+}$  và  $\text{H}_2\text{SO}_4$
- +  $\text{Fe}^{2+}$  bị ôxi hóa bởi *Thiobacillus ferrooxidans* thành  $\text{Fe}^{3+}$
- +  $\text{Fe}^{3+}$  phản ứng hóa học với  $\text{FeS}_2$  thành  $\text{Fe}^{2+}$  và  $\text{H}_2\text{SO}_4$
- + Ô nhiễm môi trường xít và  $\text{Fe}^{2+}$  rò rỉ vào nước



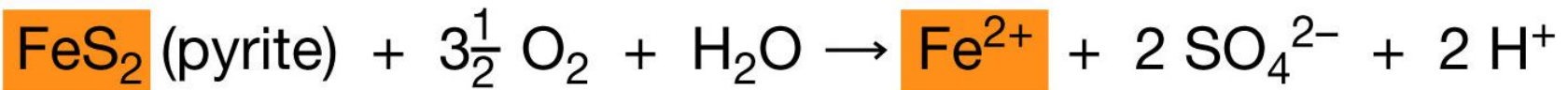
## Initiator reaction

Slow spontaneous, bacteria catalyze



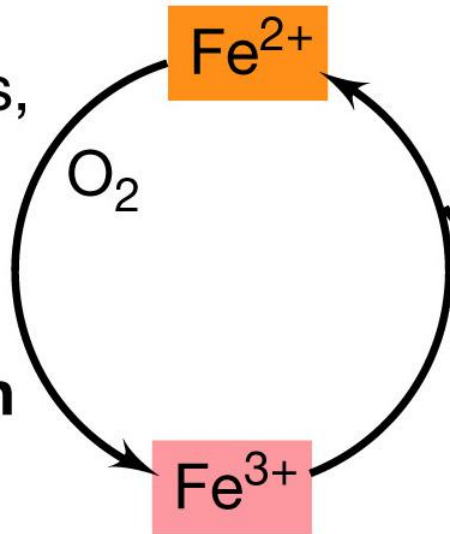
Spontaneous (bacteria may also catalyze)

Propagation cycle



### Initiator reaction

Slow  
spontaneous,  
bacteria  
catalyze



Propagation  
cycle

Fast spontaneous  
(bacteria may  
also catalyze)

Spontaneous  
(bacteria may  
also catalyze)



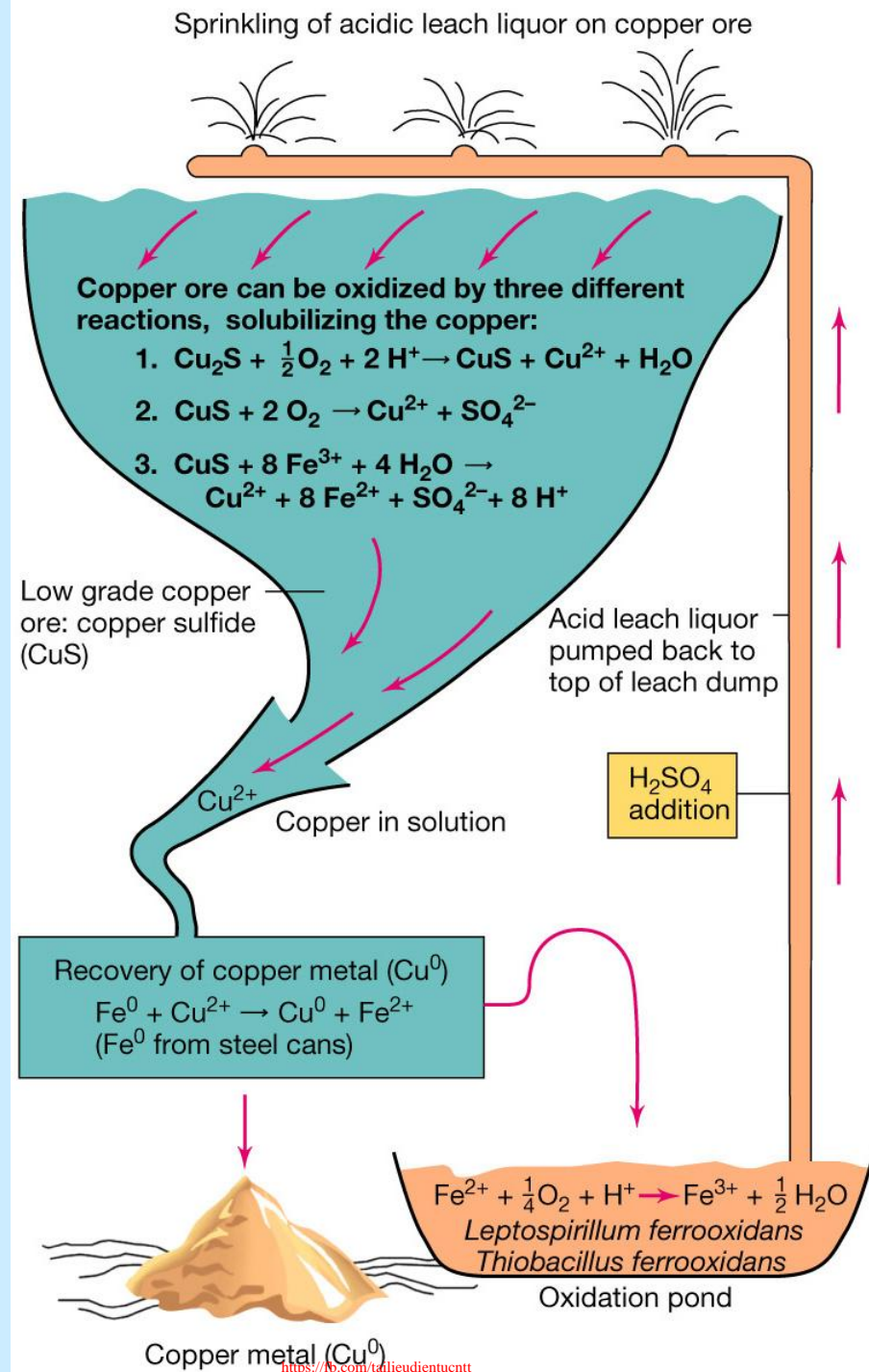
# Làm giàu quặng bằng VSV

- Ứng dụng trong làm giàu quặng khoáng (đồng, uranium) bằng vi sinh vật:

+ Quặng bị ôxi hóa bởi  $\text{Fe}^{3+}$  trong điều kiện kỵ khí thành dạng ion tan

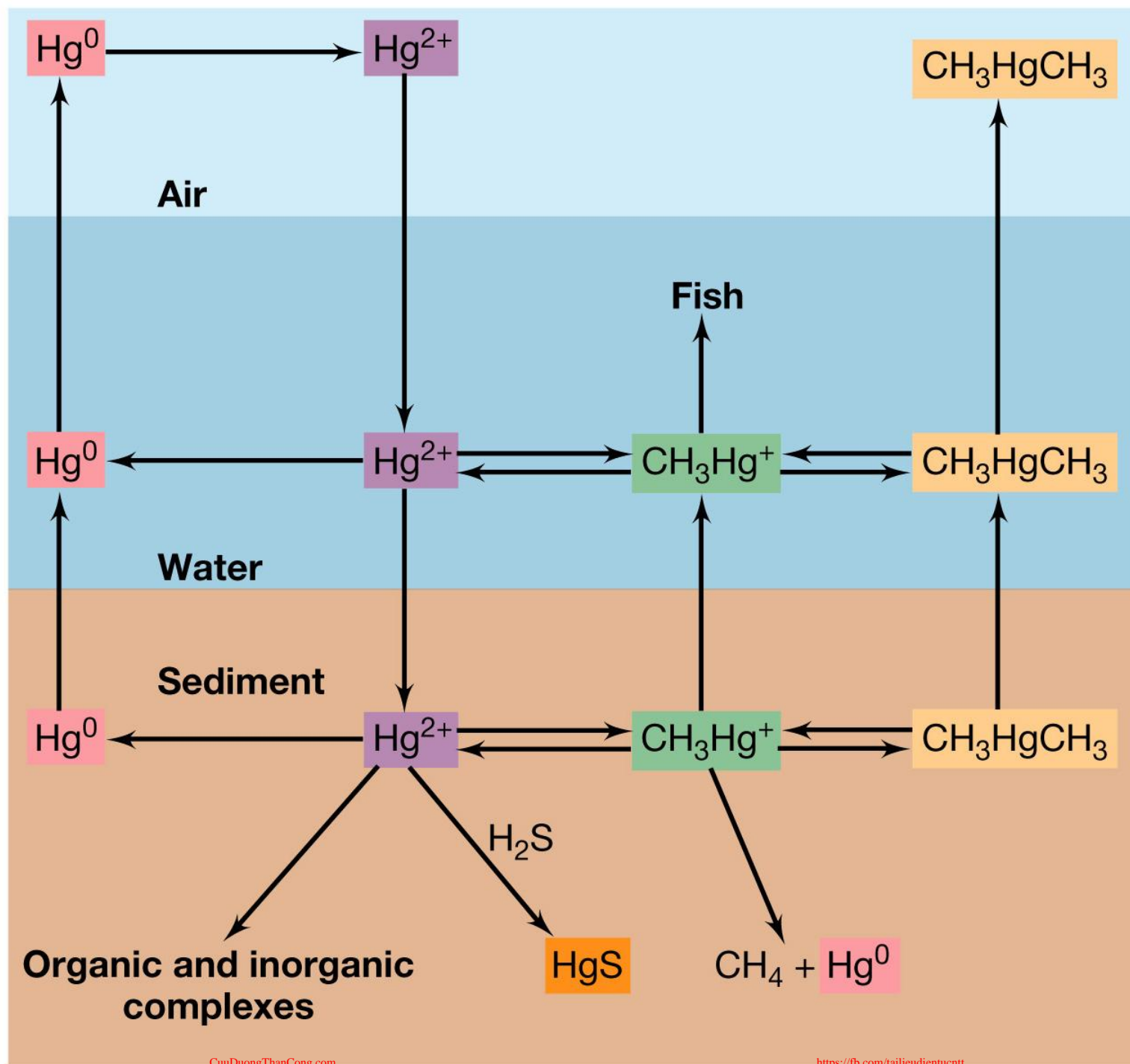
+ Ion kim loại bị khử thành kim loại bởi Fe tạo  $\text{Fe}^{2+}$

+  $\text{Fe}^{2+}$  bị ôxi hóa bởi *Thiobacillus ferrooxidans* thành  $\text{Fe}^{3+}$



# Chuyển hóa Hg

- Hg được phóng thích nhiều vào môi trường từ công nghiệp nông dược, điện tử, hóa chất...
- Các dạng lực khử khác nhau của Hg:  $\text{Hg}^0$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{CH}_3\text{Hg}^+$ ,  $\text{CH}_3\text{HgCH}_3$ ,  $\text{HgS}$ , trong đó  $\text{CH}_3\text{Hg}^+$  có độc tính cao nhất và được tích tụ trong chuỗi thực phẩm
- Các chuyển hóa:
  - + Ôxi hóa  $\text{Hg}^0$  thành  $\text{Hg}^{2+}$  do phản ứng quang hóa
  - + Methyl hóa  $\text{Hg}^{2+}$  thành  $\text{CH}_3\text{Hg}^+$  và  $\text{CH}_3\text{HgCH}_3$  do vi sinh vật
  - + Sulfide hóa  $\text{Hg}^{2+}$  thành  $\text{HgS}$  bởi vi khuẩn khử sulfate
  - + Khử  $\text{CH}_3\text{Hg}^+$  thành  $\text{Hg}^0$  và  $\text{CH}_4$  bởi vi khuẩn sinh methane



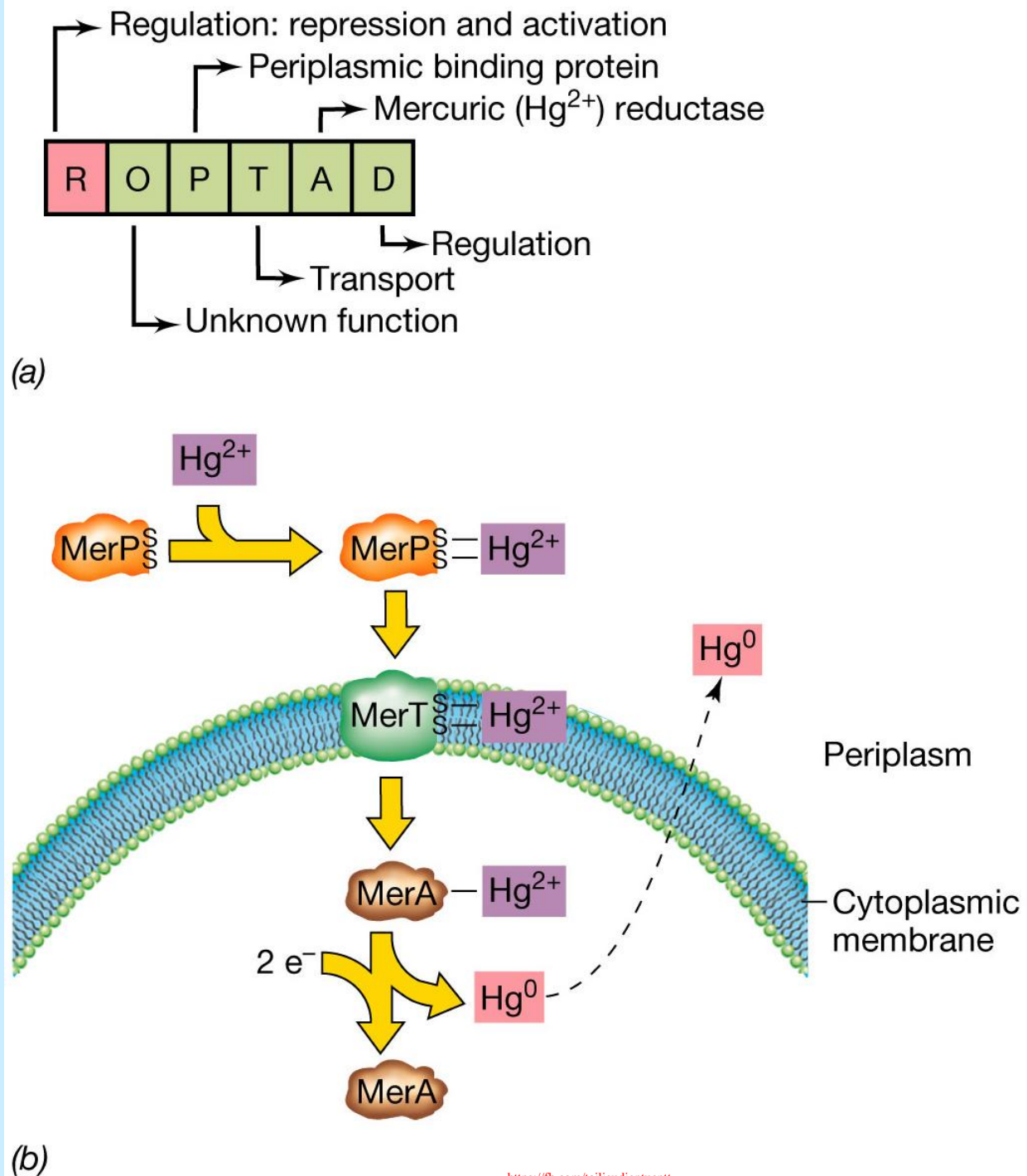
# Cơ chế kháng độc tính thủy ngân ở VSV

- Ở *Pseudomonas aeruginosa*:

+ Plasmid chứa operon *mer*

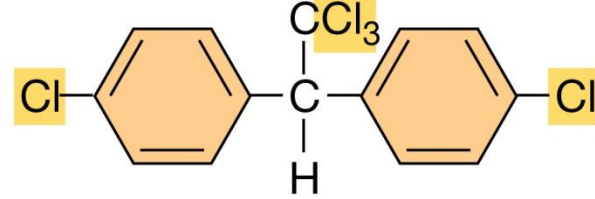
+ Một trong sản phẩm là  $\text{Hg}^{2+}$ -reductase khử  $\text{Hg}^{2+}$  thành  $\text{Hg}^0$

+  $\text{Hg}^0$  thăng hoa khỏi tế bào

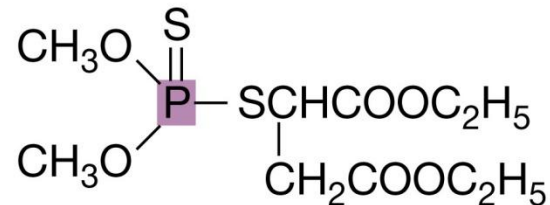


# Các chất dị sinh

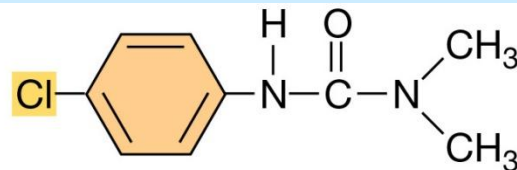
- **Chất dị sinh (xenobiotics)** là các hợp chất do tổng hợp hóa học được phóng thích với số lượng lớn vào môi trường
- **Thuốc trừ sâu, thuốc diệt cỏ**



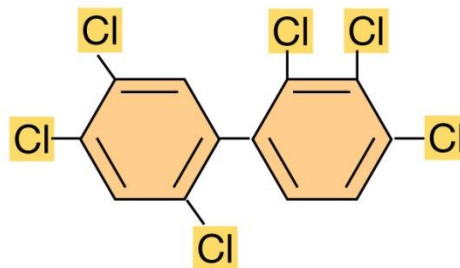
**DDT**; dichlorodiphenyltrichloroethane  
(an organochlorine)



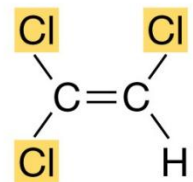
**Malathion**; mercaptosuccinic acid diethyl ester  
(an organophosphate)



**Monuron**; 3-(4-chlorophenyl)-1,1-dimethylurea  
(a substituted urea)



**Chlorinated biphenyl (PCB)**;  
shown is 2, 3, 4, 2', 4', 5'- Hexachlorobiphenyl



**Trichloroethylene**

# Chuyển hóa các chất dị sinh chứa chlor

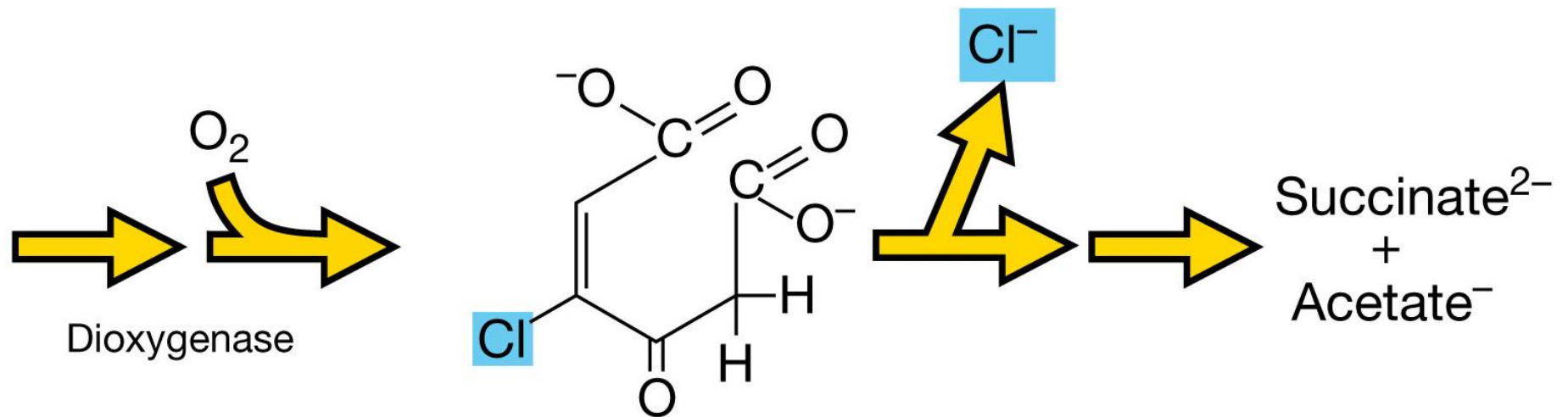
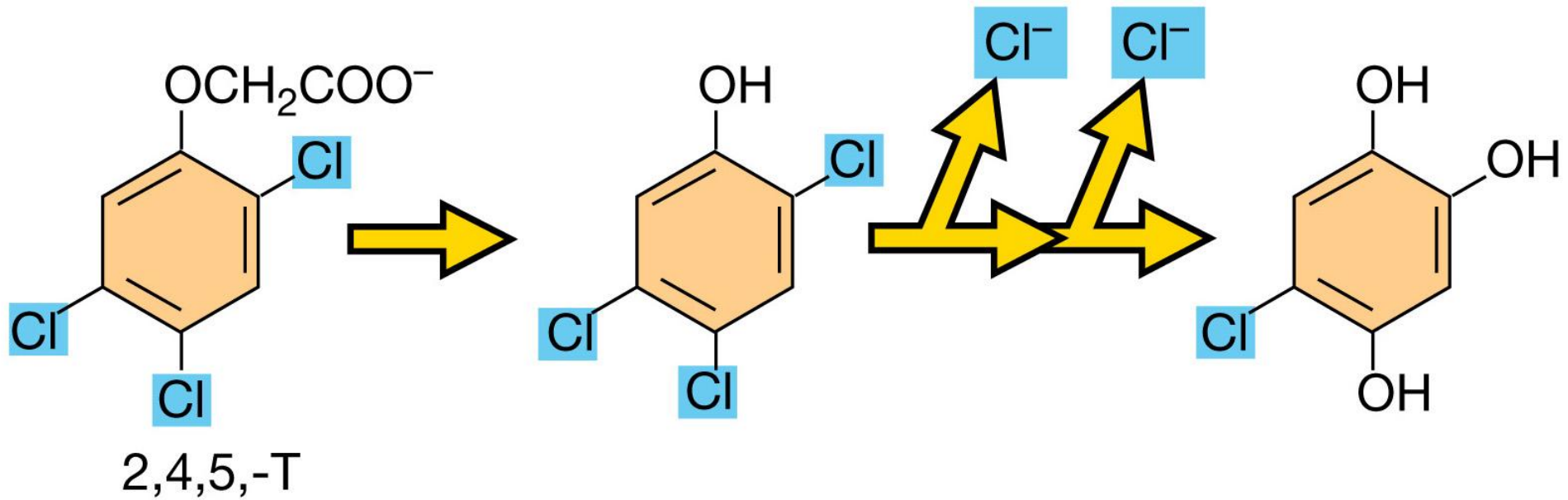
- Khử chlor kỵ khí (reductive dechlorination) các thuốc trừ sâu chứa chlor bởi vi sinh vật :
  - + Chất cho điện tử: acetate, formate hay  $H_2$
  - + Chất nhận điện tử: thuốc trừ sâu chứa chlor
- Khử chlor hiếu khí (aerobic dechlorination) bởi vi sinh vật: sau bước khử chlor là bước phân hủy vòng benzene bằng tác dụng của các oxygenase cuối cùng thành các axit béo bậc thấp
- Trong tự nhiên khử chlor kỵ khí có vai trò quan trọng hơn do xu thế hình thành môi trường không có ôxi



TABLE 16.7

Characteristics of major genera of bacteria capable of reductive dechlorination

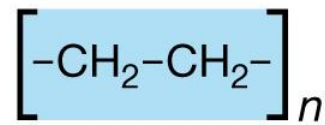
Property	Genus	
	<i>Dehalobacter</i>	<i>Desulfomonile</i>
Electron donors	H <sub>2</sub>	H <sub>2</sub> , formate, pyruvate, lactate, benzoate
Electron acceptors	Trichloroethylene, tetrachloroethylene	Metachlorobenzoates, tetrachloroethylene, SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> , SO <sub>3</sub> <sup>2-</sup> , S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> <sup>2-</sup>
Product of reduction of tetrachloroethylene	Dichloroethylene	Dichloroethylene
Other properties <sup>a</sup>	Contains cytochrome <i>b</i>	Contains cytochrome <i>c</i> <sub>3</sub> ; requires organic carbon source; can grow by fermentation of pyruvate
Phylogeny <sup>b</sup>	Related to low GC gram-positive bacteria	Related to delta Proteobacteria



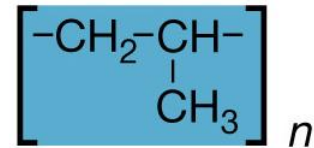
(b)

# Chất dẻo tổng hợp bị phân hủy sinh học

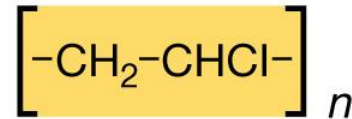
**Polyethylene**



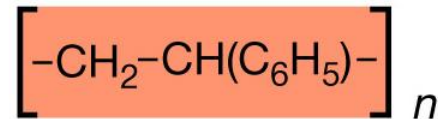
**Polypropylene**



**Polyvinyl chloride  
(PVC)**



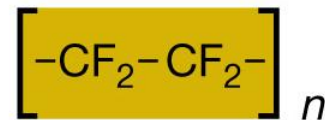
**Polystyrene**



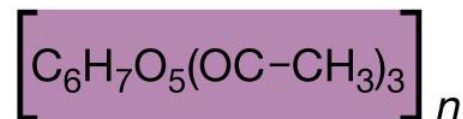
**Polyurethane**



**Teflon**



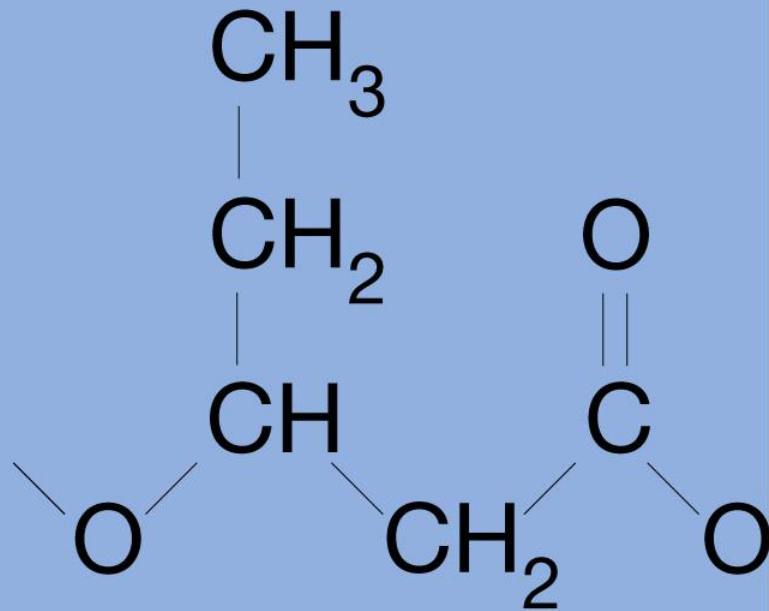
**Cellulose  
acetate**



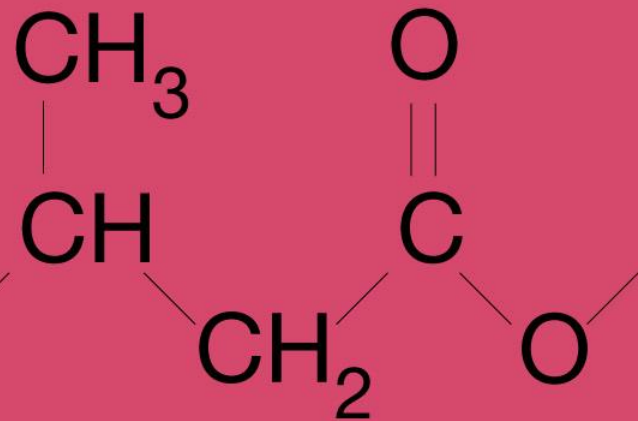
**Silicones**



**PHV**



**PHB**



(a)