

CHƯƠNG 3

SINH LÝ VI SINH VẬT

Chương 3 đề cập đến dinh dưỡng của vi sinh vật, môi trường nuôi cấy, sự sinh tổng hợp các đơn phân là nguyên liệu của các đại phân tử, một số phản ứng dị hóa ở vi sinh vật dị dưỡng hóa hữu cơ. Biến dưỡng được đề cập ở dạng đồng hóa (anabolism) và dị hóa (catabolism), sự phối hợp giữa hai quá trình này là nền tảng của sự tăng trưởng của vi sinh vật.

Chương này cũng đề cập đến cơ sở sinh học và sinh hóa học của sự tăng trưởng của tế bào. Sự tăng trưởng của vi sinh vật là sự gia tăng số lượng và tổng sinh khối tế bào. Mặc dù được đề cập chủ yếu ở trường hợp prokaryote nhưng các nguyên tắc chung được trình bày trong chương này cũng đúng với sự tăng trưởng của các vi sinh vật đơn bào khác.

Một phần nội dung của chương đề cập đến sự kiểm soát tăng trưởng của vi sinh vật: sự ức chế tăng trưởng bởi các biện pháp sát trùng, khử trùng và hóa liệu pháp.

Chương này còn đề cập đến sự đa dạng về khả năng biến dưỡng của thế giới vi sinh vật. Sự đa dạng sinh học của động và thực vật được thể hiện rõ ở hình thái của sinh vật. Ngược lại, ở vi sinh vật, những khác biệt về hình thái giữa các nhóm vi sinh vật khá hẹp. Tuy nhiên, trong thế giới vi sinh vật có sự đa dạng lớn về biến dưỡng đặc biệt là quá trình dị hóa để thu lấy năng lượng. Các cơ chế thu nhận năng lượng khác nhau này có vai trò quan trọng đối với hoạt động chức năng bình thường của sinh quyển và có ý nghĩa thực tiễn đối với nông nghiệp và công nghiệp.

1. Dinh dưỡng và biến dưỡng ở vi sinh vật

1.1. Các dạng biến dưỡng ở vi sinh vật

Hình 4.1 tóm tắt các con đường phân hủy dị hóa các chất dinh dưỡng trong tế bào để cung cấp năng lượng cần thiết cho tế bào và các con đường đồng hóa để tổng hợp các thành phần cấu thành của tế bào.

Vi sinh vật được chia thành những nhóm biến dưỡng khác nhau theo thuộc nguồn năng lượng sử dụng. Vi sinh vật quang năng (phototroph) nhận năng lượng từ ánh sáng, vi sinh vật hóa năng (chemotroph) nhận năng lượng từ hợp chất hóa học. Các vi sinh vật hóa năng hữu cơ dùng hợp chất hữu cơ, vi sinh vật hóa năng vô cơ sử dụng hợp chất vô cơ.

1.2. Nhu cầu dinh dưỡng của vi sinh vật

Khi thiết kế môi trường để nuôi cấy một vi sinh vật, cần xem xét thành phần hóa học của tế bào vi sinh vật tương ứng để cung cấp đầy đủ nhu cầu dinh dưỡng của chủng vi sinh vật quan tâm.

Các vi sinh vật dị dưỡng cần được cung cấp hợp chất carbon hữu cơ để làm nguồn C và năng lượng. Nitrogen là thành phần quan trọng của protein và nucleic acid, thường được cung cấp ở dạng NH_3 . Trong khi đó, phosphate thường được cho vào môi trường để làm nguồn phospho cần cho sự sinh tổng hợp nucleic acid và phospholipid; sulfate được dùng làm nguồn sulfur cần cho sự sinh tổng hợp của hai amino acid quan trọng là

cysteine và methionine. Tùy vào khối lượng cần cho tế bào, các chất dinh dưỡng được chia thành nhóm đa lượng (macronutrient) gồm C, H, O, N, P, S, K, Mg, Na, Ca và Fe và nhóm vi lượng (micronutrient) gồm Cr, Co, Cu, Mn, Mo, Ni, Se, W, V và Zn.

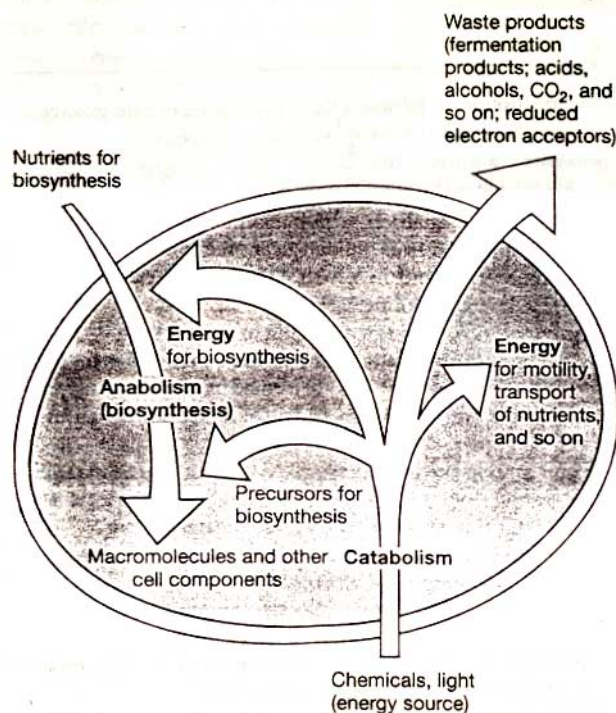


FIGURE 4.1 A simplified view of cell metabolism. Note the coupling between catabolic and anabolic processes.

1.3. Môi trường nuôi cấy

Môi trường nuôi cấy vi sinh vật có thể là hỗn hợp có thành phần đơn giản gồm một vài hợp chất hóa học tinh khiết hoặc có thành phần phức tạp chứa nhiều nhân tố tăng trưởng khác nhau. Nếu thành phần được biết chính xác thì môi trường được gọi là môi trường xác định (defined medium). Tuy nhiên, trong thực tế, môi trường có thể chứa vài amino acid, vitamin và một số monomer khác ở dạng chế phẩm thủy phân thô từ động hoặc thực vật (ví dụ cao thịt, tryptone, peptone), nên thành phần chính xác của môi trường này không thể được xác định. Các môi trường được gọi là môi trường không xác định.

1.4. Năng lượng học tế bào

Tế bào được trang bị các cơ chế thu lấy năng lượng do phản ứng ôxi hóa các hợp chất trong quá trình dị hóa.

Năng lượng được định nghĩa là khả năng tạo ra công. Lượng năng lượng hoặc công được giải phóng được định lượng ở dạng mức độ biến đổi năng lượng tự do (G). Ở một phản ứng giải phóng năng lượng thì biến đổi năng lượng tự do ΔG (được tính bằng cách lấy năng lượng tự do của sản phẩm trừ năng lượng tự do của cơ chất) là âm.

Các phản ứng trong dị hóa có ΔG là âm; ngược lại, các phản ứng sinh tổng hợp có ΔG dương. Trong trường hợp này, tế bào cần sử dụng năng lượng để thực hiện phản ứng theo chiều mong muốn.

1.5. Xúc tác và enzyme

Các phản ứng thuận lợi về nhiệt động học, tức là có ΔG là âm, không phải luôn được xảy ra ngay khi các tác chất được tiếp xúc với nhau. Hầu hết các phản ứng này đều cần có năng lượng hoạt hóa (activation energy) để phá vỡ các liên kết hiện có trong phân tử, để phản ứng diễn ra và các nguyên tử được sắp xếp lại trong phân tử.

Năng lượng hoạt hóa có thể được cung cấp ở dạng nhiệt. Tuy nhiên, dạng năng lượng hoạt hóa này không thích hợp với tế bào sống. Trong tế bào, để phản ứng xảy ra cần có sự tham gia của các enzyme có vai trò xúc tác nhằm làm giảm năng lượng hoạt hóa đến mức mà phản ứng có thể được xảy ra ở nhiệt độ bình thường. Enzyme không bị thay đổi sau phản ứng.

Enzyme là các phân tử protein gắn các tác chất hóa học (được gọi là cơ chất) ở trung tâm hoạt động (active site) có cấu trúc không gian ba bù trừ, bổ sung (như chìa khóa với ổ khóa) với cấu trúc không gian của cơ chất. Do vậy, enzyme có tính chuyên biệt cao đối với cơ chất và phản ứng xúc tác. Sự gắn của cơ chất vào trung tâm hoạt động chủ yếu thông qua các liên kết không cộng hóa trị như liên kết hydrogen và tương tác kỵ nước. Khi cơ chất gắn vào, enzyme thay đổi cấu hình tạo sức căng lên liên kết cộng hóa trị nhất định trong các phân tử cơ chất, làm liên kết này bị phá vỡ.

1.6. Phản ứng ôxi hóa - khử

Phản ứng dị hóa quan trọng nhất để chuyển năng lượng có trong các cơ chất thành năng lượng dùng cho tế bào là các phản ứng ôxi hóa khử (oxidation – reduction reaction).

Sự ôxi hóa một hợp chất được định nghĩa là sự lấy điện tử khỏi một hợp chất. Sự khử một chất được định nghĩa là sự thêm điện tử vào một chất.

Trong các phản ứng ôxi hóa – khử trong tế bào, hầu hết sự ôxi hóa hay khử còn liên quan đến proton H^+ . Ví dụ, một phân tử bị ôxi hóa khi phân tử này bị lấy đi một điện tử hoặc một proton; ngược lại, phân tử sẽ bị khử khi phân tử này nhận vào một electron hoặc proton.

Với định nghĩa như trên, sự ôxi hóa không nhất thiết phải có sự tham gia của ôxi.

1.7. Chất truyền điện tử (electron carrier)

Trong một phản ứng ôxi hóa khử, điện tử được cho từ một hợp chất (hợp chất này bị ôxi hóa, hay còn được gọi là chất cho điện tử – electron donor) và được nhận bởi một hợp chất (hợp chất này bị khử, hay còn gọi là chất nhận điện tử – electron acceptor). Do vậy mỗi phản ứng ôxi hóa khử có thể được chia thành hai bán phản ứng là: (1) bán phản ứng ôxi hóa, mô tả sự lấy điện tử khỏi hợp chất cho (hợp chất bị ôxi hóa) và (2) bán phản ứng khử, mô tả sự thêm điện tử vào chất nhận (Fig. 4.6).

Các hợp chất khác nhau ở khuynh hướng cho hay nhận điện tử. Khuynh hướng này của hợp chất được đặc trưng bằng thế khử E_o (reduction potential E_o). Fig. 4.7 trình bày thứ tự các hợp chất ôxi hóa khử theo thế khử từ thấp (âm) đến cao (dương) được sử

dụng trong hệ thống sinh học. Điện tử sẽ được chuyển từ hợp chất có thế khử thấp sang hợp chất có thế khử cao hơn. Do vậy, trình tự sắp xếp này được gọi là tháp điện tử (electron tower) (Fig. 4.7).

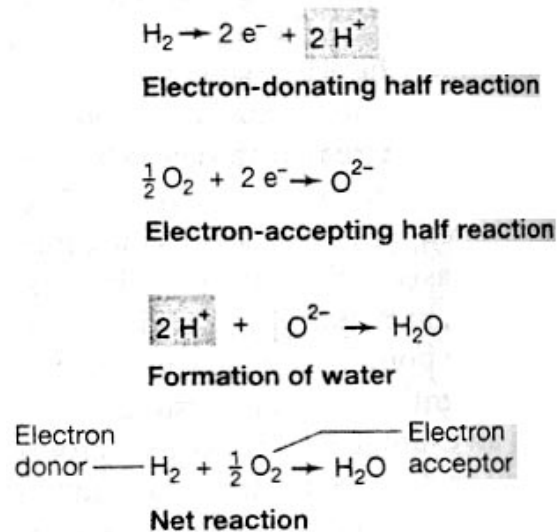


Fig. 4.6 Hai thành phần của phản ứng ôxi hóa khử H_2 và O_2 thành H_2O .

Như vậy, thế khử của các hợp chất cho chúng ta biết các hợp chất nào có thể phản ứng được với nhau và điện tử được chuyển theo chiều nào. Một hợp chất có thế khử càng nhỏ hay càng âm thì khuynh hướng cho điện tử càng mạnh (dễ trở thành chất cho điện tử). Hợp chất này có thể cho điện tử cho hợp chất có thế khử cao hơn.

1.8. Hợp chất chứa năng lượng cao và sự lưu trữ năng lượng

Mức độ khác biệt giữa thế khử của hai bán phản ứng quyết định số lượng năng lượng được giải phóng trong phản ứng ôxi hóa khử. Năng lượng này được tế bào giữ lại để dùng cho các phản ứng sinh tổng hợp. Dạng hợp chất hóa học chứa năng lượng phổ biến nhất trong tế bào là ATP (adenosine triphosphate). ATP chứa hai liên kết phosphate năng lượng cao. Sự thủy phân một trong hai liên kết này sẽ phóng thích một số lượng lớn năng lượng tự do.

Nhiều phản ứng ôxi hóa khử có sự tham gia của các enzyme trong tế bào chất. Trong trường hợp này, các coenzyme như NAD hoặc NADP đóng vai trò là các chất mang điện tử trung gian (intermediate electron carrier) bằng cách nhận điện tử từ một cơ chất trong một phản ứng enzyme và sau đó chuyển điện tử cho các phân tử khác trong các phản ứng enzyme khác nhau (Fig. 4.9).

Hô hấp (respiration) và lên men (fermentation) là hai phương thức biến dưỡng thu năng lượng của các vi sinh vật dị dưỡng hoá năng từ hợp chất C hữu cơ. Trong sự hô hấp, một phân tử ở ngoài môi trường như O_2 , NO_3^+ ... được dùng làm chất nhận điện tử cuối cùng. Trong sự lên men, một chất hữu cơ bị ôxi hóa và một sản phẩm hữu cơ trung gian bị khử để cân bằng phản ứng ôxi hóa khử.

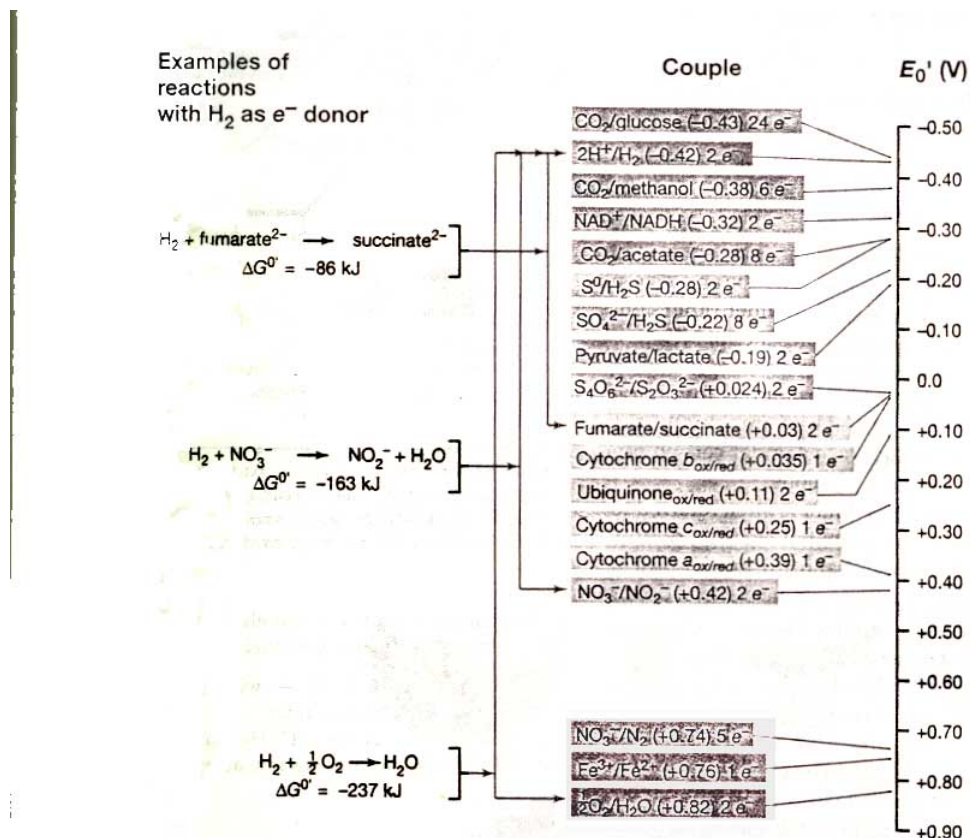


FIGURE 4.7 The electron tower. Redox couples are arranged from the strongest reductants (negative reduction potential) at the top to the strongest oxidants (positive reduction potentials) at the bottom. As electrons are donated from the top of the tower, they can be "caught" by acceptors at various levels. The farther the electrons fall before they are caught, the greater the difference in reduction potential between electron donor and electron acceptor and the more energy is released. As an example of this, on the left is shown the differences in energy released when a single electron donor, H_2 , reacts with any of three different electron acceptors, fumarate, nitrate, and oxygen. The E_0' of the $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ couple is highly pH dependent. At acid pH, the E_0' is +0.76V but at neutral pH, the E_0' is substantially less positive, about +0.2V.

Trong lên men, chất hữu cơ là nguồn năng lượng không thể bị ôxi hóa hoàn toàn nên chỉ một phần của năng lượng trong các liên kết hóa học của hợp chất hữu cơ được phóng thích. Sự sinh tổng hợp của ATP trong phương thức lên men diễn ra theo cơ chế phosphoryl hóa mức cơ chất (substrate level phosphorylation), trong đó một liên kết phosphate năng lượng cao từ một hợp chất hữu cơ được chuyển thẳng qua ADP để tạo thành ATP (Fig. 4.11).

1.9. Lên men: con đường Embden – Meyerhof (đường phân)

Đường phân (glycolysis), tức là con đường Embden – Meyerhof (Embden – Meyerhof pathway), là con đường chung để dị dưỡng glucose trong lên men. Trong con đường này, trước tiên, glucose được hoạt hóa cần ATP, sau đó bị ôxi hóa. Điện tử được chuyển cho NAD và xảy ra sự phosphoryl hóa mức cơ chất. Lượng ATP tạo ra trong phương thức lên men thấp: chỉ 2 – 4 phân tử ATP từ một phân tử glucose. Sản phẩm cuối của con đường đường phân như pyruvate hay một dẫn xuất biến dưỡng từ pyruvate sẽ trở thành chất nhận điện tử từ NADH để tái tạo lại NAD. Bước này rất quan trọng vì tế bào chỉ có một số lượng nhỏ NAD dùng làm chất nhận điện tử trung gian. Sản phẩm cuối cùng của sự lên men rất khác nhau tùy vi sinh vật. Nhiều sản phẩm này có giá trị thương mại (Fig. 4.12).

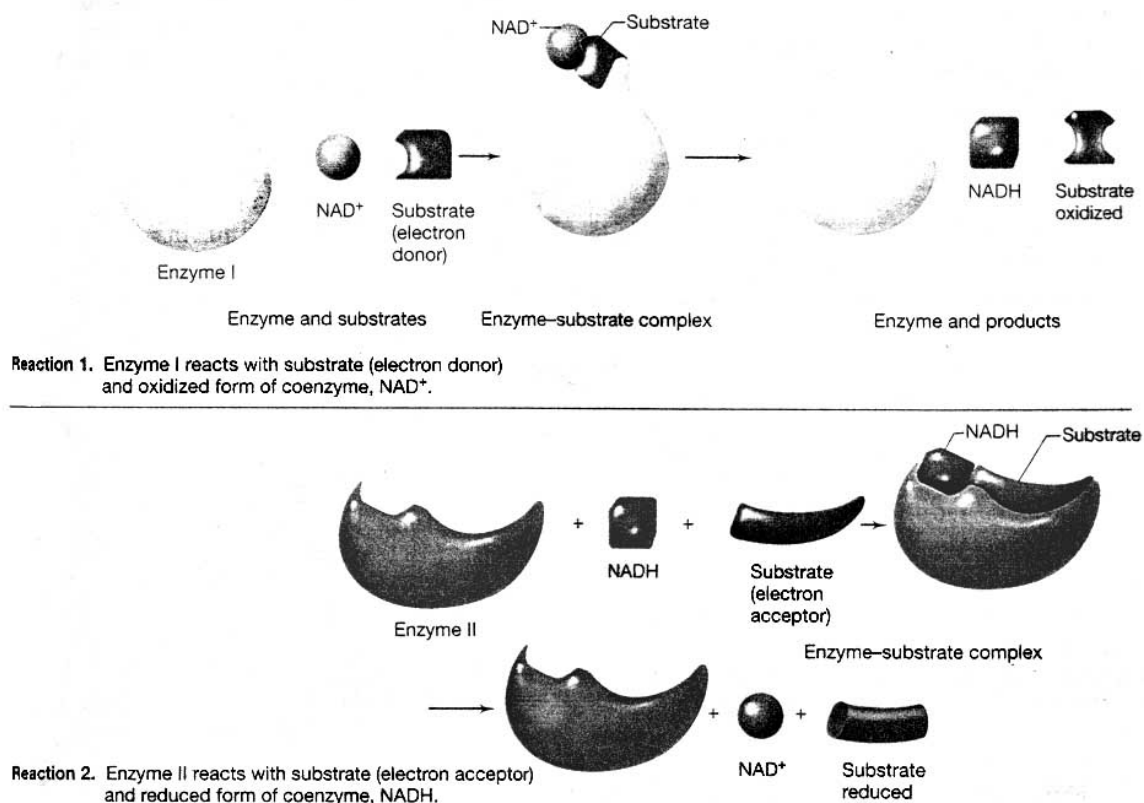
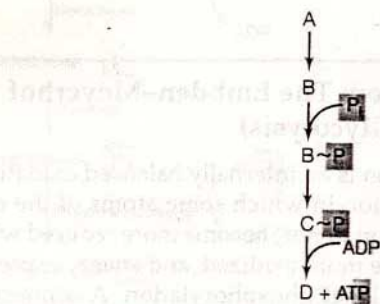
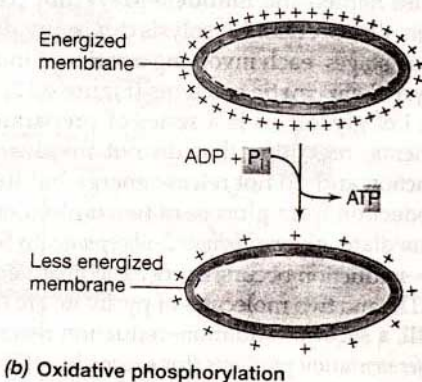


FIGURE 4.9 Schematic example of an oxidation-reduction reaction involving the oxidized and reduced forms of the coenzyme nicotinamide-adenine dinucleotide, NAD^+ and NADH.



(a) Substrate-level phosphorylation



(b) Oxidative phosphorylation

FIGURE 4.11 Energy conservation in fermentation and respiration. (a) In fermentation, ATP synthesis occurs as a result of *substrate-level phosphorylation*; a phosphate group gets added to some intermediate in the biochemical pathway and eventually gets transferred to ADP to form ATP. (b) In respiration, the cytoplasmic membrane, energized by the proton motive force, dissipates some of that energy in the formation of ATP from ADP and inorganic phosphate (P_i) in the process called *oxidative phosphorylation*. The coupling of the proton motive force to ATP synthesis occurs by way of a membrane protein complex called ATP synthase (ATPase) (see Section 4.11 and Figure 4.19).

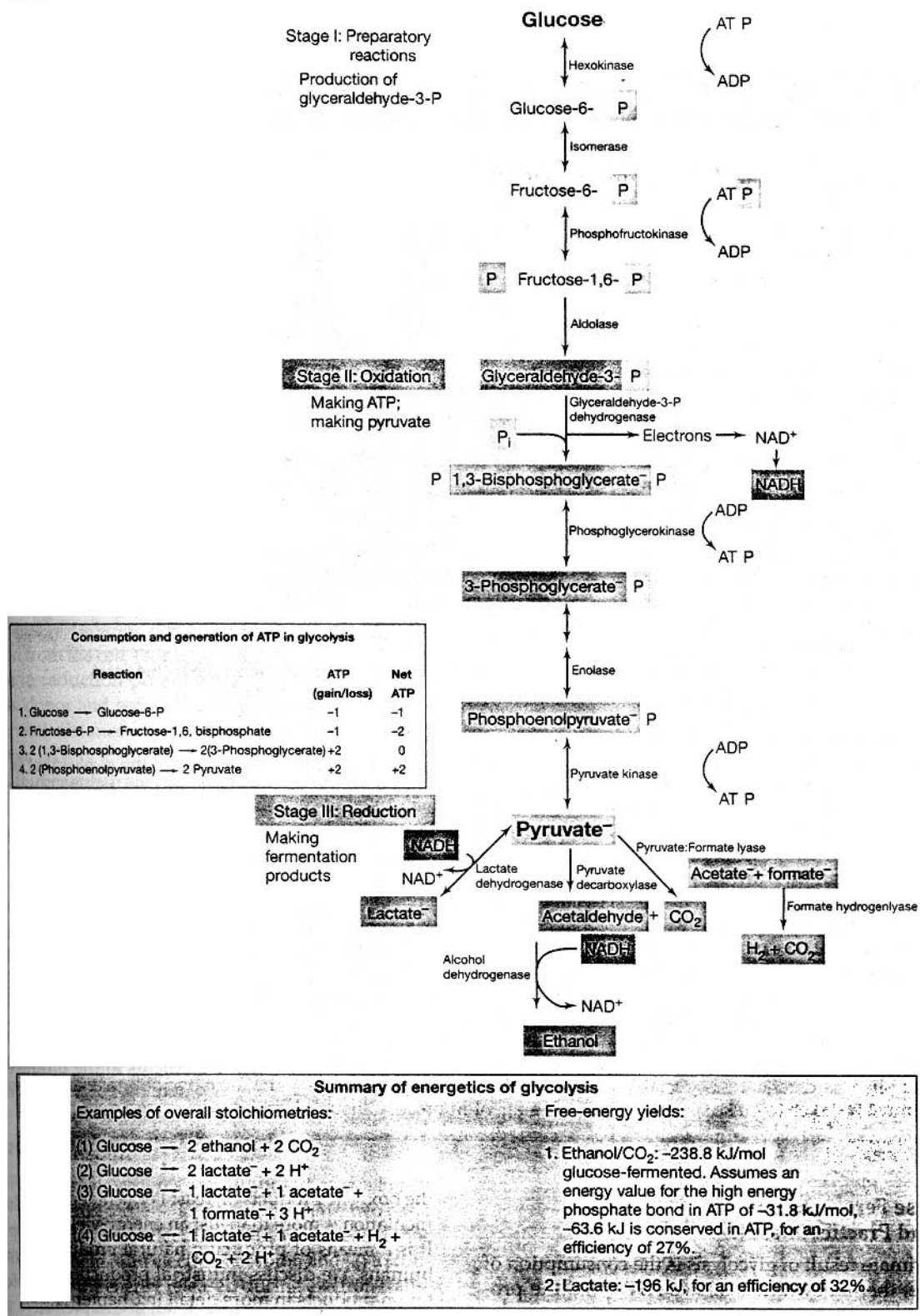


Fig. 4.12 Embden-Meyerhof pathway (glycolysis)

1.10. Hô hấp và chuỗi truyền điện tử

Năng lượng có thể thu được từ phương thức hô hấp là lớn hơn so với phương thức lên men do C hữu cơ bị ôxi hóa hoàn toàn thành CO_2 và lượng năng lượng được phóng thích khi điện tử được chuyển đến chất nhận điện tử sau cùng khá lớn. Trong phương thức này, các phản ứng sinh hóa ban đầu để biến dưỡng glucose là tương tự như phương thức đường phân. Sau đó, pyruvate được biến dưỡng trong chu trình tricarboxylic acid (tricarboxylic acid cycle, TCA cycle) thành CO_2 và điện tử được chuyển đến NAD. Nhiều phân tử NADH được tạo ra bởi phản ứng này và cần được ôxi hóa để phục vụ biến dưỡng (Fig. 4.20). Trong hô hấp, các phản ứng được thực hiện bằng chuỗi truyền điện tử (electron transport) trên màng (Fig. 4.17). Đây là tập hợp các chất mang điện tử trung gian như flavoprotein, cytochrome, quinone được sắp xếp một cách đặc biệt trong màng tế bào chất sao cho điện tử và proton được truyền từ chất mang này sang chất mang kia.

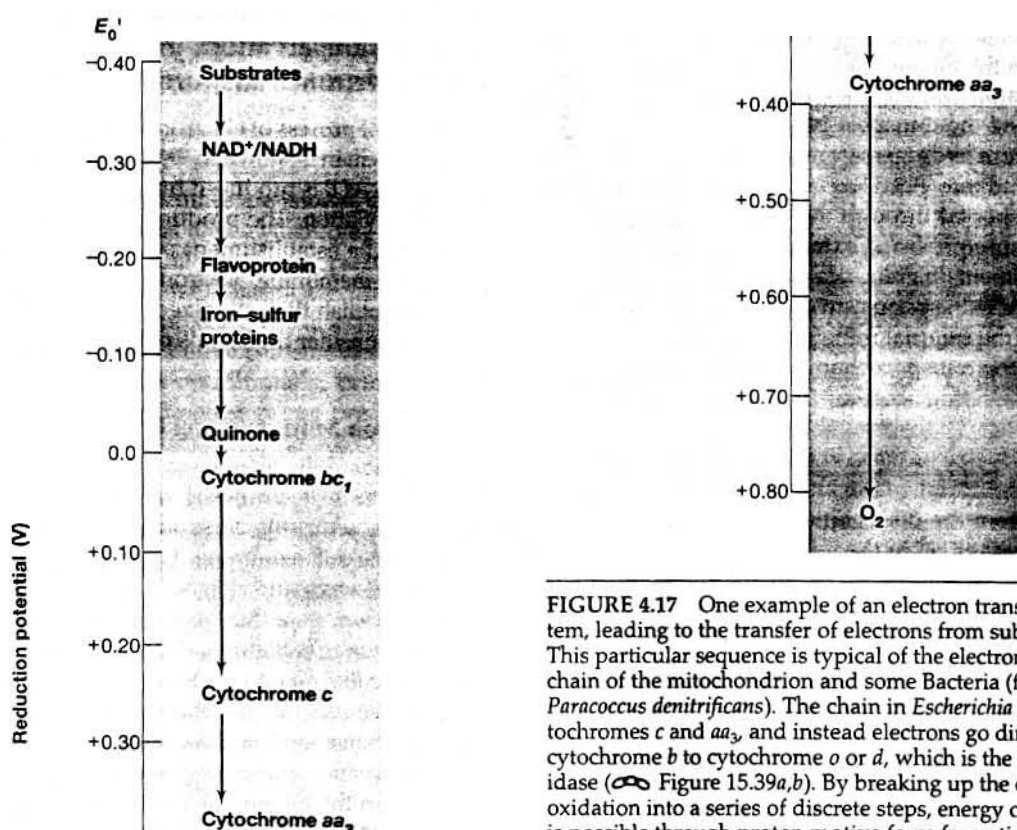


FIGURE 4.17 One example of an electron transport system, leading to the transfer of electrons from substrate to O_2 . This particular sequence is typical of the electron transport chain of the mitochondrion and some Bacteria (for example, *Paracoccus denitrificans*). The chain in *Escherichia coli* lacks cytochromes *c* and *aa₃*, and instead electrons go directly from cytochrome *b* to cytochrome *o* or *d*, which is the terminal oxidase (see Figure 15.39a,b). By breaking up the complete oxidation into a series of discrete steps, energy conservation is possible through proton motive force formation leading to ATP synthesis. Compare color-coding here with those in Figure 4.7.

1.11. Động lực proton và sự lưu trữ năng lượng từ chuỗi truyền điện tử

Trong một số bước của chuỗi truyền điện tử (trường hợp chất mang là flavoprotein và quinone), các proton được đẩy ra bên ngoài màng tế bào và điện tử thì quay vào trở lại tế bào chất. Hệ quả là một gradient proton được hình thành với bên ngoài màng có pH thấp hơn và nhiều điện tích dương hơn (Fig. 4.18). Đây là trạng thái được tích năng lượng của màng, được gọi là động lực proton (proton motive force) có thể

tạo một công hữu ích. Sự cho qua có kiểm soát các proton qua màng thông qua các protein màng đặc biệt được dùng để vận chuyển ion, quay tiêm mao, tổng hợp ATP. Sự tổng hợp ATP trong trường hợp này cần có sự tham gia của một ATPase (Fig. 4.19). Cơ chế tạo ATP thông qua việc tạo thành một động lực proton và chuỗi truyền điện tử được gọi là phosphoryl hóa ôxi hóa (oxidative phosphorylation).

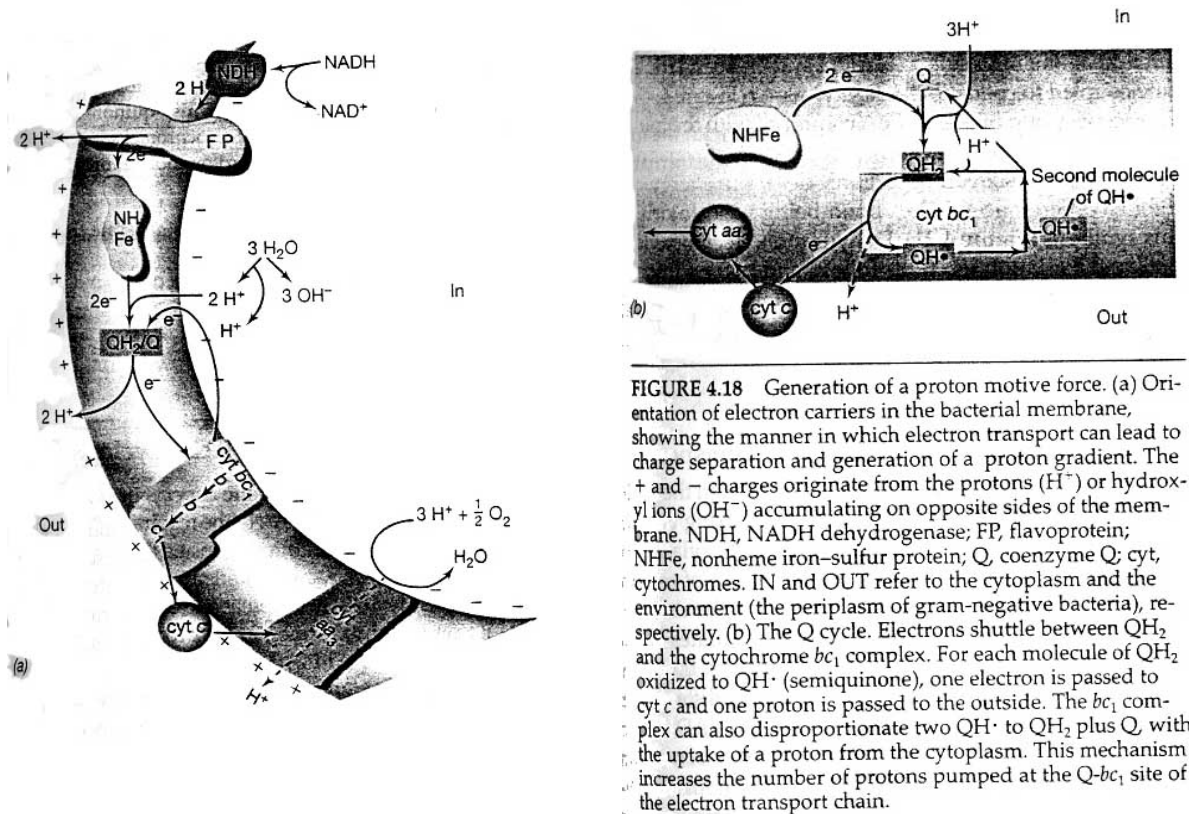


FIGURE 4.18 Generation of a proton motive force. (a) Orientation of electron carriers in the bacterial membrane, showing the manner in which electron transport can lead to charge separation and generation of a proton gradient. The + and - charges originate from the protons (H⁺) or hydroxyl ions (OH⁻) accumulating on opposite sides of the membrane. NDH, NADH dehydrogenase; FP, flavoprotein; NHFe, nonheme iron-sulfur protein; Q, coenzyme Q; cyt, cytochromes. IN and OUT refer to the cytoplasm and the environment (the periplasm of gram-negative bacteria), respectively. (b) The Q cycle. Electrons shuttle between QH₂ and the cytochrome bc₁ complex. For each molecule of QH₂ oxidized to QH• (semiquinone), one electron is passed to cyt c and one proton is passed to the outside. The bc₁ complex can also disproportionate two QH• to QH₂ plus Q, with the uptake of a proton from the cytoplasm. This mechanism increases the number of protons pumped at the Q-bc₁ site of the electron transport chain.

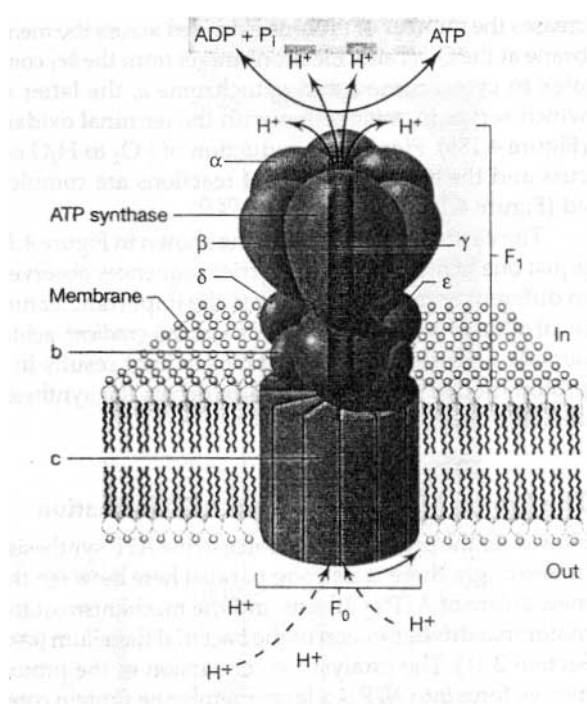


FIGURE 4.19 Structure and function of the membrane-associated ATP synthase (ATPase), which functions as a proton channel between the cytoplasm and the cell exterior (environment). F₁ consists of five polypeptides, α (three copies), β (three copies), γ, δ, and ε. This is the catalytic protein complex responsible for the interconversion of ATP and ADP + P_i. F₀ is integrated in the membrane and consists of three polypeptides, a, b (two copies), and c (four copies). It is responsible for channeling protons across the membrane. As protons enter, the dissipation of the proton motive force drives ATP synthesis from ADP + P_i. The reverse reaction, ATP → ADP + P_i, drives the extrusion of protons to the cell exterior. Thus, ATP synthase is reversible in its action.

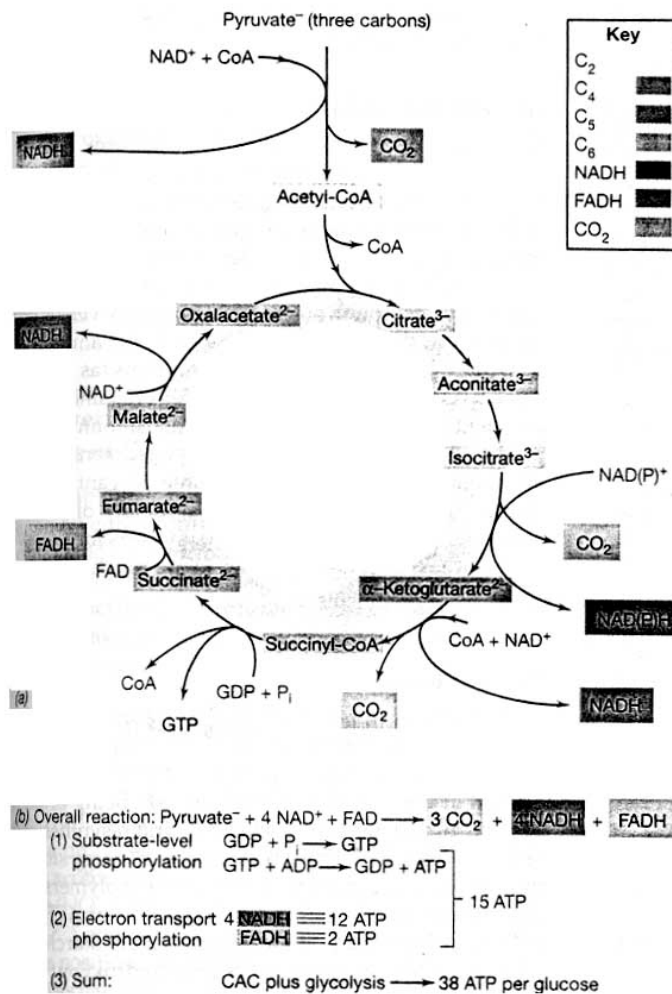


FIGURE 4.20 The citric acid cycle (CAC). The three-carbon compound pyruvate is oxidized to CO₂ with the electrons used to make NADH and FADH. The reoxidation of NADH and FADH in the electron transport chain leads to the generation of a proton motive force and thus to the synthesis of ATP. The CAC begins when the two-carbon compound acetyl-CoA condenses with the four-carbon compound oxalacetate to form the six-carbon compound citrate. Through a series of oxidations and transformations, this six-carbon compound is ultimately converted back to the four-carbon compound oxalacetate, which then begins another cycle with addition of the next molecule of acetyl-CoA. (b) The overall balance sheet of fuel (NADH/FADH) for the electron transport chain and CO₂ generated in the CAC.

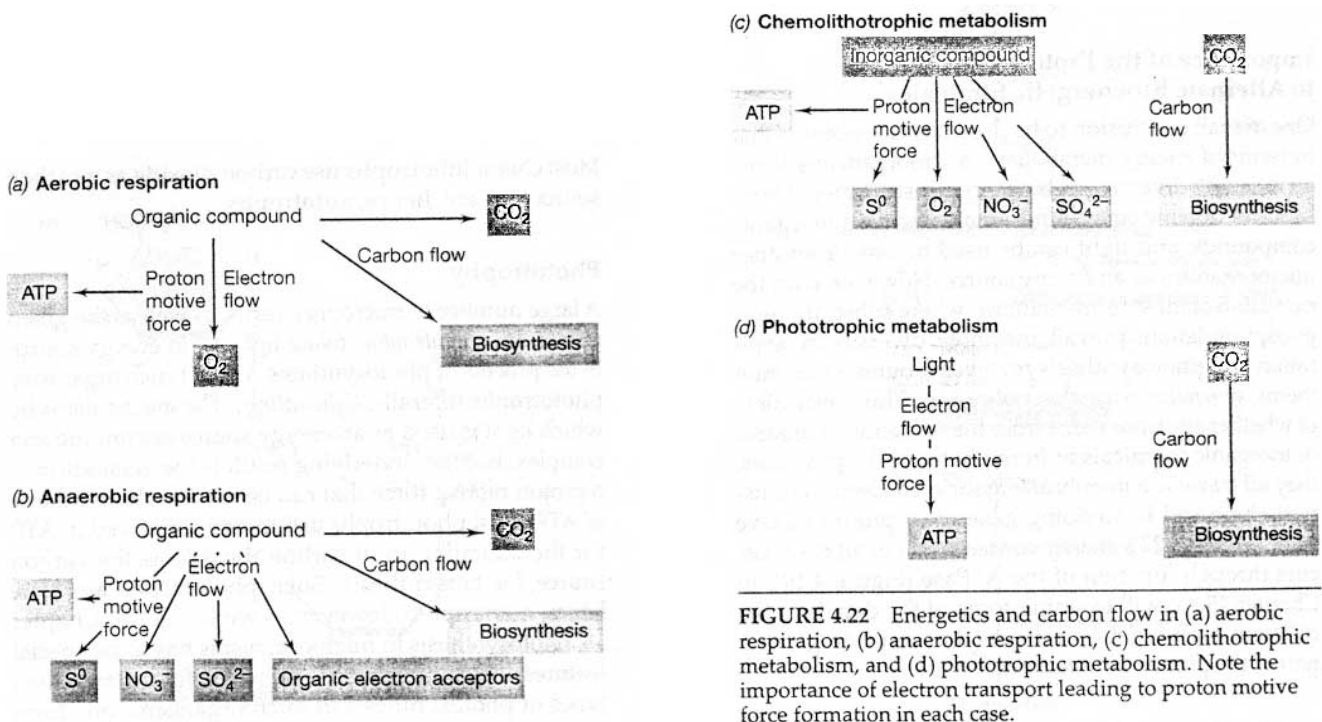


FIGURE 4.22 Energetics and carbon flow in (a) aerobic respiration, (b) anaerobic respiration, (c) chemolithotrophic metabolism, and (d) phototrophic metabolism. Note the importance of electron transport leading to proton motive force formation in each case.

Như vậy, trong hô hấp hiếu khí, NADH bị ôxi hóa bằng chuỗi truyền điện tử. Ngoài ra, năng lượng tạo thành từ sự truyền điện tử từ NADH bị khử đến O_2 là đủ để tổng hợp 3 ATP. Về lý thuyết, từ một phân tử glucose có thể tạo thành 38 phân tử ATP, chủ yếu bằng phosphoryl hóa ôxi hóa. Như vậy, hô hấp hiếu khí cho phép tạo ra năng lượng nhiều hơn so với lên men. Tuy nhiên, hiệu quả của phản ứng lên men có thể khá cao. Vận tốc tổng hợp và phân hủy của ATP là khá cao trong tế bào vì phân tử này mang năng lượng cao và không thật bền. ATP không phải là phân tử lưu trữ năng lượng mà chỉ phục vụ cho năng lượng xúc tác. Để lưu trữ năng lượng dài hạn, hầu hết tế bào sẽ tích lũy năng lượng dưới dạng các polymer của glucose (như tinh bột hoặc glycogen) hoặc là dạng polyhydroxybutyrate, polyhydroxyalkanoate.

1.12. Các phương thức tạo năng lượng khác

Sự hô hấp không nhất thiết cần O_2 làm chất nhận điện tử cuối cùng. Khi không có ôxi, nhiều vi sinh vật có thể dùng nitrate, sulfate, carbonate làm chất nhận điện tử cuối cùng (Fig. 4.22). Trong trường hợp này, các quá trình này được gọi là hô hấp kỵ khí (anaerobic respiration). Ngoài ra, một số vi khuẩn không sử dụng hợp chất hữu cơ làm nguồn năng lượng. Các hợp chất vô cơ khử bị ôxi hóa bởi các vi sinh vật hóa năng vô cơ (chemolithotroph) để thu năng lượng và các vi sinh vật quang năng (prototroph) sẽ thu năng lượng ánh sáng để tạo động lực proton và tổng hợp ATP.

1.13. Đồng hóa và sinh tổng hợp các đơn phân

Mặc dù vi sinh vật khác nhau nhiều về các phản ứng dị hóa, nhưng các phản ứng sinh tổng hợp (đồng hóa) của chúng là cực kỳ giống nhau. Sự sinh tổng hợp cần năng lượng được cung cấp bởi ATP, động lực proton (Fig. 4.23) và khung carbon. Khung carbon cũng được cung cấp bởi các con đường dị hóa, đặc biệt là đường phân và chu trình TCA.

- Các phân tử đường được sử dụng để sinh tổng hợp vách tế bào, polysaccharide, nucleic acid. Đường có thể được cung cấp từ môi trường bên ngoài hoặc được tổng hợp bên trong tế bào. Sự tổng hợp glucose từ nguyên liệu không phải là carbohydrate được gọi là gluconeogenesis. Điểm khởi đầu của quá trình này là phosphoenolpyruvate được tạo thành từ chu trình TCA. Hai chất trung gian then chốt là glucose-6-phosphate (một chất biến dưỡng trong đường phân) và UDP-glucose là một tiền chất của sự sinh tổng hợp polysaccharide. Do vậy, glucose-6-phosphate là chất trung gian trung tâm trong dị hóa glucose và UDP-glucose là chất trung gian trung tâm trong đồng hóa glucose.

- Hai mươi amino acid có thể được chia thành 5 nhóm dựa vào tiền chất của chúng. Mỗi nhóm có con đường sinh tổng chung để tạo thành tiền chất tương ứng (Fig. 4.25). Nitrogen được đưa vào hầu hết các amino acid bởi các phản ứng chuyển amin (transamination), trong đó nhóm amine được cho bởi glutamate. Tế bào làm đầy dự trữ glutamate bằng NH_3 bên ngoài được đưa vào thông qua enzyme glutamate dehydrogenase.

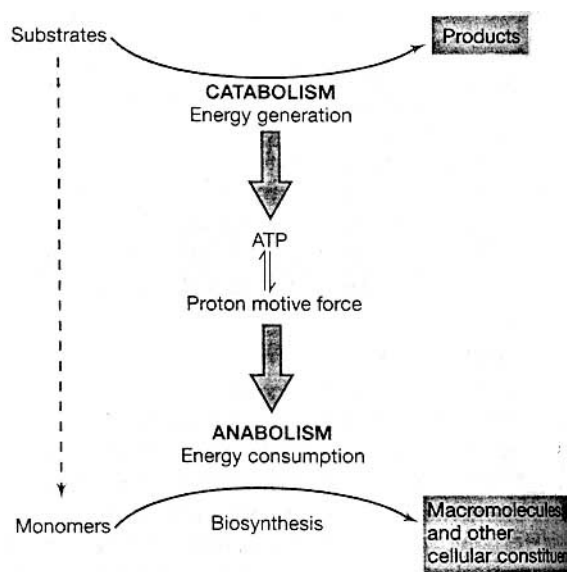


FIGURE 4.23 Scheme of anabolism and catabolism showing the key role of ATP and the proton motive force in integrating the processes. Monomers can come preformed as nutrients from the environment or from catabolic pathways like glycolysis and the citric acid cycle.

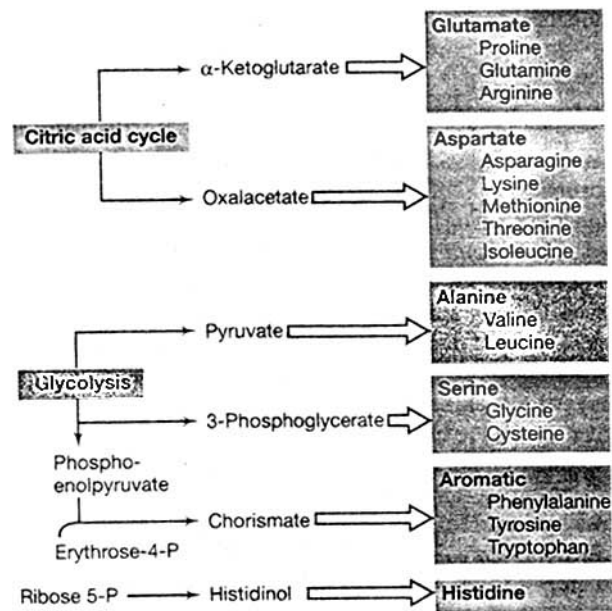


FIGURE 4.25 Amino acid families. Note how the carbon skeletons for most amino acids are derived from either the citric acid cycle or from glycolysis. Synthesis of the various amino acids in a family frequently requires many separate enzymatically catalyzed steps starting from the parent amino acid (shown in bold).

- Sự sinh tổng hợp các base nitric trong nucleic acid là các quá trình phức tạp và có sự khác nhau giữa sinh tổng hợp purine và pyrimidine. Purine được tổng hợp bằng cách thêm từng nguyên tử vào khung đường-phosphate. Ngược lại, vòng pyrimidine (orotic acid) được tổng hợp trước khi gắn đường vào.

- Acid béo là thành phần quan trọng của lipid và là chất cho điện tử cho nhiều vi sinh vật hóa năng hữu cơ. Acid béo được tổng hợp bằng cách thêm dần các phân tử acetyl-CoA để tạo thành mạch dài. Sự thêm liên kết đôi vào acid béo bão hòa để tạo thành acid béo không bão hòa có thể được thực hiện bởi một phản ứng cần O_2 (ở vi khuẩn hiếu khí) hoặc bởi sự loại nước từ hydroxyl fatty acid (ở vi khuẩn kỵ khí).

2. Tăng trưởng ở vi sinh vật

Mặc dù các phản ứng sinh tổng hợp được thực hiện trong từng tế bào riêng biệt nhưng do tế bào vi sinh vật có kích thước nhỏ nên các nghiên cứu về tăng trưởng phải được thực hiện trên quần thể các tế bào. Sự tăng về kích thước tế bào sẽ dẫn đến sự hình thành tế bào mới bằng cách phân đôi. Do vậy, sự tăng trưởng có thể được khảo sát bằng cách giám sát số lượng hoặc sinh khối tế bào trong quần thể.

2.1. Tăng trưởng của quần thể vi sinh vật

Khi một tế bào phân đôi thành hai, mỗi tế bào mới lại thực hiện sự sinh tổng hợp các vật liệu cần cho tế bào (Fig. 5.1). Như vậy, số lượng tế bào sẽ tăng theo thời gian và sinh khối sẽ được tổng hợp với vận tốc tăng dần khi quần thể tăng trưởng. Các tế bào tăng trưởng với vận tốc không đổi nhưng số lượng tế bào tăng lên nhiều. Sự tăng trưởng này được gọi là tăng trưởng hàm mũ (exponential growth) và được biểu diễn bằng

phương trình: $N = N_0 2^n$, trong đó N là số tế bào của quần thể ở thời điểm cuối cùng, N_0 là số tế bào của quần thể ở thời điểm bắt đầu và n là số thế hệ (generation), tức là số lần tế bào phân đôi. Thời gian giữa hai lần phân đôi được gọi là thời gian thế hệ (generation time) được biểu diễn là t/n trong đó t là tổng thời gian và n là số thế hệ. Biến thiên của số lượng tế bào theo thời gian có thể biểu diễn bằng đồ thị tương quan giữa hàm logarithm của số tế bào theo thời gian nuôi.

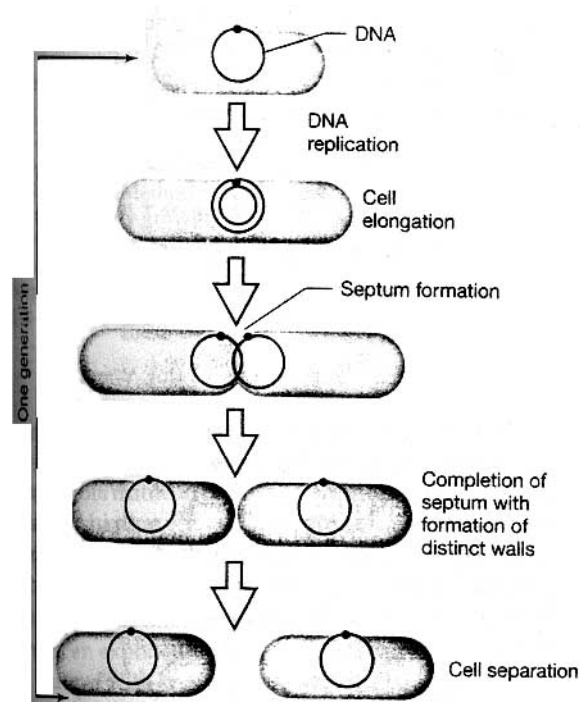


Fig. 5.1 Sự phân đôi ở vi khuẩn hình que

2.2. Đo đạc sự tăng trưởng

Sự tăng trưởng của một quần thể có thể được theo dõi bằng cách xác định số lượng tế bào hoặc tổng sinh khối bằng nhiều phương pháp khác nhau. Tuy nhiên không có phương pháp nào là hoàn hảo. Sự lựa chọn phương pháp thích hợp sẽ phụ thuộc vào tình huống cụ thể.

Số lượng tế bào có thể được xác định bằng cách đếm trực tiếp bằng kính hiển vi hoặc bằng cách đếm số tế bào sống. Phương pháp đếm trực tiếp bằng kính hiển vi không cho phép phân biệt giữa tế bào sống và tế bào chết. Hơn nữa, để có thể đếm được, cần có mật độ tế bào trên $10^6/\text{ml}$. Ngược lại, phương pháp đếm tế bào sống có thể đếm được số lượng tế bào rất thấp, nhưng cần phải biết cần cho lượng mẫu bao nhiêu lên bề mặt môi trường rắn. Phương pháp này chỉ phát hiện những tế bào sống có khả năng hình thành khuẩn lạc trên một môi trường dinh dưỡng rắn thích hợp. Do vậy phương pháp này còn được gọi là phương pháp đếm khuẩn lạc. Phương pháp đếm khuẩn lạc có thể được thực hiện bằng kỹ thuật hộp trải (spread plate) hay hộp đổ (pour plate). Cơ sở của phương pháp đếm khuẩn lạc là cho các tế bào tách biệt nhau lên bề mặt môi trường rắn sao cho mỗi tế bào có thể phân chia, tăng trưởng thành sinh khối là một khuẩn lạc có thể

thấy được bằng mắt thường. Điều kiện này chỉ đạt được khi lượng mẫu được đưa lên bề mặt môi trường không quá nhiều để các tế bào không tách biệt được nhau. Mặt khác, nếu mẫu chứa quá ít tế bào, thì số liệu thu được sẽ không chính xác. Thông thường, mẫu cần được pha loãng thích hợp sao cho mỗi hộp cho sự xuất hiện từ 30 – 300 khuẩn lạc.

Tổng sinh khối có thể được theo dõi bằng cách cân khối lượng sinh khối. Trong thực tế, cần sấy khô mẫu để loại nước. Phương pháp này cần một lượng lớn tế bào để có được số liệu cân chính xác. Một phương pháp đơn giản, nhanh và thuận tiện để xác định sinh khối và số lượng tế bào là đo độ đục. Tế bào làm phát tán ánh sáng và lượng ánh sáng phát tán tỷ lệ với mật độ tế bào.

2.3. Chu kỳ tăng trưởng của quần thể vi sinh vật

Khi vi khuẩn được cấy vào bình nuôi có chứa một lượng chất dinh dưỡng nhất định (nuôi cấy mẻ, batch culture), sự tăng trưởng của chủng sẽ diễn ra theo một chu kỳ gồm các pha đặc trưng (Fig. 5.4).

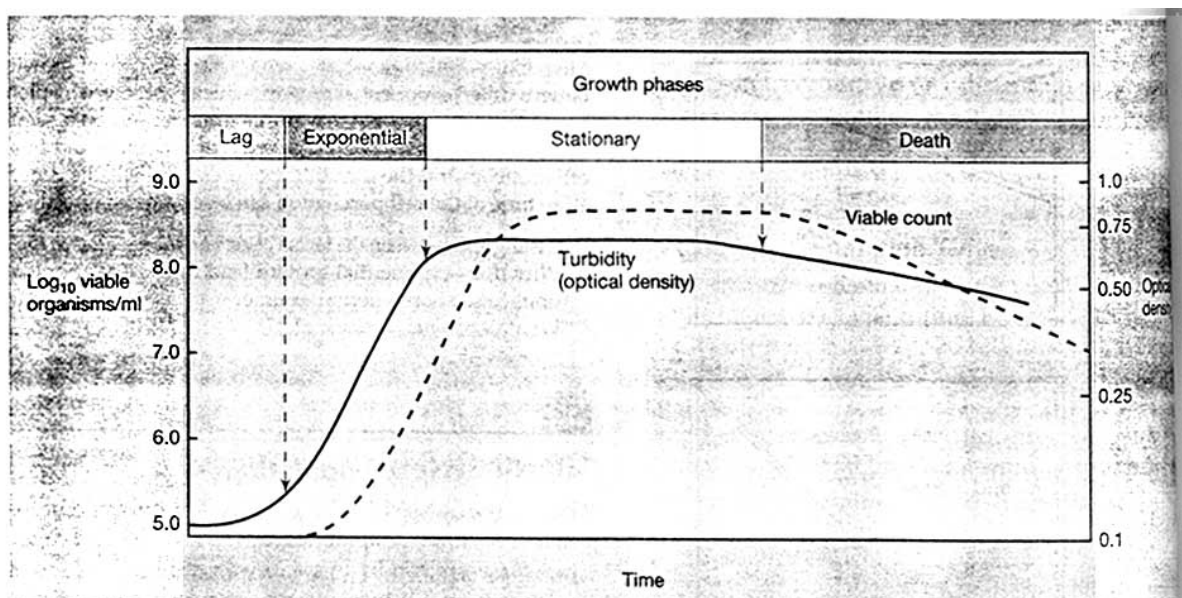


FIGURE 5.4 Typical growth curve for a bacterial population. See Section 5.4 for a description of the counting methods employed.

Trong pha lag hay pha tiềm tàng (lag phase), tế bào tiến hành tổng hợp các enzyme cần thiết để sử dụng chất dinh dưỡng và tăng trưởng được trên một môi trường nhất định. Do vậy, pha này thường rất dài nếu giống được cấy vào là những tế bào đang ở trạng thái không tăng trưởng hoặc đã được nuôi từ một môi trường có thành phần rất khác biệt so với môi trường được cấy vào.

Pha hàm mũ (exponential phase) là giai đoạn tăng trưởng của giống trong môi trường mới. Trong pha này, tế bào phân đôi và số lượng tế bào trong quần thể được tăng theo hàm mũ. Pha này không thể được duy trì dài vô hạn trong điều kiện nuôi cấy mẻ.

Đến một thời điểm nhất định trong quá trình nuôi cấy, một chất dinh dưỡng nhất định có thể bị cạn kiệt hoặc một chất biến dưỡng có độc tính nhất định có thể được tích tụ đến nồng độ ức chế tăng trưởng của tế bào. Khi đó sự tăng trưởng sẽ dừng lại và mật

độ tế bào trong quần thể sẽ bão hòa, quần thể đi vào pha ổn định (stationary phase). Trong pha này, tế bào vẫn tiếp tục biến dưỡng và bắt đầu tạo ra các chất biến dưỡng thứ cấp (secondary metabolite), trong đó có nhiều chất có giá trị công nghiệp.

Sau một thời gian nhất định của pha ổn định, tế bào trong quần thể có thể xảy ra tự phân (autolysis) làm giảm số tế bào sống hiện diện trong quần thể. Thời kỳ này của quần thể được gọi là pha chết hay pha suy tàn (death phase).

Các pha nêu trên là đặc trưng tăng trưởng của quần thể tế bào vi sinh vật, không áp dụng cho từng tế bào riêng lẻ.

2.4. Nuôi cấy liên tục (continuous culture)

Nuôi cấy liên tục là một phương thức nuôi cấy trong đó môi trường mới được bổ sung liên tục vào hệ thống cũng như dịch nuôi cấy được rút ra sao cho dung tích của hệ thống giữ nguyên không đổi. Thời gian cần để bổ sung thay mới 100% môi trường trong hệ thống gọi là tốc độ pha loãng (dilution rate). Trong hệ thống này, pha tăng trưởng hàm mũ sẽ được kéo dài. Ngoài ra, hệ thống còn có đặc điểm là đạt trạng thái ổn định (steady state) trong đó nồng độ của chất dinh dưỡng giới hạn và số lượng tế bào không thay đổi theo thời gian. Do vậy, hệ thống dùng để nuôi cấy trong trường hợp này được gọi là hệ ổn hóa (chemostat) (Fig. 5.9).

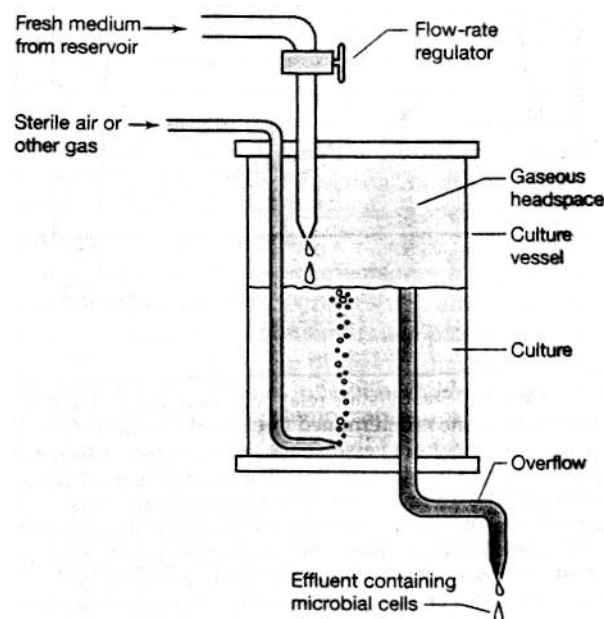


Fig. 5.9 Sơ đồ của hệ thống nuôi cấy liên tục (hệ ổn hóa, chemostat)

Trong nuôi cấy liên tục, có thể điều tiết, kiểm soát chất dinh dưỡng giới hạn tăng trưởng bằng cách điều chỉnh thành phần của môi trường dòng vào sao cho một chất dinh dưỡng nhất định có nồng độ tương đối thấp. Tốc độ tăng trưởng của tế bào trong môi trường được quyết định bởi vận tốc môi trường được bơm vào hệ thống. Mật độ tế bào ở trạng thái ổn định được quyết định bởi hàm lượng của chất dinh dưỡng giới hạn trong môi trường dòng vào, chỉ như vậy nhiều sinh khối mới có thể được tạo thành từ số lượng nhất định của một chất dinh dưỡng. Khi môi trường được cung cấp nhiều hơn, tế bào sẽ

tăng trưởng nhanh hơn vì chất dinh dưỡng giới hạn được cung cấp nhanh hơn. Tuy nhiên mật độ tế bào không thay đổi vì dịch nuôi cấy cũng được rút ra khỏi hệ thống nhanh hơn (Fig. 5.10, 5.11).

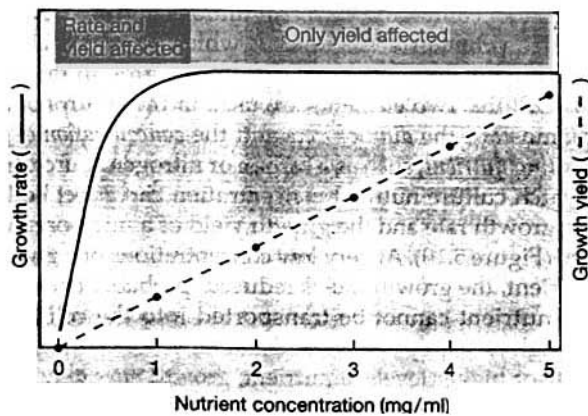


FIGURE 5.10 Relationship among nutrient concentration, growth rate (solid line), and growth yield (dashed line) in a batch culture (closed system). At low nutrient concentrations both growth rate and growth yield are affected.

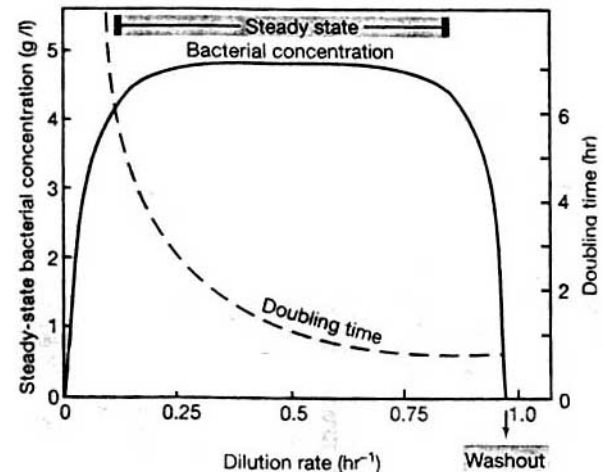


Fig. 5.11 Steady-state relationships in the chemostat

Trong pha tăng trưởng hàm mũ ở nuôi cấy mẻ cũng như nuôi cấy liên tục, tăng trưởng của quần thể được cân bằng. Tức là khi một tế bào phân đôi thì số lượng mỗi thành phần của tế bào cũng tăng đôi. Tuy nhiên, thành phần của tế bào lại thay đổi theo điều kiện của môi trường. Do vậy, nếu một dịch nuôi cấy mẻ được chuyển sang một môi trường mới hoặc nếu vận tốc pha loãng của một hệ thống nuôi cấy liên tục bị thay đổi, thì sự tăng trưởng sẽ trở nên không cân bằng và tế bào sẽ điều chỉnh thành phần các đại phân tử trong tế bào. Trong các trường hợp này người ta ghi nhận sự thay đổi trong tốc độ sinh tổng hợp RNA ribosome do vận tốc tăng trưởng là sự phản ánh vận tốc sinh tổng hợp protein trong tế bào. Số lượng ribosome trong một tế bào tỷ lệ với vận tốc tăng trưởng. Ribosome RNA chiếm 80% tổng RNA trong tế bào và rất bền. Ngược lại, RNA thông tin bị thủy phân vài phút sau khi được sinh tổng hợp. Như vậy, cần phải có sự phiên mã liên tục của một gen khi sản phẩm protein của gen này được sinh tổng hợp liên tục.

Trong một số điều kiện, *E. coli* có thời gian thế hệ khoảng 30 phút. Tuy nhiên, sự sao chép nhiễm sắc thể lại cần đến 40 phút. Sự chênh lệch này được giải quyết bằng cách bắt đầu lần sao chép DNA thứ hai trước khi lần thứ nhất kết thúc. Trong trường hợp này, bộ gen đã được sao chép một phần khi nó được tách về tế bào con trước khi kết thúc sự phân bào.

2.5. Ảnh hưởng của chất dinh dưỡng lên sự tăng trưởng của quần thể vi sinh vật

Nồng độ của chất dinh dưỡng trong môi trường ảnh hưởng đến tốc độ tăng trưởng (growth rate) hoặc năng suất tăng trưởng (growth yield) của giống. Nồng độ thấp của chất dinh dưỡng có thể ảnh hưởng đến tốc độ tăng trưởng do lượng chất dinh dưỡng được thu nhận vào tế bào không đáp ứng được nhu cầu tăng trưởng của tế bào. Như trên đã đề

cập, một quần thể sẽ đi vào pha ổn định nếu một chất dinh dưỡng bị cạn kiệt. Trong trường hợp này, nồng độ ban đầu của chất dinh dưỡng này sẽ quyết định tổng sinh khối của quần thể. Lượng sinh khối có thể được sinh tổng hợp từ một nguồn chất cho năng lượng nhất định sẽ phụ thuộc vào lượng năng lượng mà tế bào thu nhận được trong quá trình dị hóa nguồn chất này. Thông thường, từ 1 mole ATP thu được từ quá trình dị hóa có thể tạo ra 9 – 10g sinh khối khô của tế bào.

2.6. Ảnh hưởng của các yếu tố môi trường lên sự tăng trưởng của quần thể vi sinh vật

Sự tăng trưởng của vi khuẩn không chỉ phụ thuộc vào chất dinh dưỡng, sự cung cấp năng lượng mà còn cần có các điều kiện môi trường thích hợp như nhiệt độ, pH, nước và sự thông khí. Các loài vi sinh vật có khoảng giới hạn khác nhau trên mỗi yếu tố cho phép tế bào có thể tăng trưởng.

- Khi nhiệt độ tăng, các phản ứng hóa học có thể xảy ra nhanh hơn. Như vậy, tế bào có thể tăng trưởng nhanh hơn khi nhiệt độ tăng. Tuy nhiên, có một giới hạn nhiệt độ mà vượt qua nó các đại phân tử như protein, nucleic acid, lipid có tính mất cảm với nhiệt độ sẽ bị biến tính và không hoạt động (Fig. 5.12). Ngoài ra, cũng có một giới hạn nhiệt độ thấp cho sự tăng trưởng, dưới nhiệt độ này màng lipid không đủ độ linh động để hoạt động đúng đắn. Cần chú ý rằng nhiệt độ tối ưu cho sự tăng trưởng là gần giới hạn nhiệt độ trên hơn là giới hạn dưới.

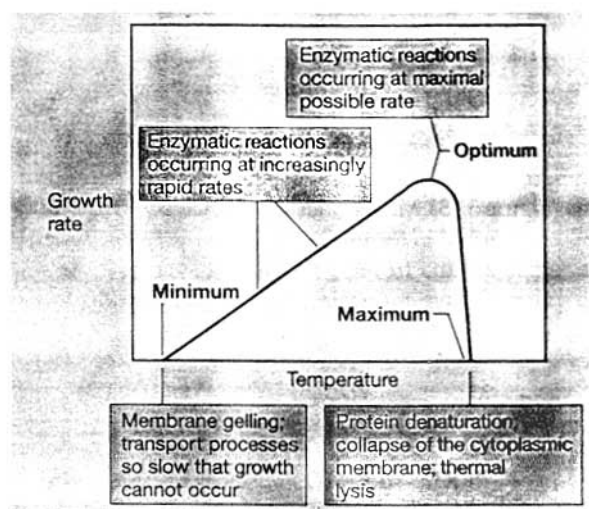


FIGURE 5.12 Effect of temperature on growth rate and the molecular consequences for the cell.

Nói chung, sinh vật có thể tăng trưởng trong khoảng nhiệt độ từ 30 - 40°C. Tuy nhiên, các loài có khoảng nhiệt độ tăng trưởng khác nhau. Dựa vào khoảng nhiệt độ này, vi sinh vật được chia thành 4 nhóm:

+ Vi sinh vật ôn hòa (mesophile) có nhiệt độ tăng trưởng tối ưu trong khoảng 20 - 50°C, là nhiệt độ phổ biến nhất trên bề mặt trái đất và trong động vật.

+ Vi sinh vật ưa hàn (psychrophile) có nhiệt độ tối ưu dưới 15°C . Các vi sinh vật này bị chết ở nhiệt độ bình thường. Chúng hoạt động ở nhiệt độ thấp do có màng có hàm lượng acid béo không bão hòa cao. Các phân tử này vẫn ở dạng lỏng ở nhiệt thấp trong khi màng chứa acid béo bão hòa không còn hoạt động. Các psychrotroph có thể gây hỏng thức ăn, máu được giữ lạnh. Các vi sinh vật này tăng trưởng nhanh nhất ở nhiệt độ trên 20°C , do vậy có thể gây nhiễm các sản phẩm này, mặt khác có thể tăng trưởng chậm đi ở nhiệt độ trong tủ lạnh.

+ Vi sinh vật ưa nhiệt (thermophile) tăng trưởng tốt nhất ở 50°C . Một số vi khuẩn có thể tăng trưởng ở nhiệt sôi của nước.

+ Vi sinh vật ưa nhiệt cực đoan (extreme thermophile) có nhiệt độ tăng trưởng tối ưu trên 75°C . Hầu hết các vi sinh vật ưa nhiệt cực đoan là Archaea. Không có vi sinh vật nhân thật nào có thể tăng trưởng được nhiệt độ này và vi sinh vật quang dưỡng không hiện diện ở nhiệt độ này. Các vi sinh vật ưa nhiệt chứa protein và lipid không bị biến tính ở nhiệt độ cao.

- Hầu hết vi sinh vật tăng trưởng trong phạm vi pH của hầu hết môi trường tự nhiên từ 5 – 9. Tuy nhiên, nhiều loài có khả năng tồn tại và tăng trưởng ở pH cực đoan. Nấm sợi thường tăng trưởng ở pH thấp hơn so với trường hợp của vi khuẩn.

- Các loài vi sinh vật có nhu cầu về nước khác nhau. Không chỉ phụ thuộc và hàm lượng nước nhưng các chất hòa tan như muối, đường cũng có vai trò quan trọng do có thể gây ra sự thẩm thấu làm nước thoát ra khỏi tế bào. Vi khuẩn ở biển thích nghi tối ưu với nồng độ muối trong nước biển; sự tăng trưởng của chúng bị ức chế ở các nồng độ muối thấp hơn cũng như cao hơn tế bào. Enzyme của các vi sinh vật này cần có ion Na^+ mới hoạt động. Các loài tăng trưởng được trong môi trường có nồng độ chất tan cao thì tạo cân bằng với chất tan bên ngoài bằng nồng độ cao của một chất tan bên trong tế bào. Chất tan này phải tương thích (compatible solute), không ức chế hoạt tính các enzyme trong tế bào chất.

- Ôxi phân tử là yếu tố quan trọng giới hạn sự tăng trưởng của vi sinh vật. Cần loại bỏ không khí trong môi trường mới có thể nuôi được vi khuẩn kỵ khí (nạp môi trường đầy bình nuôi để loại bỏ khoảng không của không khí hoặc bổ sung các tác nhân khử phản ứng mạnh với O_2). Các vi sinh vật kỵ khí bắt buộc sẽ bị chết khi hiện diện trong môi trường có O_2 . Khi nuôi cấy các vi sinh vật này, tất cả thao tác cần được thực hiện trong tủ cấy kỵ khí.

Tất cả sinh vật sử dụng O_2 đều tạo dẫn xuất có độc tính từ ôxi. Để tự bảo vệ mình, tất cả vi sinh vật này đều có enzyme để loại bỏ độc tính của các độc chất này. Các dẫn xuất có độc tính được tạo thành do phản ứng của oxygen với các chất truyền điện tử hoặc sắc tố (khi có hiện diện của ánh sáng). Các dẫn xuất này có tính phản ứng cao, có thể phá hủy các thành phần cần thiết của tế bào như lipid, protein, nucleic acid. Superoxide dismutase, catalase, peroxidase là ba loại enzyme phân hủy các dẫn xuất có độc tính.

3. Kiểm soát tăng trưởng của vi sinh vật

3.1. Các phương pháp kiểm soát tăng trưởng

Có thể kiểm soát sự tăng trưởng của vi sinh vật bằng cách ức chế tăng trưởng, diệt tế bào hoặc loại vi sinh vật ra khỏi môi trường.

Chất kháng khuẩn có thể được chia thành các chất diệt khuẩn (bactericidal) và các chất ức chế tăng trưởng vi sinh vật (bacteriostatic). Sự khử trùng (sterilization) là quá trình diệt hoặc loại tất cả sinh vật sống, virút ra khỏi môi trường.

Khử trùng có thể được thực hiện bằng phương pháp vật lý như nhiệt, lọc và chiếu xạ, trong đó nhiệt là phương pháp thông dụng nhất.

3.2. Khử trùng bằng nhiệt

Ở nhiệt độ cao có thể diệt tế bào vi sinh vật. Tốc độ chết của tế bào phụ thuộc vào nhiệt độ và thời gian xử lý theo một hàm mũ. Thời gian giảm thập phân (decimal reduction time) là khoảng thời gian làm giảm số lượng tế bào trong quần thể theo hệ số 10^{-1} (Fig. 18.1, 18.2).

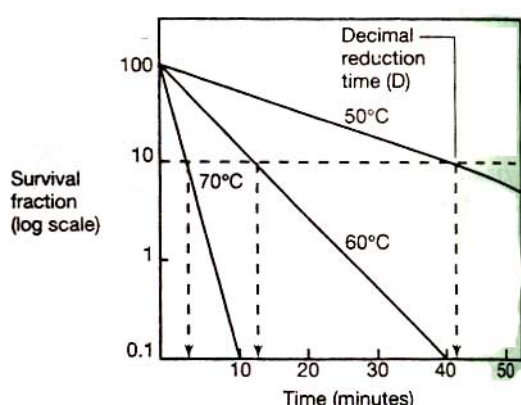


Fig. 18.1 Effect of temperature on the viability of mesophilic bacteria

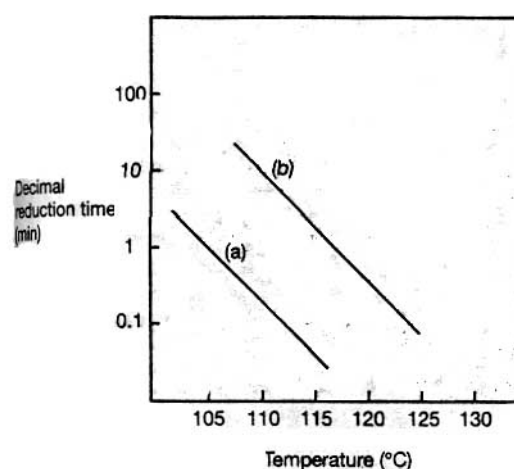


Fig. 18.2 The relationship between the temperature and the rate of killing

Nồi hấp áp lực (autoclave) thường dùng nhiệt độ 121°C, là nhiệt độ mà nội bào tử của vi khuẩn có thời gian giảm thập phân khoảng 4 – 5 phút và tế bào sinh dưỡng là 0,1 – 0,5 phút. Do nội bào tử không bị diệt ở nhiệt độ sôi của nước nên nồi hấp áp lực sử dụng hơi nước áp suất cao (15lb/in). Thông thường thời gian khử trùng cần thiết sau khi đạt áp suất là 10 – 15 phút, nhưng đối với vật thể cồng kềnh hoặc dung tích chất lỏng lớn thời gian khử trùng có thể lâu hơn.

Khử trùng Pasteur (pasteurization) là quá trình làm giảm mật độ tế bào vi sinh vật trong chất lỏng (sữa, vang, dịch trái cây). Phương pháp được đặt tên của Louis Pasteur, người đầu tiên đã sử dụng phương pháp này để làm vang. Khi khử trùng Pasteur, dịch lỏng được đun ở 63 - 65°C trong 30 phút. Có thể khử trùng nhanh (flash pasteurization) ở 71°C trong 15 giây rồi làm nguội nhanh. Phương pháp này có thể được áp dụng để khử trùng dòng liên tục. Khử trùng Pasteur cho phép kéo dài thời gian bảo quản của sản phẩm và làm giảm số lượng vi sinh vật gây bệnh trong sản phẩm.

3.3. Khử trùng bằng chiếu xạ

Chiếu xạ điện từ: đây là một phương pháp hữu hiệu khác để khử trùng hoặc làm giảm mật độ vi sinh vật. Có thể sử dụng các vi sóng, chiếu xạ tia tử ngoại, tia X, tia

gamma và chùm điện tử cho mục đích này, tuy nhiên mỗi loại chiếu xạ có cơ chế khử trùng khác nhau.

Tia tử ngoại không xuyên thấu các vật liệu rắn, đục hoặc hấp thụ ánh sáng nên được dùng để sát trùng bề mặt. Không khí hoặc chất lỏng không hấp thụ các bước sóng UV. Các tia gamma, tia X có tính xuyên thấu cao hơn, khó sử dụng và đắt tiền hơn nhưng được ứng dụng để bảo quản thực phẩm và trong các qui trình công nghệ khác. Sự chiếu xạ đã được sử dụng để thay thế ethylene oxide trong sản xuất các dụng cụ giải phẫu vô trùng.

3.4. Khử trùng bằng phương pháp lọc

Vi sinh vật cũng có thể bị loại ra khỏi chất lỏng bằng sự lọc khử trùng. Giấy lọc dày (depth filter) gồm các lớp lọc được sản xuất từ giấy, amiăng, sợi thủy tinh, có tác dụng giữ các vật thể lại trong đường đi khó khăn của chất lỏng qua giấy lọc. Màng lọc (filter membrane) được chế tạo từ cellulose acetate hoặc cellulose nitrate sao cho màng có nhiều lỗ kích thước nhỏ và vi sinh vật bị giữ lại trên bề mặt màng lọc. Màng chiếu xạ hạt nhân (nucleation track filter) được tạo thành bằng cách chiếu xạ hạt nhân một màng polycarbonate thật mỏng sau đó khắc các đường chiếu bằng một hóa chất. Trong trường hợp này có thể kiểm soát được chính xác kích thước lỗ. Khử trùng bằng phương pháp lọc giúp bảo vệ được các phân tử có hoạt tính sinh học bị bất hoạt bởi nhiệt.

3.5. Kiểm soát tăng trưởng của vi sinh vật bằng hóa chất

Chất kháng khuẩn là các hợp chất có thể diệt hoặc ức chế vi sinh vật. Các chất diệt vi sinh vật (cidal agent) có thể được phân thành diệt vi khuẩn (bactericidal), chất diệt nấm (fungicidal) và chất diệt virus (viricidal). Các chất ức chế vi sinh vật (static agent) có thể được chia thành chất ức chế vi khuẩn (bacteriostatic), chất ức chế nấm (fungistatic) và chất ức chế virus (viristatic).

Nồng độ ức chế tối thiểu (minimum inhibitory concentration) là lượng tác chất cần để ức chế tăng trưởng của vi sinh vật thử nghiệm. MIC thường được xác định bằng kỹ thuật ống pha loãng sử dụng các nồng độ khác nhau của chất kháng khuẩn trong môi trường chứa một lượng không đổi chủng cấy. Phương pháp này sẽ thay đổi tùy loại môi trường, lượng chủng cấy, thời gian nuôi cấy và bản chất của vi sinh vật thử nghiệm. Hoạt tính kháng khuẩn cũng có thể được nghiên cứu bằng phương pháp khuếch tán thạch (agar diffusion method) Trong phương pháp này, bề mặt một hộp petri chứa môi trường thạch thích hợp được cấy đều vi sinh vật thử nghiệm. Những lượng khác nhau của một chất kháng khuẩn được bổ sung vào các đĩa giấy lọc được đặt lên bề mặt môi trường thạch. Trong quá trình ủ, chất kháng khuẩn khuếch tán từ đĩa giấy vào môi trường và tạo thành vòng vô khuẩn trong suốt quanh đĩa giấy. Đường kính vòng vô khuẩn càng lớn thì hiệu quả kháng khuẩn càng cao.

Tùy vào đối tượng cần được khử trùng là sinh vật hoặc phi sinh vật người ta phân biệt hóa chất dùng cho mục đích khử trùng thành hai loại: (1) chất sát khuẩn, diệt khuẩn (disinfectant) là các chất khử trùng hóa học, thường được gọi là chất diệt mầm (germicide) được sử dụng trên vật liệu không sống; (2) chất kháng khuẩn (antiseptic) là các chất dùng trên mô sống.

Kiểm soát sự tăng trưởng của vi sinh vật có vai trò quan trọng trong công nghiệp thực phẩm do một số vi sinh vật làm hư hỏng thực phẩm hoặc sự tăng trưởng của chúng trong thực phẩm tạo ra các độc tố. Một thực phẩm dễ bị hư hỏng khi nó là môi trường tăng trưởng tốt cho vi sinh vật. Do vậy, thực phẩm có hàm lượng nước thấp thì khó bị hư hỏng bởi vi sinh vật. Thực phẩm có thể được bảo quản bằng một số phương pháp như: (1) làm giảm nhiệt độ bảo quản; (2) làm giảm pH; (3) bổ sung đường hoặc muối là giảm nước hoạt tính. Đóng lon là quá trình chế biến trong đó thực phẩm được đóng kín và gia nhiệt để diệt hết vi sinh vật sống và đảm bảo các vi sinh vật còn sót lại không tăng trưởng được. Do vậy, đóng lon là một dạng khử trùng nhiệt.

3.6. Các chất kháng khuẩn dùng trong trị liệu

Nhiều chất kháng khuẩn được dùng cho mục đích trị liệu và kiểm soát bệnh do vi sinh vật.

Chất đồng dạng nhân tố tăng trưởng (growth factor analog) là dẫn xuất của nhân tố tăng trưởng của vi sinh vật, được sử dụng nhằm mục đích sử dụng chất này để cạnh tranh, ngăn cản việc sử dụng nhân tố tăng trưởng của vi sinh vật gây bệnh, làm cho chúng không tăng trưởng được. Ví dụ, thuốc thuộc nhóm sulfa là đồng dạng của p-aminobenzoic acid và ngăn cản sự sinh tổng hợp của nhân tố tăng trưởng folic acid.

3.7. Kháng sinh

Chất kháng sinh (antibiotic) là hợp chất có nguồn gốc từ vi sinh vật hoặc tổng hợp hóa học có tác dụng ức chế tăng trưởng của các vi sinh vật khác. Chỉ một số kháng sinh là có giá trị thực tiễn để chữa trị bệnh truyền nhiễm vì đa số có thể có tác dụng phụ, độc tính trên động vật hoặc người sử dụng. Hiệu lực của kháng sinh có thể được tăng cường bởi những biến đổi hóa học sau khi chúng được sinh tổng hợp bởi vi sinh vật. Mục tiêu tác dụng của các chất kháng sinh là vách tế bào, màng và ribosome. Vi khuẩn có thể có tính kháng kháng sinh bẩm sinh hoặc có thể trở nên kháng. Tính kháng kháng sinh có thể do: (1) sự không hiện diện của mục tiêu tác dụng; (2) tính không thấm của thuốc; (3) sự tổng hợp của một enzyme làm mất hoạt tính của kháng sinh. Kháng sinh là một họ chất hóa trị liệu đặc biệt vì là sản phẩm tự nhiên không như trường hợp các thuốc sulfa (Fig. 18.14).

4. Các phương thức biến dưỡng vật chất và năng lượng ở vi sinh vật

4.1. Sự thu năng lượng và biến dưỡng C

Năng lượng có thể được vi sinh vật thu nhận từ hợp chất hóa học: hóa năng (hóa dưỡng) hữu cơ (chemoorganotroph), hóa năng (hóa dưỡng) vô cơ (chemolithotroph) hoặc từ ánh sáng (quang năng hay quang dưỡng, phototroph). Các trình bày về biến dưỡng trong các phần trước liên quan đến hóa năng hữu cơ, sử dụng hợp chất hữu cơ là nguồn năng lượng. Trường hợp hóa năng vô cơ, vi khuẩn thu lấy năng lượng từ sự ôxi hóa các hợp chất vô cơ và thường nguồn C được sử dụng cho sinh tổng hợp vật chất của tế bào là từ CO₂. Hầu hết các vi khuẩn quang năng đều có khả năng tự dưỡng (autotroph) dùng CO₂ làm nguồn C. Khái niệm tự dưỡng có nghĩa là vi sinh vật có thể nhận được tất cả carbon cần thiết từ hợp chất vô cơ. Ngược với tự dưỡng là dị dưỡng (heterotroph), trong

trường hợp này, vi sinh vật dựa vào chất hữu cơ làm nguồn C và phụ thuộc vào khả năng cố định CO_2 của vi sinh vật tự dưỡng (Fig. 15.1).

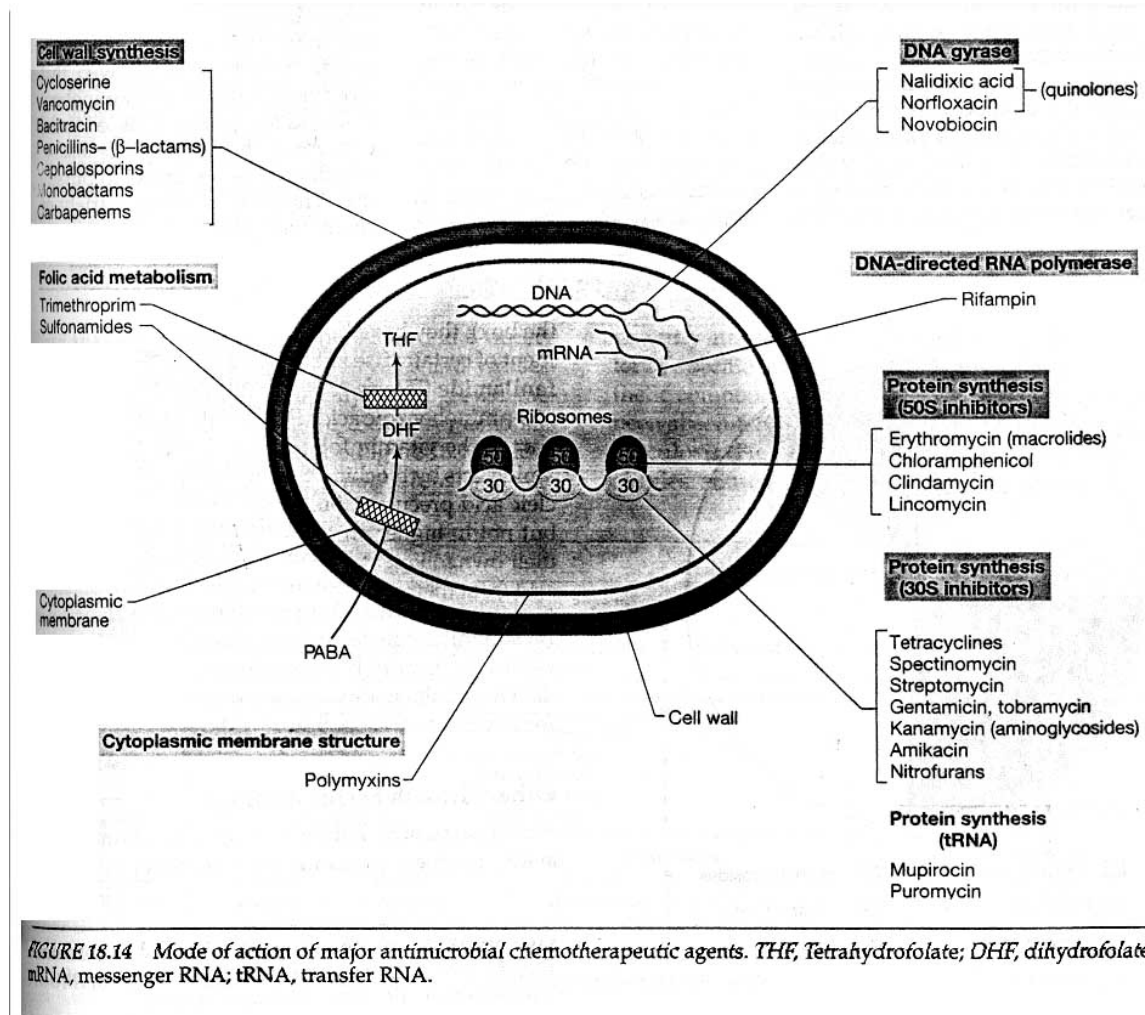


FIGURE 18.14 Mode of action of major antimicrobial chemotherapeutic agents. THF, Tetrahydrofolate; DHF, dihydrofolate; mRNA, messenger RNA; tRNA, transfer RNA.

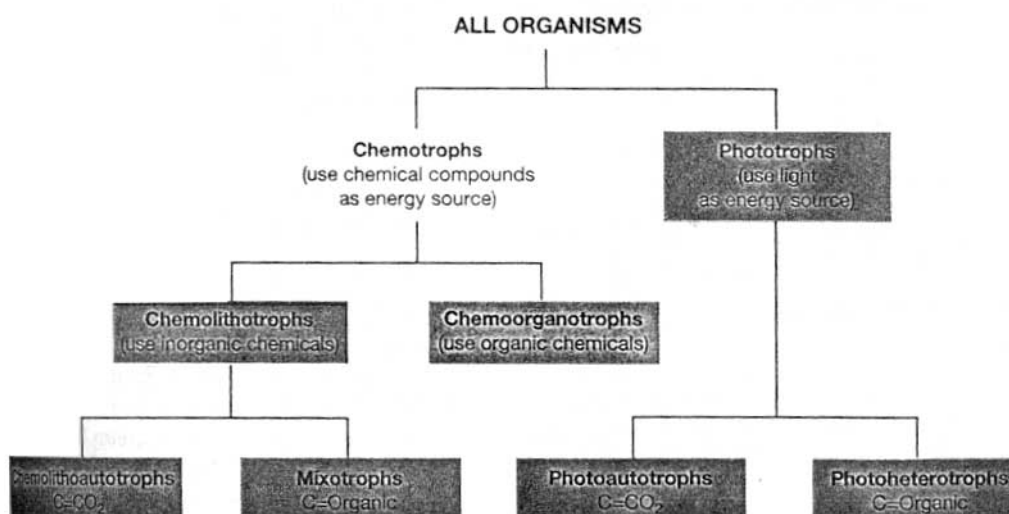


Fig. 15.1 Classification of organisms interm of energy and carbon sources.

4.2. Quang tổng hợp (photosynthesis)

Năng lượng ánh sáng được chuyển thành năng lượng hóa học thông qua quá trình quang tổng hợp. Phản ứng được khởi đầu bằng sự hấp thu quang tử ánh sáng bởi các sắc tố đặc biệt nhất là bởi các diệp lục tố chlorophyll. Diệp lục tố chuyển đổi năng lượng ánh sáng thành năng lượng hóa học. Sự tăng trưởng của các vi sinh vật quang năng được chia thành: (1) các phản ứng sáng trong đó năng lượng bức xạ của ánh sáng được chuyển thành năng lượng hóa học như ATP và (2) các phản ứng tối trong đó năng lượng được sử dụng để khử CO_2 thành vật liệu tế bào.

4.3. Sắc tố và vai trò trong quang tổng hợp

Cấu tạo phân tử của chlorophyll là các vòng porphyrin chứa Mg^{2+} (tương tự như cytochrome, trong trường hợp này là Fe^{2+} thay cho Mg^{2+}). Diệp lục tố có mạch carbon dài kỵ nước khiến phân tử này dễ kết tụ với màng. Có nhiều loại diệp lục tố khác nhau chỉ bởi nhóm thế trên vòng porphyrin có bước sóng ánh sáng hấp thu cực đại khác nhau. Do vậy, các phân tử chlorophyll này được phân biệt với nhau dựa vào phổ hấp thu ánh sáng. Chlorophyll a là diệp lục tố hiện diện ở thực vật, tảo và vi khuẩn lam (cyanobacteria) hấp thu mạnh ánh sáng xanh và đỏ. Hầu hết tế bào vi sinh vật có khả năng quang tổng hợp đều chứa một vài sắc tố khác nhau giúp cho vi sinh vật có thể hấp thu ánh sáng ở các bước sóng khác nhau để thu năng lượng hiệu quả hơn cho quá trình quang tổng hợp.

Các sắc tố được sắp xếp thành nhóm gồm hàng trăm phân tử sắc tố trong màng quang tổng hợp (photosynthetic membrane). Trong màng này, một số phân tử chlorophyll được liên kết với các protein đặc biệt và các phân tử nhỏ là chất truyền điện tử giúp chuyển năng lượng ánh sáng thành năng lượng hóa học. Tập hợp các phân tử sắc tố và các chất truyền điện tử được gọi là hệ quang (photosystem). Các phân tử sắc tố chlorophyll này được gọi là trung tâm phản ứng (reaction center). Các phân tử chlorophyll khác có vai trò thu gom các quang tử ánh sáng, chuyển về cho trung tâm phản ứng.

Ở prokaryote, màng quang tổng hợp là một hệ thống màng trong có nguồn gốc từ màng tế bào chất. Ngược lại, ở eukaryote và thực vật, màng quang tổng hợp được hình thành trong các bào quan riêng là diệp lục thể (chloroplast).

Các sắc tố không là chlorophyll có vai trò phụ trợ. Ví dụ carotenoid hấp thu ánh sáng xanh và truyền một phần năng lượng ánh sáng cho chlorophyll bằng sự phát huỳnh quang. Khác với các sắc tố khác, phycobiliprotein (gồm sắc tố phycobilin gắn với một protein và tan được trong nước) hiện diện ở vi khuẩn lam và tảo đỏ. Các sắc tố này được sắp xếp thành cấu trúc gọi là phycobilisome gắn vào màng quang tổng hợp. Bằng cách này, ánh sáng nhận được bởi phycobiliprotein được truyền rất hữu hiệu đến chlorophyll trong màng.

4.4. Tổng hợp ATP trong quang hợp

Sự tổng hợp ATP trong quang tổng hợp xảy ra theo cơ chế quang phosphoryl hóa (photophosphorylation) có một số điểm tương đồng với hô hấp hiếu khí. Quá trình này cũng cần đến chuỗi truyền điện tử gồm các chất mang điện tử được sắp xếp trật tự trong màng nhằm tạo được động lực proton. Trong chuỗi truyền điện tử này, điện tử được

truyền từ chất mang có thế khử thấp sang chất mang có thế khử cao hơn tương tự như trong hô hấp hiếu khí. Động lực proton được dùng cho sự tổng hợp ATP nhờ enzyme ATPase gắn trong màng. Điểm đặc trưng của chuỗi truyền điện tử trong quang tổng hợp là năng lượng ánh sáng được dùng để thực hiện một phản ứng không thuận lợi về nhiệt động học là sự ôxi hóa sắc tố có thế khử khá thấp (không có khuynh hướng cho điện tử).

4.5. Quang tổng hợp không sinh ôxi (anoxygenic photosynthesis)

Trong quá trình quang tổng hợp không sinh ôxi ở vi khuẩn quang năng lực và tía, sự tổng hợp ATP trong quang tổng hợp được thực hiện khá dễ dàng và ôxi phân tử không được tạo ra trong quá trình này. Khi bị ánh sáng kích thích, cặp bacteriochlorophyll trong trung tâm phản ứng sẽ truyền điện tử cho phân tử bacteriopheophytin. Sau đó, điện tử này được truyền cho quinone, rồi cho một loạt cytochrome. Trong quá trình này, proton bị đẩy ra khỏi màng. Sau cùng, điện tử quay trở về bacteriochlorophyll đã bị ôxi hóa ở trung tâm phản ứng. Do điện tử được truyền trong một vòng kín nên cơ chế sinh ATP này được gọi là phosphoryl hóa vòng (cyclic phosphorylation) (Fig. 15.14).

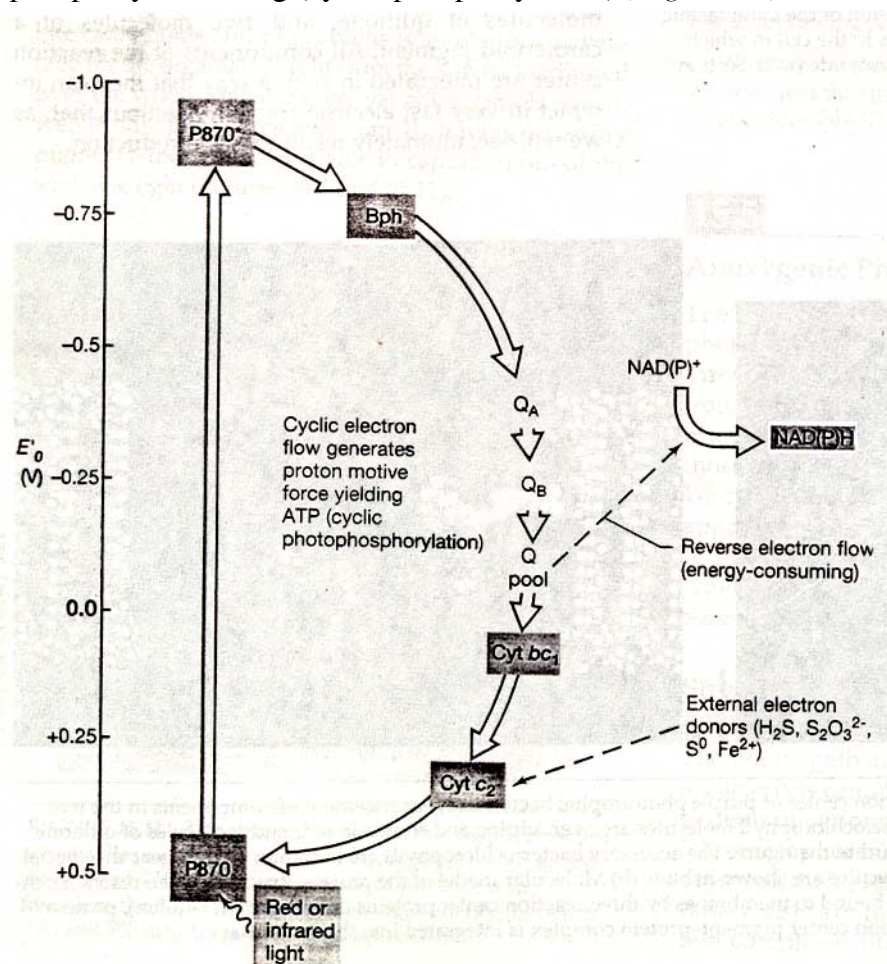


Fig. 15.14 General scheme of electron flow in

+ Nhiều vi khuẩn có khả năng biến dưỡng quang năng không sinh ôxi này là tự dưỡng tức là có thể cố định CO_2 . Để khử CO_2 thành hợp chất hữu cơ cần có ATP và lực khử (NADP khử). Tuy nhiên, sự khử trực tiếp NADP ở các vi sinh vật này là không thuận lợi về nhiệt động học (chênh lệch về về thế khử giữa NADP và các chất cho điện tử được sử dụng bởi các vi sinh vật này không cho phép phản ứng xảy ra). Trong trường hợp này ATP được dùng để truyền điện tử ngược chiều nhiệt động học từ chất khử yếu sang chất khử mạnh hơn để khử NADP. Quá trình này được gọi là sự truyền điện tử ngược (reverse electron flow). Các vi sinh vật hóa năng vô cơ cũng sử dụng quá trình này để khắc phục khó khăn tương tự khi cố định CO_2 .

Các vi khuẩn quang năng không sinh ôxi thuộc nhóm kỵ khí bắt buộc, một số loài có thể tăng trưởng trong điều kiện hiếu nhờ phương thức hóa năng hữu cơ. Ôxi ức chế sự sinh tổng hợp bacteriochlorophyll trong các loài này nên chúng không thể tiến hành quang tổng hợp trong điều kiện hiếu khí. Các loài này cũng thường sử dụng hợp chất hữu cơ làm nguồn carbon khi thực hiện quang tổng hợp, tức là chỉ thực hiện phản ứng sáng để thu năng lượng. Do vậy có thể xem là vi khuẩn quang năng dị dưỡng (photoheterotroph).

4.6. Quang tổng hợp sinh ôxi (oxygenic photosynthesis)

Trong quang tổng hợp sinh ôxi, cần có sự tham gia của hai loại chlorophyll khác nhau. Mỗi loại chlorophyll kết hợp với các chất truyền điện tử tương ứng và hình thành hai hệ quang (hệ quang I và hệ quang II) hoạt động tuần tự nhau. Sau khi chlorophyll trong hệ quang II bị ôxi hóa (cho điện tử) do năng lượng ánh sáng, phân tử này sẽ bị khử (nhận điện tử) trở về trạng thái bình thường nhờ nhận điện tử từ phân tử nước. Tuy nhiên cần lưu ý: (1) điện tử vốn bị lấy khỏi chlorophyll bởi ánh sáng không quay trở lại phân tử chlorophyll này nên quá trình tạo ATP bởi hệ thống này được gọi là phosphoryl hóa không vòng (non-cyclic phosphorylation); (2) sản phẩm ôxi hóa cuối cùng là ôxy.

Trong hệ quang II, điện tử từ trung tâm phản ứng II được truyền qua hàng loạt các chất mang điện tử. Trong quá trình này, một động lực proton được hình thành và được dùng để tạo ATP. Các phân tử ATP này được tạo thành bởi sự phosphoryl hóa không vòng. Sau đó, điện tử này được chuyển đến để khử chlorophyll bị ôxi hóa bởi ánh sáng ở trung tâm phản ứng của hệ quang I. Điện tử từ chlorophyll của hệ quang I được truyền vào chuỗi truyền điện tử và truyền đến ferredoxin (Fd). Protein này có thể cho điện tử cho NADP^+ tạo ra lực khử cần cho cố định CO_2 . Ngoài ra, chất nhận điện tử ở hệ thống quang I có thể truyền ngược điện tử cho các cytochrome (cyt b₆) ở hệ quang II và được truyền trở lại chlorophyll của trung tâm phản ứng II. Trong trường hợp này, ATP được tạo thành. Trong trường hợp này, hệ quang I tạo ra sự quang phosphoryl hóa vòng (cyclic phosphorylation) (Fig. 15.19).

4.7. Sự tự dưỡng hay cố định CO_2 , chu trình Calvin

Tất cả các vi sinh vật tự dưỡng carbon đều dùng chu trình Calvin để cố định CO_2 và tạo ra hợp chất hữu cơ (Fig. 15.22). Chu trình này gồm có ba bước: (1) gắn CO_2 vào một phân tử nhận; (2) khử C của CO_2 đến trạng thái ôxi hóa của vật liệu trong tế bào; (3) tái sinh phân tử nhận. Bước 1 được xúc tác bởi ribulose biphosphate carboxylase trong đó ribulose biphosphate là phân tử nhận. Bước 2 cần ATP và NADP khử. Bước 3

gồm nhiều phản ứng sắp xếp lại đường để tái tạo ribulose biphosphate. Mười hai phân tử NADP và 18 phân tử ATP cần cho sự tổng hợp một phân tử glucose từ 6 phân tử CO_2 .

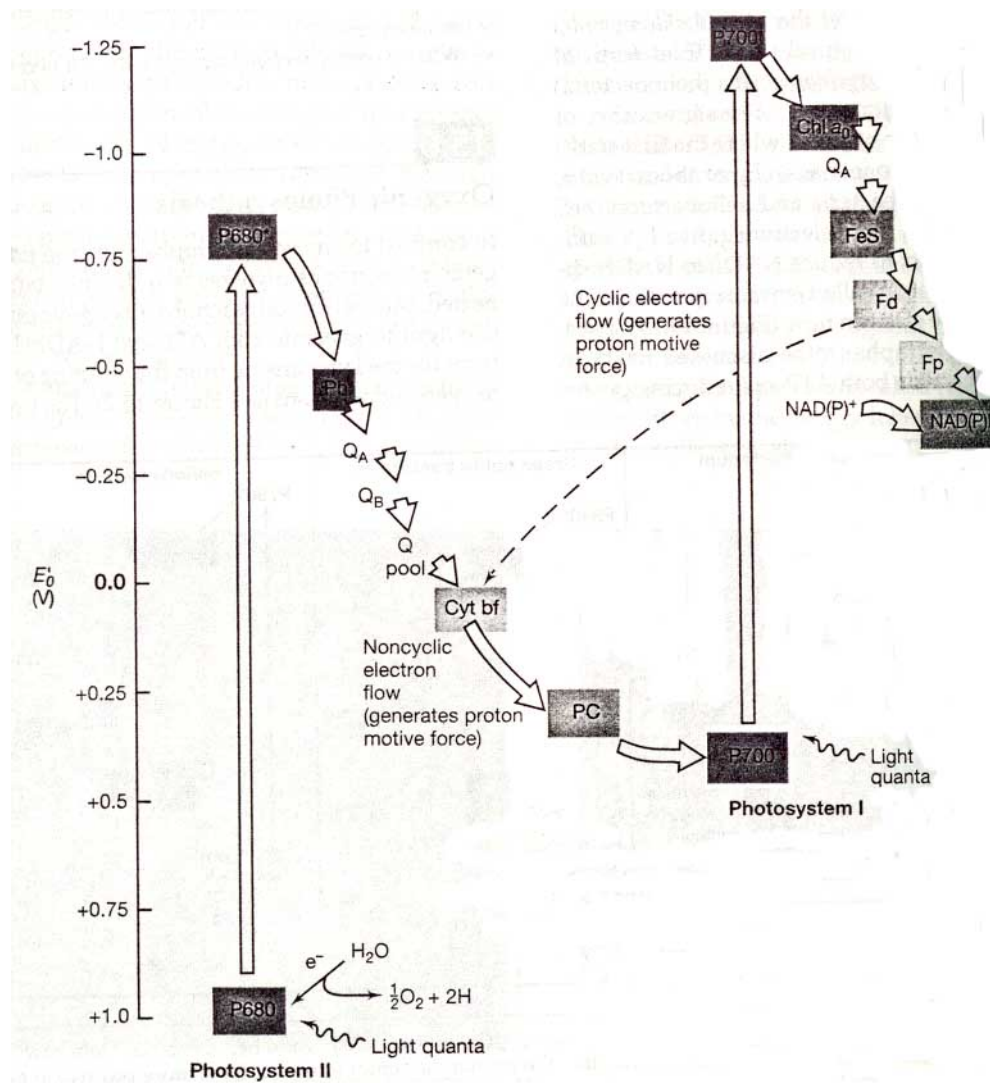


Fig. 15.19 Electron flow in oxygenic photosynthesis

4.8. Hóa năng vô cơ (chemolithotrophy)

Vi sinh vật hóa năng vô cơ (chemolithotroph) là các prokaryote có thể thu nhận năng lượng bằng cách ôxi hóa hợp chất vô cơ. Các vi sinh vật này được phân thành một số nhóm khác nhau dựa vào nguồn năng lượng. Tuy nhiên chúng có một số đặc điểm chung như sau: (1) Sử dụng chu trình Calvin để cố định CO_2 khi tăng trưởng theo phương thức tự dưỡng; (2) Một số là hóa năng vô cơ tùy ý, có khả năng tăng trưởng dị dưỡng carbon khi môi trường có nguồn C hữu cơ thích hợp; (3) Một số hóa năng vô cơ tùy ý sẽ tăng trưởng theo phương thức hỗn dưỡng (mixotroph), có khả năng sử dụng đồng thời nguồn năng lượng vô cơ và hữu cơ khi môi trường có sự hiện diện cùng lúc hai nguồn năng lượng này; (4) Hầu hết vi khuẩn hóa năng vô cơ thuộc loại hiếu khí, tạo ATP bằng phosphoryl hóa ôxi hóa; (5) Trừ nhóm vi khuẩn ôxi hóa H_2 , các vi khuẩn hóa năng vô cơ

khác đều dùng cơ chế truyền điện tử ngược để tạo ra lực khử. Nguồn năng lượng mà các vi sinh vật này sử dụng không đủ mạnh để làm chất khử trực tiếp NAD.

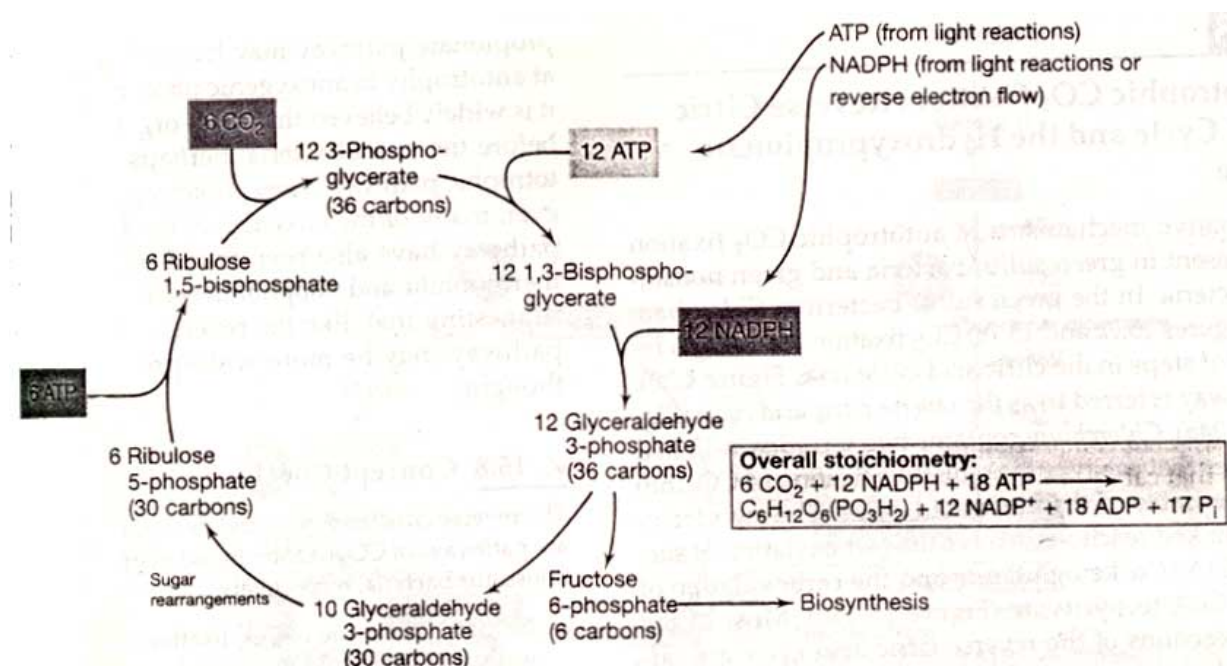


Fig. 15.22 The Calvin cycle

Một số dạng hóa năng vô cơ và nguồn năng lượng (chất cho điện tử, electron donor) được trình bày ở Table 15.1.

| TABLE 15.1 Energy yields from the oxidation of various inorganic electron donors ^a | | | | | | |
|---|--|-------------------------|----------------------|-------------------------------|---------------------|--|
| Electron donor | Reaction | Type of chemolithotroph | E_0' of couple (V) | $\Delta G^{0'}$ (kJ/reaction) | Number of electrons | $\Delta G^{0'}$ (kJ/2 e ⁻) |
| Hydrogen | $\text{H}_2 + \frac{1}{2}\text{O}_2 \rightarrow \text{H}_2\text{O}$ | Hydrogen bacteria | -0.42 | -237.2 | 2 | -237.2 |
| Sulfide | $\text{HS}^- + \text{H}^+ + \frac{1}{2}\text{O}_2 \rightarrow \text{S}^0 + \text{H}_2\text{O}$ | Sulfur bacteria | -0.27 | -209.4 | 2 | -209.4 |
| Sulfur | $\text{S}^0 + 1\frac{1}{2}\text{O}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{SO}_4^{2-} + 2 \text{H}^+$ | Sulfur bacteria | -0.25 | -587.1 | 6 | -195.7 |
| Ammonium | $\text{NH}_4^+ + 1\frac{1}{2}\text{O}_2 \rightarrow \text{NO}_2^- + 2 \text{H}^+ + \text{H}_2\text{O}$ | Nitrifying bacteria | 0 ^b | -274.7 | 6 | -137.4 |
| Nitrite | $\text{NO}_2^- + \frac{1}{2}\text{O}_2 \rightarrow \text{NO}_3^-$ | Nitrifying bacteria | +0.43 | -74.1 | 2 | -75.8 |
| Ferrous iron | $\text{Fe}^{2+} + \text{H}^+ + \frac{1}{4}\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \frac{1}{2}\text{H}_2\text{O}$ | Iron bacteria | +0.77 | -32.9 | 1 | -65.8 |

^a Data calculated from values in Appendix 1; values for Fe^{2+} are for pH 2, and others are for pH 7. At pH 7 the $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ couple is about +0.2 V.
^b E_0' of the $\text{NH}_3/\text{NH}_2\text{OH}$ couple.

- Vi khuẩn hydrogen (hydrogen bacteria) gồm nhiều giống vi khuẩn khác nhau có thể dùng H_2 làm nguồn năng lượng, thuộc loại hóa năng vô cơ tùy ý. Ở các vi khuẩn này có một enzyme hydrogenase gắn với màng hoặc tan trong tế bào chất có vai trò truyền điện tử từ H_2 đến một hệ thống truyền điện tử.

- Vi khuẩn lưu huỳnh (sulfur bacteria) là các vi khuẩn không màu có khả năng ôxi hóa các hợp chất lưu huỳnh khử thành sulfuric acid, trong quá trình này, sản phẩm trung gian là nguyên tố lưu huỳnh có thể được tích tụ trong tế bào. Một số vi khuẩn này thuộc loại ưa acid và có thể làm giảm pH môi trường xuống đến trị số 2.

- Vi khuẩn ôxi hóa sắt (iron-oxidizing bacteria), ví dụ như *Thiobacillus ferrooxidans* là vi khuẩn lưu huỳnh ưa acid có thể dùng sắt khử (ion sắt nhị) làm nguồn năng lượng. Vi khuẩn này sử dụng gradient proton tự nhiên giữa tế bào chất có pH trung tính và môi trường acid bên ngoài để tạo năng lượng. Khi ôxi là chất nhận điện tử cuối cùng và tạo thành nước thì các ion hydrogen bị tiêu thụ. Phản ứng này xảy ra ở phía tế bào chất của màng sao cho proton được tiêu thụ bên trong tế bào. Lượng proton bị mất đi này được bù đắp bằng dòng proton từ môi trường bên ngoài vào bên trong tế bào đi qua ATPase trên màng và tạo ATP.

- Vi khuẩn ôxi hóa nitrogen (nitrogen oxidizing bacteria) có khả năng sử dụng các dạng khử của nitrogen như NH_3 , NO_2^- làm nguồn năng lượng bằng cách ôxi hóa thành NO_2^- hoặc NO_3^- . Có hai nhóm chính là *Nitrosomonas* ôxi hóa NH_3 thành NO_2^- và *Nitrobacter* ôxi hóa NO_2^- thành NO_3^- .

4.9. Hô hấp kỵ khí (anaerobic respiration)

Hô hấp kỵ khí là quá trình trong đó chuỗi truyền điện tử được dùng để tạo động lực proton với chất nhận điện tử sau cùng không phải là ôxi (Fig. 15.37). Phần lớn các vi sinh vật có phương thức biến dưỡng này đều thuộc nhóm hóa năng dị dưỡng (nguồn năng lượng hay chất cho điện tử là chất hữu cơ) và chất nhận điện tử sau cùng là hợp chất vô cơ không là ôxi phân tử. Một số vi sinh vật kỵ khí dùng nguồn năng lượng từ hydrogen nên là hóa năng vô cơ (vi khuẩn sinh methane và vi khuẩn sinh acetate đồng hình).

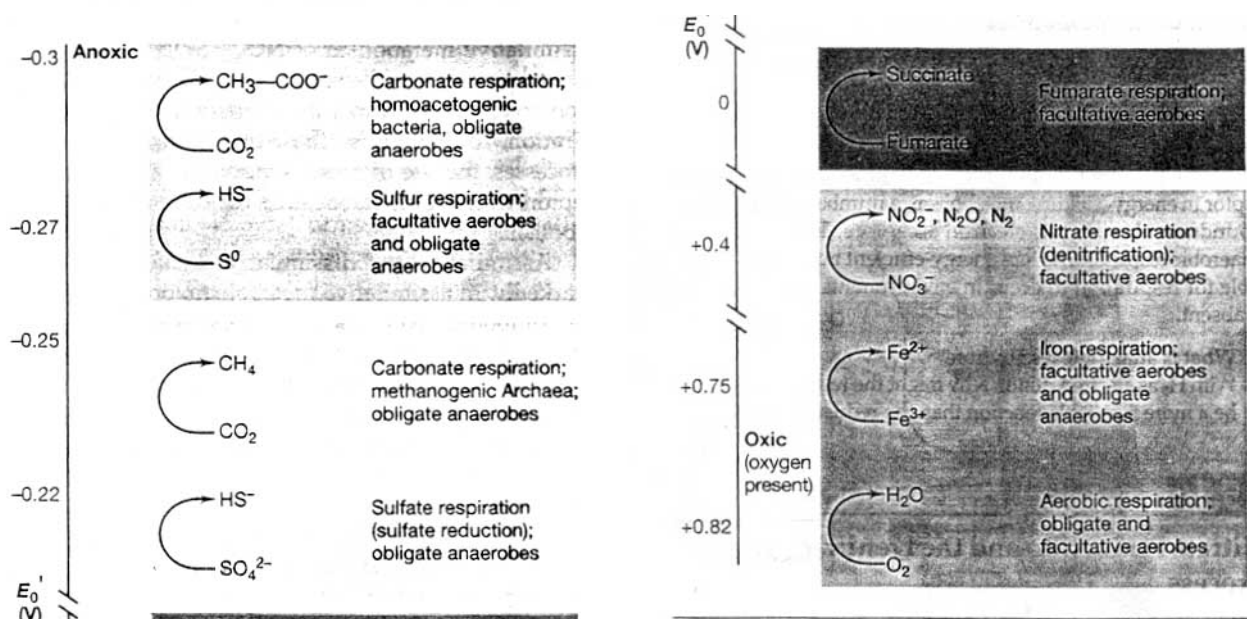


FIGURE 15.37 Examples of anaerobic respirations. The couples are arranged in order from those that are most electronegative E_0' (top) to those that are most electropositive E_0' (bottom).

Năng lượng được phóng thích hay ATP được tạo thành ở hô hấp kỵ khí thấp hơn hô hấp hiếu khí do độ chênh lệch thế khử giữa chất cho và chất nhận điện tử là nhỏ hơn nhiều so với trường hợp O_2 là chất nhận điện tử sau cùng.

Khi các hợp chất ôxi hóa như nitrate, sulfate và carbon dioxide được dùng làm chất nhận điện tử sau cùng trong dị hóa, một số lượng lớn các sản phẩm khử được tiết vào môi trường. Một lượng nhỏ các hợp chất này có thể được biến dưỡng đồng hóa để đáp ứng nhu cầu tổng hợp vật liệu tế bào.

- Trong phản ứng phản nitrate hóa (denitrification), nitrate bị khử thành NH_3 hoặc thành N_2 . Sự thất thoát nitrate ở dạng N_2 làm giảm đạm có thể được sử dụng bởi cây trong đất. Tất cả vi khuẩn phản nitrate hóa (denitrifying bacteria) có thể hô hấp hiếu khí. Tuy nhiên khi môi trường không có ôxi, các enzyme gắn vào màng như nitrate reductase và nitrite reductase có thể giúp sự truyền điện tử từ chuỗi điện tử đến nitrate hoặc nitrite (hô hấp kỵ khí).

- Vi khuẩn khử sulfate (sulfate reducing bacteria) thuộc nhóm dị dưỡng carbon và kỵ khí bắt buộc tạo ra sản phẩm cuối cùng là H_2S . Trước khi sulfate có thể bị khử, ion này cần được hoạt hóa bằng ATP tạo thành adenosine phosphosulfate. Enzyme hydrogenase có vai trò trong việc lưu trữ năng lượng của quá trình khử sulfate bằng hệ thống truyền điện tử. Hydrogenase hiện diện ở phía ngoài của màng tế bào chất sẽ truyền điện tử cho cytochrome C_3 nằm trong màng và điện tử này được sử dụng để khử sulfate. Tuy nhiên ion hydrogen còn nằm lại bên ngoài màng nên hình thành một gradient proton để tổng hợp ATP.

- Vi khuẩn sinh methane (methanogen) và vi khuẩn sinh acetate đồng hình (homoacetogen) là các vi khuẩn kỵ khí bắt buộc sử dụng CO_2 làm chất nhận điện tử cuối cùng. Nguồn năng lượng chủ yếu của nhóm này là H_2 và sản phẩm sau cùng là CH_4 hoặc acetic acid.

- Ngoài nitrate, sulfate và carbon dioxide, Fe^{3+} , Mn^{4+} và một số hợp chất hữu cơ (fumarate, glycine, trimethylamine oxide) cũng có thể là chất nhận điện tử sau cùng trong hô hấp kỵ khí.

4.10. Khía cạnh năng lượng và ôxi hóa khử của sự lên men

Sự ôxi hóa một hợp chất hữu cơ để thu lấy năng lượng cần thực hiện được hai việc: (1) lưu trữ một phần năng lượng phóng thích; (2) thải bỏ điện tử. Nếu có một chất nhận điện tử bên ngoài tế bào như O_2 (hô hấp hiếu khí), NO_3^- (hô hấp kỵ khí)... thì cả hai việc trên đều có thể hoàn thành nhờ một chuỗi truyền điện tử tạo ra động lực proton để tổng hợp ATP và truyền điện tử cho chất nhận cuối cùng.

Tuy nhiên, trong lên men, vi sinh vật phải tổng hợp ATP bằng phosphoryl hóa cơ chất trong đó một liên kết phosphate năng lượng cao được chuyển từ một trong mười dẫn xuất trung gian năng lượng cao của quá trình đường phân đến ADP. Hơn nữa, một trong những sản phẩm hữu cơ trung gian của trao đổi chất được dùng làm chất nhận điện tử. Số lượng của sản phẩm ôxi hóa và sản phẩm khử của quá trình lên men phải cân bằng nhau. Sự cân bằng điện tử có thể đạt được bằng sự tạo thành H_2 bởi hydrogenase dùng ferredoxin làm chất cho điện tử.

4.11. Sự cộng dưỡng (syntrophy)

Trong môi trường kỵ khí, sản phẩm của một quá trình lên men này là nguồn năng lượng cho vi khuẩn của quá trình lên men khác. Sản phẩm cuối cùng của sự phân hủy kỵ khí là CH_4 và CO_2 . Trong một số trường hợp, sự tăng trưởng của một loài vi khuẩn của một quá trình lên men lại phụ thuộc vào việc sử dụng sản phẩm của quá trình lên men này bởi một loài khác. Trong trường hợp này, quá trình lên men này là không thuận lợi về nhiệt động học trừ phi nồng độ của sản phẩm lên men được giữ ở mức thấp nhờ sự tiêu thụ bởi một loài khác. Hiện tượng này được gọi là sự liên kết cộng dưỡng (syntroph) và trường hợp tiêu thụ H_2 theo cơ chế truyền hydrogen giữa hai loài đã được nghiên cứu rõ nhất.

4.12. Biến dưỡng vật chất hữu cơ bởi vi sinh vật

Hầu hết các hợp chất hữu cơ tự nhiên đều được biến dưỡng hiếu khí hoặc kỵ khí bởi các vi sinh vật. Tuy nhiên, lignin và các hydrocarbon mạch thẳng là hai nhóm không bị phân hủy kỵ khí. Tính bền vững của chúng là nguyên nhân dẫn đến sự hình thành than đá và mỏ dầu.

Trong nửa cuối của thế kỷ 20, nhiều chất hữu cơ vốn không hiện diện trong tự nhiên đã được tổng hợp và sử dụng với số lượng lớn. Các chất này được gọi là chất dị sinh (xenobiotic) và một số không bị phân hủy bởi vi sinh vật, có lẽ do chưa có cơ hội tiến hóa hình thành những vi khuẩn có khả năng tăng trưởng trên các cơ chất này.

4.13. Biến dưỡng polysaccharide

Đường là hợp chất hữu cơ phổ biến nhất trong tự nhiên, phần lớn nằm ở dạng các polysaccharide không tan như cellulose. Để biến dưỡng nguồn chất hữu cơ này, vi sinh vật phải tiết các enzyme ngoại bào để phân hủy các phân tử này thành các phân tử nhỏ hơn hoặc đơn phân trước khi có thể hấp thụ vào tế bào.

Ngược lại, các polysaccharide nội bào dùng làm nguồn dự trữ năng lượng của tế bào được thủy phân khác so với các phân tử bên ngoài tế bào. Khi một đơn phân được lấy ra khỏi một polysaccharide, ví dụ như trường hợp glycogen, thì đơn phân này bị phosphoryl hóa. Cơ chế này cho phép tiết kiệm năng lượng vì bước đầu tiên trong dị hóa glucose là sự phosphoryl hóa glucose bằng ATP.

Sự biến dưỡng đường sucrose bởi vi sinh vật đóng vai trò then chốt để khởi mào sự sâu răng. *Streptococcus mutans* dùng enzyme dextran sucrose để thủy phân sucrose. Đường fructose sinh ra được sử dụng để tạo năng lượng và glucose được dùng để tổng hợp dextran là một polysaccharide ngoại bào có tính kết dính giúp vi khuẩn gắn chặt vào bề mặt răng.

4.14. Biến dưỡng các acid hữu cơ

Các acid hữu cơ là dẫn xuất trung gian của chu trình TCA có thể được sử dụng làm nguồn năng lượng bởi nhiều vi sinh vật. Tuy nhiên, khi các dẫn xuất này được dùng để sinh tổng hợp vật liệu tế bào thì phân tử oxaloacetate đóng vai trò là chất nhận cần được tái tạo. Oxaloacetate được tạo thành bởi chu trình glyoxylate với sự tham gia của enzyme citrate lyase và malate synthase và một số enzyme khác của chu trình TCA. Ngoài ra, khi pyruvate hoặc phosphoenolpyruvate dồi dào, các chất này được carboxyl hóa thành oxaloacetate.

4.15. Biến dưỡng lipid

Mỡ và lipid bị thủy phân bởi enzyme lipase thành glycerol và acid béo. Các acid béo có thể bị ôxi hóa bởi vi sinh vật, trong đó hai đơn vị carbon của acetyl CoA sẽ tuần tự được lấy ra khỏi mạch dài của phân tử acid béo. Sau đó, acetyl CoA được biến dưỡng trong chu trình TCA.

4.16. Biến dưỡng hydrocarbon

Các hydrocarbon mạch thẳng và mạch vòng thường chỉ chứa C và H. Bước đầu tiên trong sự biến dưỡng các hợp chất này thường là sự gắn thêm vào nguyên tử O từ O₂ bằng enzyme oxygenase. Đây là các enzyme chứa kim loại và thuộc một trong hai dạng: (1) dioxygenase gắn cả hai nguyên tử O của O₂ vào hợp chất và (2) monooxygenase gắn một nguyên tử O dưới dạng hydroxyl OH, nguyên tử O kia kết hợp với proton và điện tử từ NAD khử để tạo thành nước. Sau bước ôxi hóa khởi mào này, các hydrocarbon sẽ được chuyển hóa tiếp thành các acid hữu cơ và được biến dưỡng trong chu trình TCA.

4.17. Biến dưỡng nitrogen

Nitrogen cần cho sự sinh tổng hợp vật liệu tế bào được cung cấp từ nguồn hữu cơ (như amino acid) hoặc vô cơ. Hầu hết vi sinh vật sử dụng đạm vô cơ ở dạng NH₃ và NO₃⁻, một số vi khuẩn có thể khử N₂ để tổng hợp nitrogen hữu cơ (vi khuẩn cố định đạm).

Khi nồng độ NH₃ cao, enzyme glutamate dehydrogenase xúc tác sự gắn NH₃ vào các hợp chất hữu cơ. Ở nồng độ NH₃ thấp, hệ thống glutamine synthetase – glutamate synthase hoạt động hữu hiệu hơn chuyển NH₃ và α-ketoglutarate thành glutamate và tiêu tốn một ATP. Hoạt tính của enzyme glutamine synthetase được điều hòa theo nồng độ NH₃. Ở nồng độ NH₃ cao enzyme này bị adenyl hóa và giảm hoạt tính.

Cố định đạm (nitrogen fixation) là quá trình khử N₂ thành NH₃ được xúc tác bởi một phức hợp enzyme là nitrogenase. Một số vi sinh vật có thể thực hiện được quá trình này và gắn NH₃ vào glutamate như trên. Dinitrogenase là một thành phần của phức hợp nitrogenase có vai trò liên kết với một cofactor chứa nguyên tử sắt và molybden, khử N₂ thành NH₃. Thành phần thứ hai của phức hợp là dinitrogenase reductase có vai trò giúp sự truyền điện tử từ ferredoxin đến nitrogenase. Sự khử một phân tử N₂ cần sự thủy phân của 15 – 20 phân tử ATP. Sự thủy phân ATP làm giảm thế khử của dinitrogenase reductase để phản ứng xảy ra. Về lý thuyết 6 điện tử cần cho phản ứng xảy ra nhưng thực tế, 8 điện tử được tiêu thụ trong phản ứng trong đó 2 điện tử bị mất dưới dạng một phân tử H₂. Dinitrogenase reductase bị bất hoạt bởi O₂. Do vậy, trong tế bào vi khuẩn hiếu khí, cần sự hiện diện của một vi môi trường thiếu ôxi trong tế bào thì quá trình cố định đạm mới diễn ra. Hoạt tính của dinitrogenase được xác định dựa vào sự gắn phân tử acetylene. Enzyme này khử acetylene có nối ba thành ethylene nối đôi và được xác định bằng sắc ký khí.