

## **CHƯƠNG 5**

# **TIẾN HÓA VÀ ĐA DẠNG VI SINH VẬT**

Chương này đề cập đến sự đa dạng di truyền trong các nhóm vi sinh vật và nguồn gốc phát sinh của sự đa dạng này.

Hiện nay, người ta đã chứng minh rằng không có hoặc có rất ít nơi trên bề mặt trái đất mà không có sự hiện diện của vi khuẩn. Những biến đổi trong vật liệu di truyền của vi sinh vật đưa đến sự tiến hóa hình thành những dạng vi sinh vật mới. Mặc dù hầu hết những biến đổi di truyền là có hại đối với vi sinh vật, nhưng một số biến đổi lại mang lại cho tế bào những thuộc tính mới có lợi trong những môi trường sống nhất định. Sự tương tác giữa những biến đổi di truyền và sự chọn lọc của môi trường trong suốt lịch sử hình thành trái đất đã tạo nên sự đa dạng của vi sinh vật như ngày nay.

Trong chương này các đặc tính sinh học của những thành viên quan trọng trong ba giới: Vi khuẩn, Vi khuẩn cổ, Nhân thật sẽ được trình bày tóm tắt.

Trong giới Vi khuẩn, các nhóm vi khuẩn quan trọng sẽ được xếp nhóm dựa trên những đặc điểm kiểu hình kèm theo những thông tin quan trọng cần biết khi nghiên cứu về sinh thái học, bệnh học, sinh lý học hoặc vi sinh ứng dụng.

Mặc dù Archaea thuộc tế bào prokaryote nhưng chúng khác nhiều so với vi khuẩn cũng như khác nhiều so với tế bào eukaryote. Trước đây, giới Archaea được gọi là Archaeobacteria (vi khuẩn cổ), có đặc điểm sống được trong điều kiện môi trường cực đoan. Giới này được chia thành bốn nhóm: (1) nhóm sinh methane (methanogen), (2) nhóm ưa mặn (halophile), nhóm siêu ưa nhiệt (hyperthermophile) và giống Thermoplasma.

Các vi sinh vật nhân thật được đề cập là tảo (algae), nấm sợi (fungi), mốc nhày (slime mold) và nguyên sinh động vật (protozoa). Vi sinh vật nhân thật khác với vi khuẩn và archaea về nhiều khía cạnh như kích thước tế bào, cấu trúc bên trong tế bào, cấu trúc vật liệu di truyền và lịch sử tiến hóa.

### **1. Tiến hóa và hệ thống học phân tử vi sinh vật**

#### **1.1. Hình thành sự sống**

Trái đất được hình thành khoảng 4,6 tỷ năm. Vào thời gian đầu, trái đất rất nóng nhưng khoảng 3,8 tỷ năm trước đã có sự xuất hiện của nước. Những hóa thạch vi sinh đã được tìm thấy trong những hòn đá khoảng 3,5 tỷ năm.

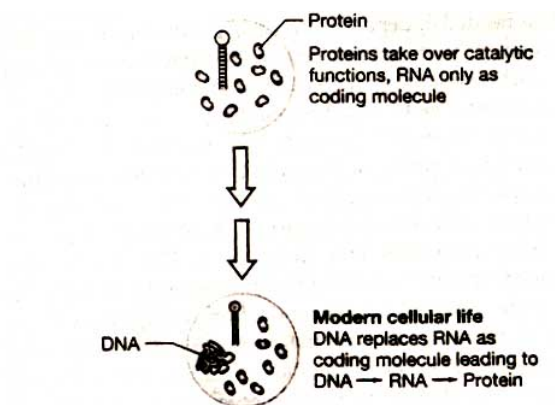
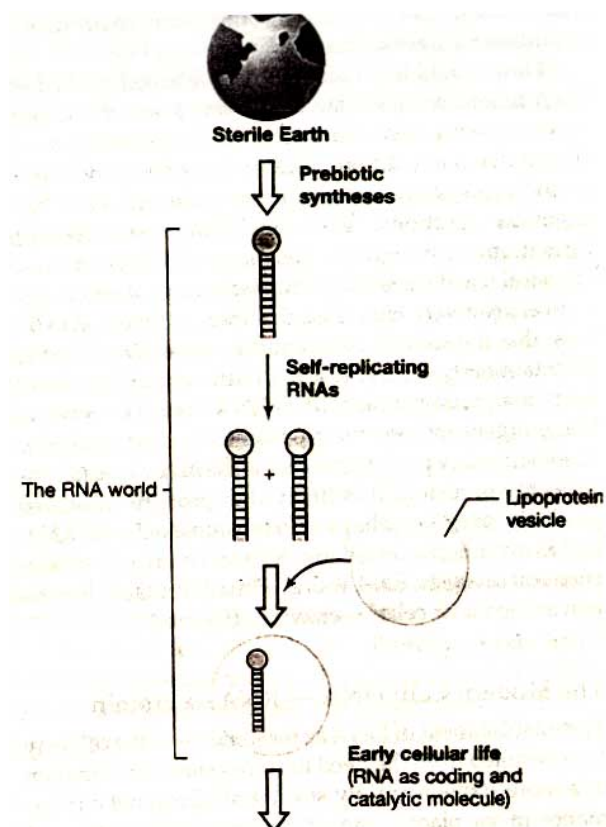
Vào thời gian đầu mới hình thành, khí quyển không chứa  $O_2$  nên vi sinh vật đầu tiên phải là loại kỵ khí và ưa nhiệt do nhiệt độ bề mặt trái đất rất cao. Người ta cho rằng các phản ứng hóa học được kích thích bởi chiếu xạ tử ngoại và tia điện đã tạo ra nhiều loại chất hữu cơ và các đại phân tử. Sự kết tụ của các phân tử đa phân được cho rằng đã làm cho tế bào có khả năng biến dưỡng và tự sao chép.

#### **1.2. Mã di truyền và sự tạo năng lượng ở tế bào nguyên thủy**

Dựa trên sự phát hiện rằng một số phân tử RNA có chức năng xúc tác (ribozyme) và với quan điểm là hệ thống có khả năng tự sao chép nguyên thủy phải rất đơn giản, được tổ chức từ những đại phân tử được tổng hợp bằng quang hóa qua một quá trình

chọn lọc tự nhiên và tiến hóa lâu dài, ngày nay nhiều nhà khoa học tin ở giả thiết cho rằng tế bào nguyên thủy không có DNA mà chỉ chứa phân tử RNA vừa có chức năng xúc tác vừa có chức năng mã hóa di truyền.

Theo giả thuyết này, tồn tại một giai đoạn sự sống RNA (RNA life), trong đó phân tử RNA có vai trò là tự sao chép và chỉ thực hiện một số phản ứng cần cho sao chép (Hình 5.1). Người ta đã phát hiện được một số phản ứng được xúc tác bởi các ribozyme như sự tổng hợp nucleotide từ đường và base nitric, phản ứng tạo liên kết peptide và nhiều phản ứng khác.



**FIGURE 12.3** Possible scenario for the evolution of cellular life-forms from RNA life-forms. Self-replicating RNAs could have become cellular entities by becoming stably integrated into lipoprotein vesicles. With time, proteins replaced the catalytic functions of RNA and DNA replaced the coding functions of RNA.

**Hình 5.1** Giả thuyết về sự hình thành và tiến hóa tế bào từ RNA

Phân tử RNA được tiến hóa thành dạng tế bào đầu tiên khi được bao bọc bởi các túi lipoprotein. Các túi này được hình thành do sự kết tụ ngẫu nhiên của protein và lipid.

Quá trình này diễn ra liên tục trong thời gian lâu dài để hình thành một tế bào nguyên thủy chứa RNA và các protein cần thiết. Mặc dù RNA có khả năng xúc tác nhiều loại phản ứng đa dạng nhưng tính chuyên biệt xúc tác không cao.

Khi tế bào cần có các phản ứng sinh hóa phức tạp hơn và cùng với sự xuất hiện của các phân tử protein, protein đã dần dần thay thế RNA ở chức năng xúc tác.

Sự hình thành và chọn lọc DNA làm phân tử di truyền là kết quả của áp lực chọn lọc vật chất bền hơn để chứa thông tin di truyền khi tế bào có nhiều chức năng và ngày càng phức tạp hơn. Phương thức lưu trữ mọi thông tin di truyền trong một chỗ nhất định trong tế bào, chỉ sử dụng thông tin cần thiết đáp ứng với những điều kiện nhất định của môi trường bên ngoài giúp cho tế bào tiết kiệm được năng lượng, làm tăng ưu thế tồn tại và phát triển của tế bào. Mặt khác, sự sao chép RNA (bởi RNA polymerase) là quá trình tạo ra tần số sai sót cao hơn so với DNA. Sự tiến hóa sinh học có xu hướng chọn

vật liệu di truyền có khả năng sao chép với độ tin cậy cao. Do vậy, DNA dần dần và cuối cùng thay thế RNA trong vai trò là vật liệu di truyền trong quá trình tiến hóa của tế bào.

Vào một giai đoạn nhất định trong quá trình tiến hóa, hệ thống dòng thông tin ba thành phần DNA-RNA-protein xuất hiện và được thiết lập trong tế bào. Tính ưu việt của hệ thống dòng thông tin ba thành phần này thể hiện ở thực tế là tất cả tế bào ngày nay đều có hệ thống thông tin này.

Tế bào nguyên thủy cần có phương thức đơn giản để thu nhận năng lượng. Phương thức biến dưỡng năng lượng ở tế bào này là kỵ khí và có lẽ là hóa năng vô cơ, khai thác nguồn FeS và H<sub>2</sub>S dồi dào có trong bề mặt trái đất lúc bấy giờ. Với phương thức này, chỉ cần có 3 loại protein là hydrogenase, S<sup>0</sup> reductase và ATPase là có thể thu được năng lượng (Hình 5.2).

### 1.3. Sự tiến hóa của các phương thức biến dưỡng năng lượng và sự hình thành ba giới sinh vật

Phương thức biến dưỡng lên men và hô hấp kỵ khí đã xuất hiện trễ hơn vì cần sự tham gia của nhiều loại protein hơn.

Sự hình thành vòng prophyrin là một bước then chốt trong tiến hóa của sinh vật do nó giúp thực hiện sự phosphoryl hóa bằng chuỗi truyền điện tử, nhờ vậy, các hợp chất hữu cơ không thể lên men có thể được sử dụng làm nguồn năng lượng bằng phương thức hô hấp kỵ khí.

Bước tiếp theo trong lịch sử tiến hóa của thế giới sống là sự hình thành các sắc tố quang tổng hợp như chlorophyll. Sử dụng phương thức quang tổng hợp không sinh ôxi giúp hình thành những sinh vật không còn lệ thuộc vào nguồn năng lượng là các chất hữu cơ.

Sự xuất hiện của phương thức quang tổng hợp sinh ôxi đã làm thay đổi căn bản trái đất và sự tiến hóa của nó. Sự tích tụ O<sub>2</sub> đã hình thành tầng ozon ngăn cản các tia tử ngoại mạnh đến được bề mặt trái đất. Khi đó vi sinh vật có thể tồn tại ở mọi nơi trên bề mặt địa cầu. Ôxi cũng tạo điều kiện cho sự xuất hiện của các prokaryote hiếu khí, các tế bào eukaryote và sau đó là các động vật đa bào, động vật và thực vật bậc cao.

Trong lịch sử tồn tại của sự sống trên trái đất, 80% thời gian sự sống chỉ bao gồm vi sinh vật.

Từ tế bào đầu tiên xuất hiện trên trái đất đã phân hóa thành 3 nhánh hậu thế là vi khuẩn (Bacteria), cổ vi khuẩn (Archaea) và tế bào nhân thật (Eukarya) (Hình 5.3).

### 1.4. Tế bào nhân thật và nguồn gốc của ti thể, lục thể

Các tế bào nhân thật ngày nay là hậu duệ của nhánh Eukarya. Các bào quan như ti thể và diệp lục thể trong tế bào nhân thật ngày nay có nguồn gốc là các tế bào tiền nhân nội cộng sinh (endosymbiont), trong đó một dạng là dị dưỡng hiếu khí và một dạng là tự dưỡng, đã cộng sinh trong các tế bào có nhân trong quá trình tiến hóa của Eukarya (Hình 5.4). Các thể nội cộng sinh này cung cấp năng lượng cho tế bào nhân thật và nhận từ tế bào chất dinh dưỡng và được bảo vệ bên trong tế bào. Theo thời gian, chúng mất khả năng tồn tại độc lập.

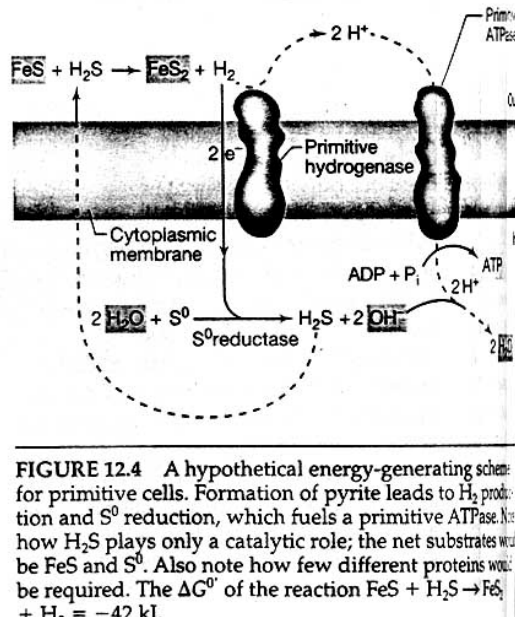
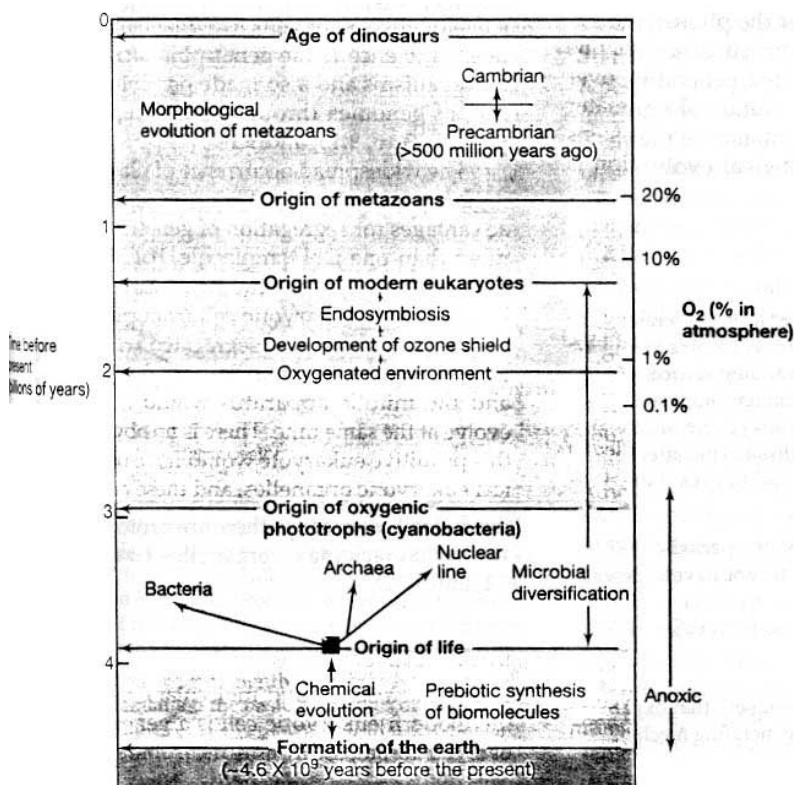


FIGURE 12.4 A hypothetical energy-generating scheme for primitive cells. Formation of pyrite leads to  $H_2$  production and  $S^0$  reduction, which fuels a primitive ATPase. Note how  $H_2S$  plays only a catalytic role; the net substrates would be  $FeS$  and  $S^0$ . Also note how few different proteins would be required. The  $\Delta G^0$  of the reaction  $FeS + H_2S \rightarrow FeS_2 + H_2$  is  $-42$  kJ.

Hình 5.2 Phương thức biến dưỡng năng lượng ở tế bào nguyên thủy với 3 loại protein



Hình 5.3 Sự hình thành 3 giới sinh vật

### 1.5. Phát sinh chủng loại và thước đo tiến hóa

Phát sinh chủng loại (phylogeny) là khoa học nghiên cứu mối quan hệ tiến hóa giữa các sinh vật. Các đặc tính kiểu hình của vi sinh vật không cung cấp nhiều thông tin về sự phát sinh chủng loại vi sinh vật. Gần đây, sự so sánh trình tự các đại phân tử có cùng chức năng ở các loài khác nhau cho phép phân tích cự ly tiến hóa (evolution distance), đặc biệt là phân tích và so sánh trình tự của rRNA ở tiểu phần nhỏ của ribosome.

Phương pháp này dựa trên giả định rằng khi hai vi sinh vật có cùng tổ tiên chung, có một đại phân tử có cùng chức năng thì nếu thời gian kể từ khi chúng tách khỏi tổ tiên chung càng dài thì số lượng các base khác biệt trên đại phân tử càng lớn.

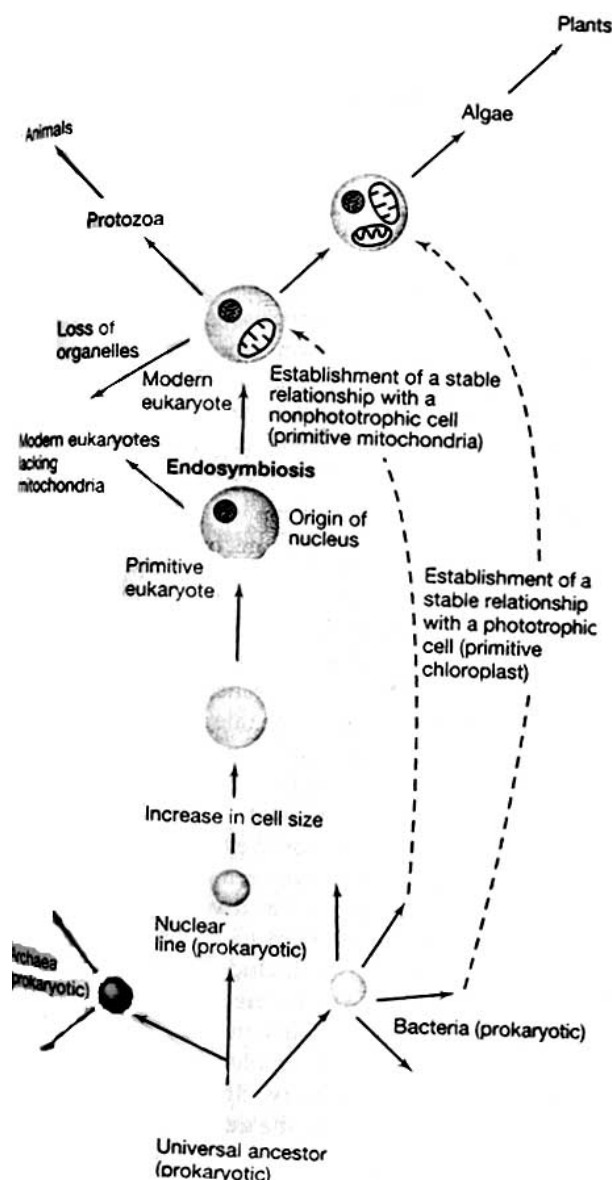
Đại phân tử được dùng để so sánh ở đây cần hiện diện rộng rãi trong sinh vật, có cùng chức năng và không tiến hóa quá nhanh để còn ghi nhận được sự tương đồng giữa các sinh vật có mối quan hệ tiến hóa khá xa nhau. Đại phân tử sinh học này được gọi là thước đo tiến hóa (evolutionary chronometer).

Phân tử rRNA 16S trong tiểu phần nhỏ của ribosome ở tế bào tiền nhân hay 18S ở tế bào nhân thật rất thích hợp cho vai trò của thước đo tiến hóa. Các phân tử này còn được gọi chung là rRNA tiểu phần nhỏ (small subunit rRNA, SSU rRNA).

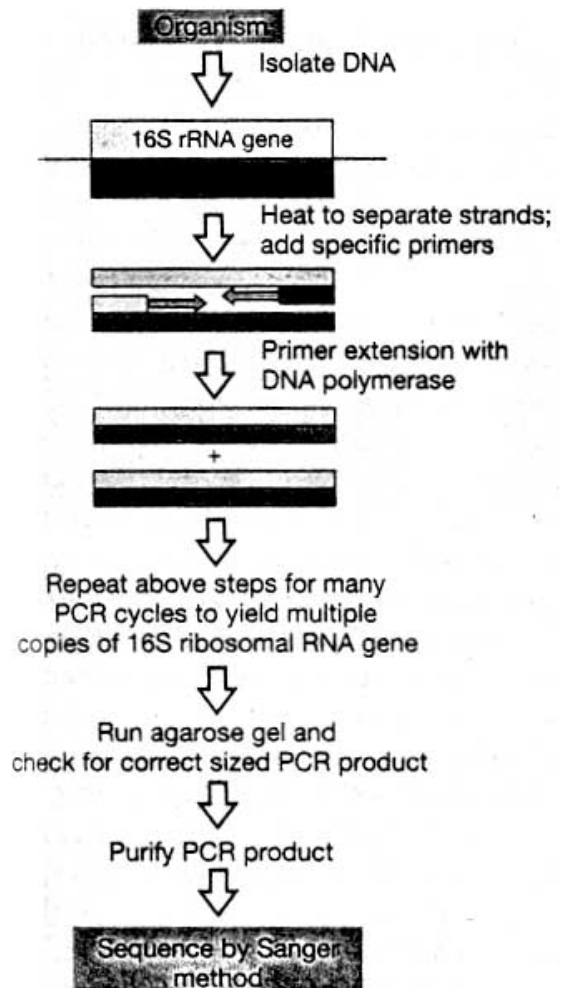


Phân tử này hiện diện trong tất cả vi sinh vật, có chức năng không đổi. Trình tự rRNA 16S hay 18S có thể dễ dàng phân tích bằng cách ly trích DNA từ tế bào, dùng phản ứng PCR với các môi DNA tương ứng với trình tự bảo tồn cao để khuếch đại gen mã hóa rRNA 16S, 18S và giải trình tự theo phương pháp Sanger (Hình 5.5).

Ngoài ra, phân tử này chứa đựng đồng thời những vùng tiến hóa nhanh và những vùng thay đổi chậm hơn nên có thể được sử dụng để xác định tương quan tiến hóa giữa hai loại cách nhau rất xa cũng như giữa hai loài rất gần nhau.



Hình 5.4 Sự hình thành bào quan ở tế bào nhân thật bằng nội cộng sinh



Hình 5.5 Giải trình tự SSU rRNA một chủng vi sinh vật dùng phản ứng PCR và phương pháp Sanger

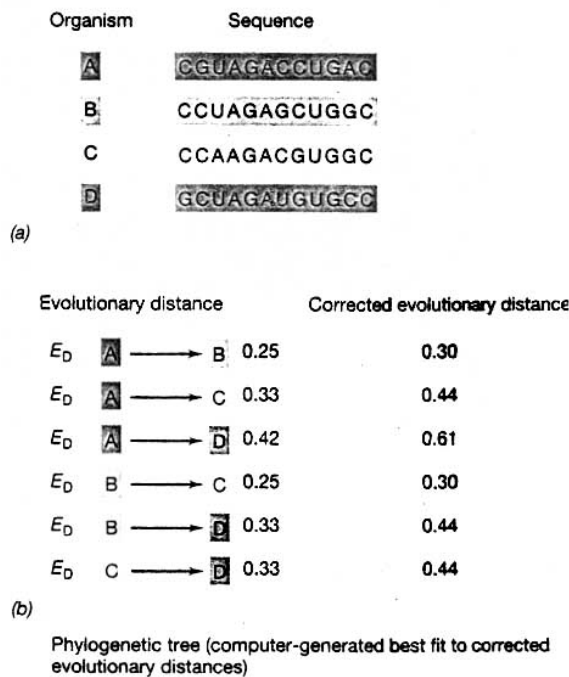
### 1.6. Cây phát sinh chủng loại

Cây phát sinh chủng loại (phylogenetic tree) có thể được xây dựng từ các trình tự RNA 16S bằng cách phân tích bằng máy tính những khác biệt về trình tự của từng cặp sinh vật. Thuật toán của máy tính giúp sắp xếp sinh vật theo một cây phân nhánh sao cho

thích hợp với tất cả tính toán về cự ly tiến hóa của từng cặp trình tự hay từng cặp sinh vật (Hình 5.6).

Ngày nay, đã có hơn 10.000 trình tự SSU rRNA đã được phân tích và sắp xếp trong một cơ sở dữ liệu gọi là Ribosomal Database Project (RDP). Có thể truy cập dữ liệu này bằng địa chỉ như sau: <http://www.cme.msu.edu>.

Các dữ liệu từ sự phân tích các trình tự rRNA cho phép xây dựng được cây phát sinh phát sinh chủng loại như Hình 5.7.



**Hình 5.6** Xây dựng một sơ đồ phát sinh chủng loại dựa vào trình tự SSU rRNA

**FIGURE 12.9** Preparing a phylogenetic distance-matrix tree from 16S ribosomal RNA sequences. For illustrative purposes, only short sequences are shown, but it should be considered that the sequences in (a) are representative of the entire 16S rRNA. The evolutionary distance ( $E_D$ ) in (b) is calculated as the percentage of nonidentical sequences between the RNAs of any two organisms. The corrected  $E_D$  is a statistical correction necessary to account for either back mutations to the original genotype or additional forward mutations at the same site that could have occurred. The tree (c) is ultimately generated by computer analysis of the data to give the best fit. The total length of the branches separating any two organisms is proportional to the calculated evolutionary distance between them. In actual analyses a statistical process called *bootstrapping* is often used whereby the computer generates hundreds of versions of the tree to confirm that the final tree is indeed the best fit to the data.

Về phương diện tiến hóa thế giới sự sống gồm có ba giới (domain) là giới Vi khuẩn (Bacteria), giới Vi khuẩn cổ (Archaea) và giới Nhân thật (Eukarya). Như vậy, sự phân loại sinh vật dựa trên kiểu hình thành 5 giới (kingdom) trong đó có một giới là prokaryote là không thể hiện chính xác mối quan hệ tiến hóa giữa các giới.

Cây phát sinh chủng loại đã làm sáng tỏ một số điểm sau đây: (1) Có hai nhánh tế bào prokaryote khác nhau là Bacteria và Archaea có cự ly tiến hóa giữa chúng xa hơn so với từng nhánh với Eukarya; (2) Mỗi nhánh được tiến hóa với tốc độ khác nhau; ví dụ như Archaea tiến hóa tương đối chậm trong khi nhánh Eukarya tiến hóa tương đối nhanh; (3) Ti thể và diệp lục thể trong tế bào eukaryote có nguồn gốc là các vi khuẩn nội cộng sinh.

Giới Vi khuẩn có thể được chia thành 12 nhóm (tương đương với ngành phylum) bao gồm nhiều dạng vi khuẩn có hình thái và sinh lý khác nhau. Điều này củng cố ý tưởng cho rằng các đặc tính kiểu hình là không đủ để xác định mối quan hệ tiến hóa giữa các vi sinh vật.

Có ba nhóm hoặc ba ngành trong giới Archaea, trong đó có hai nhóm là các vi khuẩn sinh methane và một là vi khuẩn sulfur. Nhóm vi khuẩn sulfur này bao gồm các vi khuẩn ưa nhiệt cực đoan và cần nguyên tố lưu huỳnh để tăng trưởng tối ưu, trong đó, nguyên tố lưu huỳnh có vai trò là chất nhận điện tử trong hô hấp kỵ khí.

Sự tiến hóa của các nhánh trong giới Eukarya được đặc trưng bởi những thời kỳ tiến hóa nhanh xen kẽ với những thời kỳ tiến hóa chậm. Sự tích tụ của O<sub>2</sub> trong khí quyển trái đất 1,5 tỷ năm trước là nguyên nhân dẫn đến sự tiến hóa nhanh.

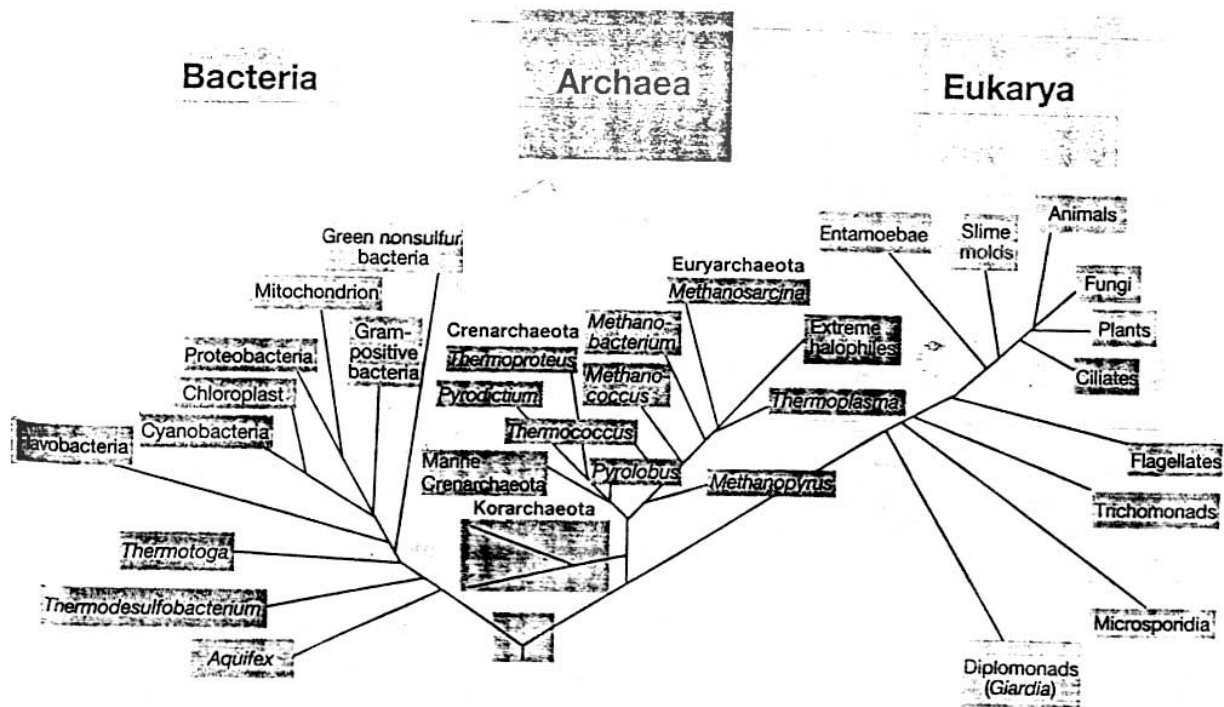


FIGURE 12.13 Universal phylogenetic tree as determined from comparative ribosomal RNA sequencing. The data support the separation of three domains, two of which (Bacteria and Archaea) contain only prokaryotic representatives. The location highlighted in red is the hypothetical root of the tree, which represents the position of the universal ancestor of all cells. See text for discussion of the Korarchaeota.

Hình 5.7 Cây phát sinh chủng loại thế giới sinh vật từ các trình tự SSU rRNA

### 1.7. Các trình tự nhận diện (signature sequence), mẫu dò phát sinh chủng loại (phylogenetic probe) và sinh thái học phân tử vi sinh vật (molecular microbial ecology)

Phân tích dữ liệu các trình tự SSU RNA đã biết còn cho phép xác định được các trình tự nhận diện (signature sequence) chuyên biệt cho từng giới (Bảng 5.1). Một số trình tự nhận diện cho một nhóm chuyên biệt trong giới, thậm chí một giống, một loài cũng đã được xác định. Trong tương lai, nhiều trình tự tương tự được xác định và sẽ rất hữu dụng trong việc nhận diện, định danh một vi sinh vật mới.

Các trình tự nhận diện chuyên biệt cho Vi khuẩn, Archaea hay Eukarya có thể được tổng hợp, đánh dấu bằng chất huỳnh quang và dùng để phát hiện chuyên biệt các giới này. Các mẫu dò này được gọi là mẫu dò phát sinh chủng loại.

Bằng việc xử lý mẫu chứa vi sinh vật bằng một tác nhân thích hợp làm tăng tính thấm của màng, cho phép mẫu dò vào bên trong tế bào, thực hiện phương pháp lai phân tử (lai *in-situ*, tức là lai trực tiếp trên tế bào trong mẫu) và quan sát dưới kính hiển vi

huỳnh quang, người ta có thể xác định trực tiếp chủng thuần thuộc giới nào hay quần xã vi sinh vật hiện diện trong một mẫu tự nhiên gồm những giới nào. Kỹ thuật này lai và phát hiện này được gọi là lai *in-situ* huỳnh quang FISH (fluorescence *in-situ* hybridization), được sử dụng rộng rãi trong nghiên cứu sinh thái học vi sinh vật và trong chẩn đoán bệnh.

**Bảng 5.1** Các trình tự nhận diện chuyên biệt của ba giới

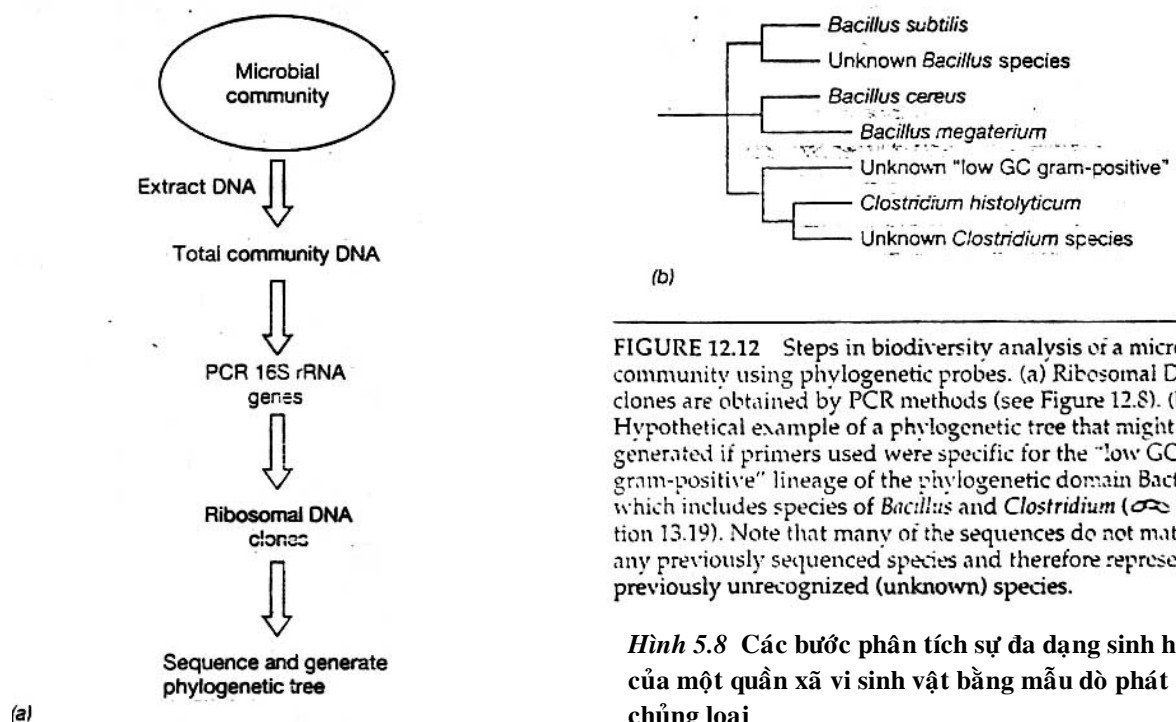
Signature sequences from 16S or 18S rRNA defining the three domains of life				
Oligonucleotide signatures <sup>a</sup>	Approximate position <sup>b</sup>	Occurrence among <sup>c</sup>		
		Archaea	Bacteria	Eukarya
CACYYG	515	0	>95	0
CYAAYUNYG	510	0	>95	0
AAACUCAAA	910	3	100	0
AAACUAAAAG	910	100	0	100
NUJAAUUCG	960	0	>95	0
YUYAAUUG	960	100	<1	100
CAACCCYCR	1110	0	>95	0
UUCGCC	1380	0	>95	0
UCCUG	1380	>95	0	100
CUCCUUG	1390	>95	0	0
UACACACCG	1400	0	>99	100
CACACACCG	1400	100	0	0

<sup>a</sup> Y, Any pyrimidine; R, any purine; N, any purine or pyrimidine.

<sup>b</sup> Refer to Figure 12.7c for numbering scheme of 16S rRNA.

<sup>c</sup> Occurrence refers to percentage of organisms examined in any domain that contain that sequence.

Ngoài phương pháp FISH này, ngày nay, kỹ thuật giải trình tự rRNA còn được dùng trong sinh thái học vi sinh vật. Kỹ thuật này được dùng để phân tích phát sinh chủng loại của các quần xã vi sinh vật mà không cần phân lập, nuôi cấy chủng vi sinh vật. Trong trường hợp này, tổng DNA của quần xã của vi sinh vật được ly trích, khuếch đại bằng PCR, tạo các dòng riêng biệt, ly trích DNA, giải trình tự và xây dựng cây phát sinh chủng loại (Hình 5.8).



**FIGURE 12.12** Steps in biodiversity analysis of a microbial community using phylogenetic probes. (a) Ribosomal DNA clones are obtained by PCR methods (see Figure 12.8). (b) Hypothetical example of a phylogenetic tree that might be generated if primers used were specific for the "low GC gram-positive" lineage of the phylogenetic domain Bacteria, which includes species of *Bacillus* and *Clostridium* (see Section 13.19). Note that many of the sequences do not match any previously sequenced species and therefore represent previously unrecognized (unknown) species.

**Hình 5.8** Các bước phân tích sự đa dạng sinh học của một quần xã vi sinh vật bằng mẫu dò phát sinh chủng loại



Các kết quả phân tích cho thấy hầu hết các quần xã trong tự nhiên đều chứa thành phần khác nhiều so với kết quả nghiên cứu bằng phương pháp phân lập và nuôi cấy. Trong đa số trường hợp, các quần xã đều có chứa thành phần loài mới mà trước đây chưa được phát hiện. Khoa học nghiên cứu sinh thái vi sinh vật học bằng kỹ thuật phân tích SSU rRNA được gọi là sinh thái học phân tử vi sinh vật.

### 1.8. Một số đặc trưng kiểu hình của các giới

Một số đặc trưng phân biệt giữa các giới được tổng hợp trên *Bảng 5.2* và *Bảng 5.3*.

**Bảng 5.2** Tính mẫn cảm của một số đại diện của ba giới đối với các chất ức chế sinh tổng hợp

		Archaea		Bacteria	Eukarya
		Euryarchaeota	Crenarchaeota		
		<i>Methanobacterium thermoautotrophicum</i>	<i>Sulfolobus acidocaldarius</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Antibiotics	Mode of action				
Fusidic acid, sparsomycin	Inhibits elongation steps	+	–	+	+
Anisomycin, nalciclasine	Inhibits peptidyl transfer	+	–	–	+
Cycloheximide	Blocks initiation	–	–	–	+
Erythromycin, streptomycin, chloramphenicol	Increases error frequencies and other effects	–	–	+	–
Virginiamycin, pulvomycin	Inhibits elongation steps	+	–	+	–
Neomycin, puromycin	Causes premature termination	+	+	+	+
Rifamycin	Inhibits $\beta$ subunit of RNA polymerase	–	–	+	–

a A + indicates that protein synthesis (and growth) is inhibited.

Vách tế bào vi khuẩn chứa peptidoglycan, hầu hết Archaea chứa glycoprotein trong vách tế bào, trong khi đó vách tế bào nhân thật không chứa cả loại polysaccharide này, thay vào đó là cellulose hoặc chitin.

Thành phần lipid của Archaea chứa các liên kết ether giữa glycerol và acid béo trong khi Bacteria và Eukarya chứa liên kết ester.

Các tế bào thuộc ba giới khác nhau về chủng loại và độ phức tạp của các tiểu phần của RNA polymerase. Bacteria chỉ có một loại RNA polymerase gồm bốn tiểu phần khác nhau. Archaea có ít nhất hai loại RNA polymerase và mỗi enzyme có 8 – 10 polypeptid. Tế bào nhân thật có ít nhất ba loại RNA polymerase, loại RNA phổ biến nhất chứa 10 – 12 polypeptid.

Sự sinh tổng hợp protein ở Bacteria và Archaea được thực hiện trên ribosome có kích thước 70S trong khi ribosome của tế bào nhân thật có kích thước to hơn. Ở vi khuẩn, formylmethionine là amino acid đầu tiên được gắn vào protein trong khi ở Archaea và Eukarya luôn luôn là methionine. Các tác nhân ức chế sinh tổng hợp protein ở vi khuẩn thì không có ảnh hưởng đến quá trình này ở tế bào hai giới còn lại. Ngược lại, độc tố diphtheria toxin ức chế sinh tổng hợp protein ở tế bào Archaea và Eukarya nhưng không có tác dụng ở Bacteria.

### 1.9. Phân loại học truyền thống và phân loại học phân tử

Phân loại học vi khuẩn sắp xếp các loại vi khuẩn dựa trên các đặc điểm kiểu hình và khá hữu dụng trong định danh chủng mới. Đơn vị phân loại cơ bản là loài, là

những chủng có đặc điểm kiểu hình giống nhau. Các bộ sưu tập giống thường lưu giữ các chủng điển hình (type strain) dùng làm chủng chuẩn có các đặc điểm của loài.

**Bảng 5.3** Các đặc trưng phân biệt ba giới sinh vật

<b>TABLE 12.3 Summary of major differentiating features among Bacteria, Archaea, and Eukarya<sup>a</sup></b>			
<b>Characteristic</b>	<b>Bacteria</b>	<b>Archaea</b>	<b>Eukarya</b>
Prokaryotic cell structure	Yes	Yes	No
DNA present in covalently closed and circular form	Yes	Yes	No
Histone proteins present	No	Yes	Yes
Membrane-enclosed nucleus	Absent	Absent	Present
Cell wall	Muramic acid present	Muramic acid absent	Muramic acid absent
Membrane lipids	Ester-linked	Ether-linked	Ester-linked
Ribosomes	70S	70S	80S
Initiator tRNA	Formylmethionine	Methionine	Methionine
Introns in most genes	No	No	Yes
Operons	Yes	Yes	No
Capping and poly-A tailing of mRNA	No	No	Yes
Plasmids	Yes	Yes	Rare
Ribosome sensitivity to diphtheria toxin	No	Yes	Yes
RNA polymerases (see Figure 12.16)	One (4 subunits)	Several (8–12 subunits each)	Three (12–14 subunits each)
Transcription factors required (see Section 6.8)	No	Yes	Yes
Promoter structure (see Sections 6.7 and 6.8)	–10 and –35 sequences (Pribnow box)	TATA box	TATA box
Sensitivity to chloramphenicol, streptomycin, and kanamycin	Yes	No	No
Methanogenesis	No	Yes	No
Reduction of S <sup>0</sup> to H <sub>2</sub> S or Fe <sup>3+</sup> to Fe <sup>2+</sup>	Yes	Yes	No
Nitrification	Yes	No	No
Denitrification	Yes	Yes	No
Nitrogen fixation	Yes	Yes	No
Chlorophyll-based photosynthesis	Yes	No	Yes (in chloroplasts)
Chemolithotrophy (Fe, S, H <sub>2</sub> )	Yes	Yes	No
Gas vesicles	Yes	Yes	No
Synthesis of carbon storage granules composed of poly-β-hydroxyalkanoates	Yes	Yes	No
Growth above 80°C	Yes	Yes	No

<sup>a</sup> Note that for many features only particular representatives within a domain show the property.

Trong phân loại học truyền thống, một số đặc điểm kiểu hình được coi trọng như nhuộm Gram, hình thái tế bào và sự hiện diện của các cấu trúc tế bào như nội bào tử. Trong phân loại số học (numerical taxonomy), tất cả đặc điểm kiểu hình đều có giá trị ngang nhau trong sắp xếp các chủng.

Khóa phân loại Bergey (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology) gồm các đặc tính kiểu hình dùng để sắp xếp vi khuẩn theo phân loại truyền thống và các khóa dùng để định danh một chủng mới dựa theo các đặc điểm kiểu hình.

Một số phân tích về nucleic acid đã được đưa vào phương pháp phân loại truyền thống như thành phần GC và lai nucleic acid.

Thành phần base của DNA chỉ có tác dụng chứng minh các vi khuẩn là không có liên hệ với nhau. Tỷ lệ các base trong DNA có thể thay đổi trong phạm vi rất rộng. Nếu hai vi sinh vật có thành phần base khác nhau thì chúng không có liên hệ với nhau. Tuy nhiên, hai vi khuẩn có cùng thành phần base chưa hẳn là có quan hệ với nhau do trình tự base có thể hoàn toàn khác nhau.

Việc lai giữa DNA của hai vi khuẩn cho phép định danh một loài mới hoặc xác định mối quan hệ đến mức giống và loài giữa hai vi khuẩn.

Để xác định mối quan hệ giữa các chủng, thông thường người ta so sánh phần trăm lai (DNA-DNA) giữa chủng cần khảo sát với một chủng đã biết (chủng chuẩn) (Hình 5.9).

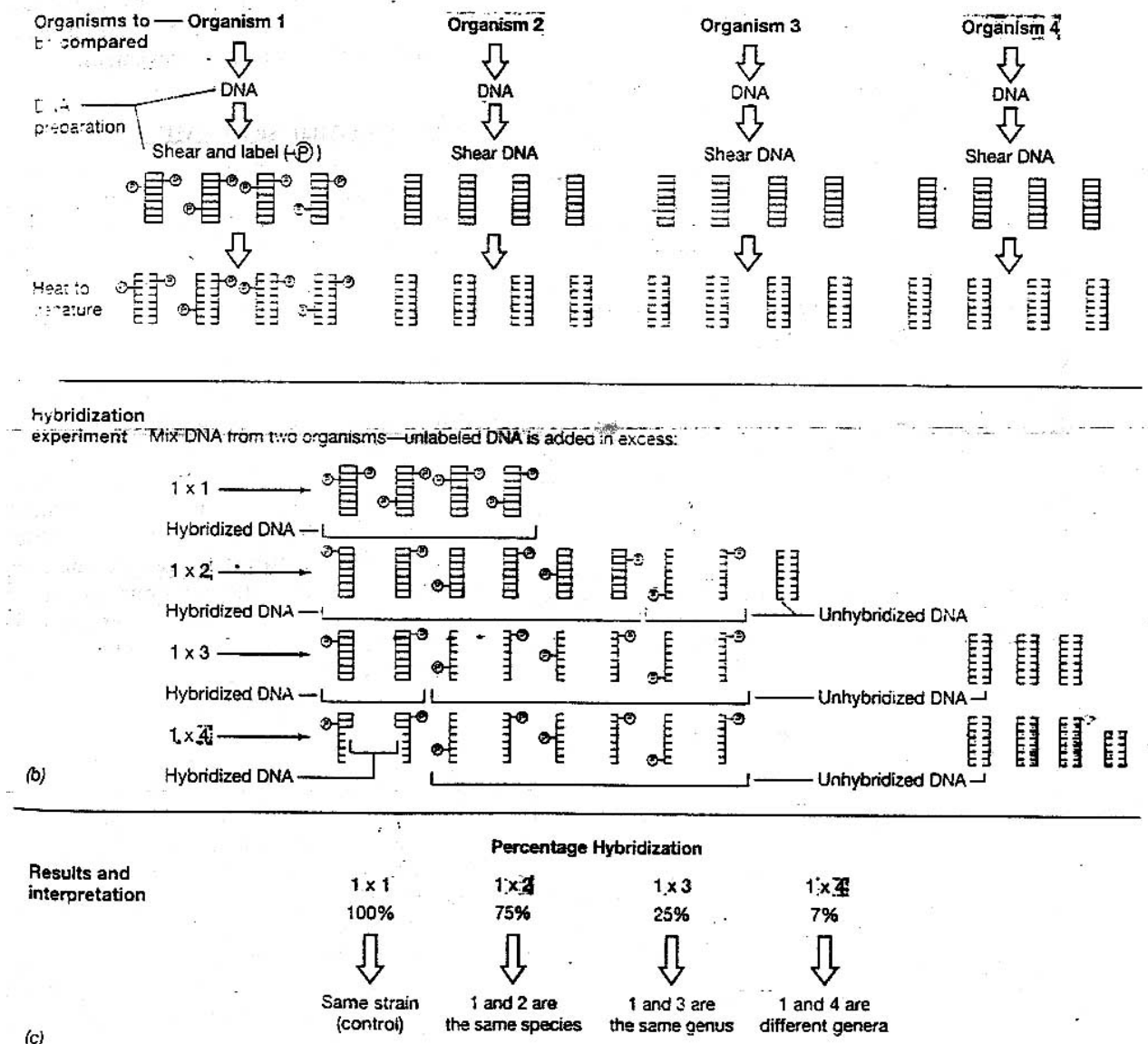


FIGURE 12.19 Genomic hybridization as a taxonomic tool. (a) DNA is isolated from test organisms. One of the DNAs is labeled (shown here as radioactive phosphate in the DNA of Organism 1). (b) Actual hybridization experiment. All combinations are tried and excess unlabeled DNA is added in each experiment to prevent labeled DNA from reannealing with itself. Following hybridization, hybridized DNA is separated from unhybridized DNA before measuring radioactivity in the hybridized DNA only. (c) Results. Radioactivity in the control is taken as the 100% hybridization value.

Hình 5.9 Phân loại vi sinh vật bằng kỹ thuật lai phân tử (DNA-DNA) và tính phần trăm lai

DNA từ chủng chuẩn được ly trích, tinh chế từ, đánh dấu bằng đồng vị phóng xạ, phân đoạn thành những đoạn ngắn có chiều dài ngẫu nhiên, đun nóng để tách mạch. DNA từ các chủng cần khảo sát cũng được chuẩn bị tương tự nhưng không được đánh

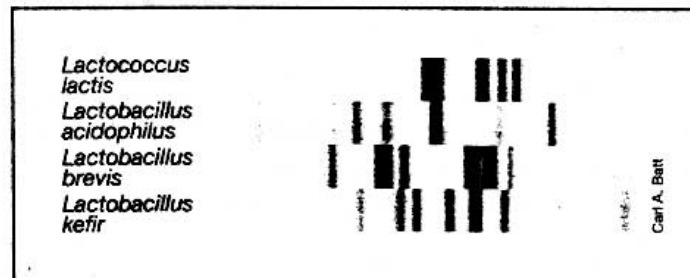
dấu. Tiến hành lai mẫu DNA chủng chuẩn với nhau (đối chứng). Sau đó tuần tự lai DNA chủng chuẩn với DNA chủng cần khảo sát. Thu lấy DNA mạch kép (có lai), loại bỏ DNA mạch đơn. Đo năng lượng phóng xạ của trường hợp đối chứng. Lượng này được xem là tương đương 100% lai. Tương tự, tính năng lượng phóng xạ thu được từ các trường hợp lai giữa chủng chuẩn với chủng khảo sát. Tính phần trăm lai.

Từ số liệu về mức độ lai có thể xác định mối tương quan giữa các chủng như sau:

- Trên 70% lai: hai chủng cùng loài (khác chủng)
- Trên 20% lai: hai chủng cùng giống
- Dưới 10%: hai chủng khác giống.

Gần đây, hai kỹ thuật mới đã được thiết lập giúp định danh vi sinh vật dựa trên phân tử là ribotyping, FAME.

Kỹ thuật ribotyping cũng phân tích SSU rRNA (nhưng không giải trình tự) giúp định danh vi sinh vật đến mức loài. Kỹ thuật này khai thác đặc điểm là sự sai khác trong trình tự SSU rRNA của các loài khác nhau dẫn đến sự khác biệt về trình tự nhận diện của các enzyme cắt giới hạn. Do vậy, gen mã hóa SSU rRNA được khuếch đại bằng PCR, cắt bằng một hoặc vài enzyme cắt giới hạn, tách bằng điện di, chuyển thấm lên màng và lai bằng các mẫu dò. Các vạch lai là chuyên biệt cho từng loài và chủng vi sinh vật, được đưa vào cơ sở dữ liệu và được sử dụng như là các mã vạch để định danh vi sinh vật. Kỹ thuật này nhanh hơn kỹ thuật giải trình tự, mặc khác lại rất chuyên biệt nên được ứng dụng rộng rãi trong chẩn đoán bệnh, phân tích vi sinh thực phẩm, nước... (Hình 5.10).



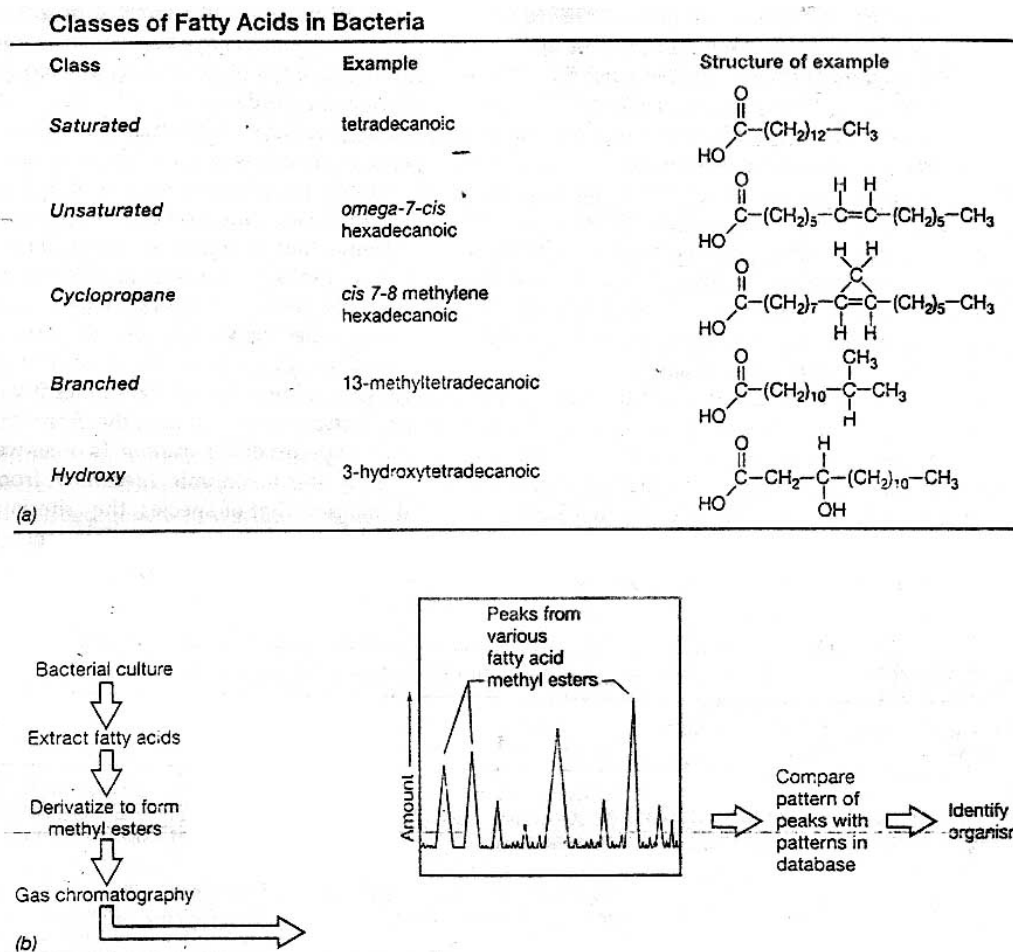
**FIGURE 12.20** Ribotyping. Ribotype results from four different lactic acid bacteria. The pattern of DNA fragments generated from restriction enzyme digestion of DNA taken from a colony of each bacterium and then probed with 16S rRNA genes is unique to a species or even to strains within a species. The patterns generated on a gel with known organisms are digitized and stored in a database for comparisons in identifying environmental or clinical isolates. Variations in both *position* and *intensity* of the bands are important in identification.

**Hình 5.10** Mã vạch di truyền thu được bằng kỹ thuật ribotyping

Kỹ thuật FAME (fatty acid methyl ester) dựa trên tính chuyên biệt về chủng loại và thành phần các acid béo hiện diện trong màng tế bào vi khuẩn. Tính chuyên biệt này là do sự đa dạng về chiều dài mạch, nhóm thế, vòng, hydroxyl, độ không bão hòa... của acid béo trong màng. Việc phân tích dẫn xuất methyl ester của các acid béo này ngày



càng được dùng rộng rãi trong chẩn đoán bệnh, dịch tễ học, xét nghiệm vi sinh vật nước, thực phẩm... (Hình 5.11).



**FIGURE 12.21** Fatty acid methyl ester (FAME) analysis in bacterial identification. (a) Classes of fatty acids in Bacteria. Only a single example is given of each class, but in actuality, more than 200 different fatty acids have been discovered from bacterial sources. A methyl ester contains a methyl group ( $\text{CH}_3$ ) in place of the proton on the carboxylic acid group ( $\text{COOH}$ ) of the fatty acid. (b) Procedure. Each peak from the gas chromatograph is due to one particular fatty acid methyl ester and the peak height is proportional to the amount.

**Hình 5.11** Phân loại và định danh vi khuẩn bằng kỹ thuật FAME

## 2. Giới Vi khuẩn (Bacteria)

### 2.1. Vi khuẩn tía-lục quang năng

Vi khuẩn tía (purple bacteria) và vi khuẩn lục (green bacteria) là các vi khuẩn tạo ra sắc tố bacteriochlorophyll (diệp lục tố vi khuẩn) và có khả năng quang tổng hợp. Các vi khuẩn tía chứa loại bacteriochlorophyll khác với vi khuẩn lục. Ngoài ra, vi khuẩn lục còn chứa lục thể (chlorosome) gắn vào màng tế bào chất. Vi khuẩn tía cố định  $\text{CO}_2$  bằng chu trình Calvin trong khi đó vi khuẩn lục thì sử dụng chu trình khác.

Sự tăng trưởng theo phương thức quang tổng hợp chỉ được thực hiện trong điều kiện kỵ khí. Tất cả các loài vi khuẩn tía lưu huỳnh và vi khuẩn lục lưu huỳnh đều có thể sử dụng hợp chất khử của lưu huỳnh làm chất cho điện tử để tạo lực khử. Vi khuẩn lục *Chloroflexus* và vi khuẩn tía không lưu huỳnh (non-sulfur purple bacteria) sử dụng hợp

chất hữu cơ để tạo lực khử NADPH trong quang tổng hợp không tạo ôxi. Ngoài ra các vi khuẩn nêu trên còn có thể tăng trưởng hiếu khí bằng phương thức hóa hữu cơ dị dưỡng.

## 2.2. Vi khuẩn lam

Hầu hết các loài vi khuẩn lam (cyanobacteria) là dạng quang tự dưỡng sinh ôxi bắt buộc, cố định  $\text{CO}_2$  bằng chu trình Calvin. Chúng chứa các sắc tố quang hợp là chlorophyll a và phycobilin. Vi khuẩn lam rất đa dạng về hình thái có thể ở dạng đơn bào hay dạng sợi. Ngoài ra, một số loài còn tạo được các tế bào phân hóa như akinetes là dạng tế bào nghỉ và heterocyst là tế bào chuyên cố định  $\text{N}_2$ .

## 2.3. Tiền lập khuẩn

Tiền lập khuẩn (Prochlorophyte) là các loài prokaryote chứa diệp lục tố chlorophyll a và b, quang tổng hợp sinh ôxi tương tự như chloroplast ở thực vật.

## 2.4. Vi khuẩn hóa năng vô cơ

Các loài hóa năng vô cơ (chemolithotroph) là các vi khuẩn có khả năng dùng hợp chất vô cơ khử làm nguồn năng lượng. Chúng có khả năng tiến hành quang tổng hợp, cố định  $\text{CO}_2$  bằng chu trình Calvin. Ngoài ra, rất nhiều loài vi khuẩn này còn có thể tăng trưởng bằng phương thức hóa năng hữu cơ.

Nhóm hóa năng vô cơ lại được chia thành các nhóm khác nhau dựa vào loại hợp chất vô cơ dùng làm nguồn năng lượng.

Vi khuẩn nitrate hóa (nitrifying bacteria) gồm hai nhóm là vi khuẩn nitrite hóa có khả năng ôxi hóa  $\text{NH}_3$  thành nitrite ( $\text{NO}_2^-$ ) và vi khuẩn nitrate hóa có khả năng ôxi hóa nitrite thành nitrate ( $\text{NO}_3^-$ ). Các vi khuẩn nitrate hóa có hệ thống màng nội bào rất phát triển.

Nhóm vi khuẩn ôxi hóa lưu huỳnh (sulfur-oxidizing bacteria) là các vi khuẩn có khả năng ôxi hóa các hợp chất khử của lưu huỳnh thành sulfuric acid ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ). Một số loài thuộc nhóm này có thể tăng trưởng được ở pH rất thấp.

Nhóm vi khuẩn ôxi hóa hydrogen hóa năng vô cơ (hydrogen-oxidizing bacteria) là các vi khuẩn hóa năng vô cơ tùy ý vì chúng cũng có thể tăng trưởng theo phương thức hóa năng hữu cơ. Đây là tên gọi chung cho một nhóm gồm nhiều giống vi khuẩn khác nhau có thể tăng trưởng hóa năng vô cơ trên hydrogen nhờ hoạt tính của enzyme hydrogenase liên kết với một hệ thống chuyển điện tử và tạo ra động lực proton.

## 2.4. Vi khuẩn dinh dưỡng methyl

Nhóm dinh dưỡng methyl (methylotroph) là một nhóm lớn các giống vi khuẩn có khả năng ôxi hóa hợp chất hữu cơ chứa một carbon như methanol, methylamine, formate hoặc các dẫn xuất của methyl (Bảng 5.4). Trong nhóm này, nhóm dinh dưỡng methane (methanotroph) là nhóm chuyên biệt hơn chỉ có thể sử dụng methane để tăng trưởng. Các vi khuẩn dinh dưỡng methane đều là vi khuẩn hiếu khí do enzyme đầu tiên trong chuỗi các phản ứng ôxi hóa methane là oxygenase. Nhóm methanotroph còn được phân thành hai nhóm nhỏ khác nhau bởi các con đường đồng hóa carbon và bởi các sắp xếp của màng bên trong tế bào.

Bảng 5.4 Cơ chất sử dụng bởi vi khuẩn dinh dưỡng methyl

TABLE 13.7	Substrates used by methylotrophic bacteria <sup>a</sup>
Substrates used for growth	Substrates oxidized but not used for growth (cometabolism)
Methane, CH <sub>4</sub> Methanol, CH <sub>3</sub> OH Methylamine, CH <sub>3</sub> NH <sub>2</sub> Dimethylamine, (CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> NH Trimethylamine, (CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> N Tetramethylammonium, (CH <sub>3</sub> ) <sub>4</sub> N <sup>+</sup> Trimethylamine N-oxide, (CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> NO Trimethylsulfonium, (CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> S <sup>+</sup> Formate, HCOO <sup>-</sup> Formamide, HCONH <sub>2</sub> Carbon monoxide, CO Dimethyl ether, (CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> O Dimethyl carbonate, CH <sub>3</sub> OCOOCH <sub>3</sub> Dimethyl sulfoxide, (CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> SO Dimethylsulfide, (CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> S	Ammonium, NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> Ethylene, H <sub>2</sub> C=CH <sub>2</sub> Chloromethane, CH <sub>3</sub> Cl Bromomethane, CH <sub>3</sub> Br Higher hydrocarbons (ethane, propane)

<sup>a</sup> A single isolate does not use all of the above, but at least one methylotrophic bacterium has been reported to oxidize each of the listed compounds.

### 2.5. Vi khuẩn khử sulfate

Các nhóm vi khuẩn khử sulfate và khử lưu huỳnh (sulfate- and sulfur-reducing bacteria) là các vi khuẩn kỵ khí bắt buộc sử dụng hợp chất hữu cơ làm nguồn năng lượng, trong đó sulfate và sulfur được dùng làm chất nhận điện tử sau cùng trong hô hấp kỵ khí, tạo ra hydrogen sulfide H<sub>2</sub>S.

Người ta chia nhóm này thành hai nhóm sinh lý khác nhau là nhóm chỉ có khả năng ôxi hóa chất hữu cơ đến acetate và nhóm có khả năng ôxi hóa hoàn toàn acid béo thành CO<sub>2</sub>.

Nhóm vi khuẩn khử sulfate và sulfur có vai trò quan trọng về địa hóa và hiện diện phổ biến trong các môi trường giàu sulfate nơi mà sự phân hủy các chất hữu cơ bởi vi sinh vật đã hình thành nên môi trường kỵ khí.

### 2.6. Vi khuẩn sinh acetate đồng hình

Nhóm vi khuẩn sinh acetate đồng hình (homoacetogenic bacteria) là nhóm các vi khuẩn tăng trưởng kỵ khí bằng cách sử dụng CO<sub>2</sub> làm chất nhận điện tử cuối cùng trong hô hấp kỵ khí tạo ra acetate hoặc bằng sự lên men đường để tạo ra acetate.

Các vi khuẩn này dùng con đường acetyl CoA để khử CO<sub>2</sub> thành acetate (con đường này cũng được sử dụng bởi các vi khuẩn sinh methane (methanogen) và vi khuẩn khử sulfate khi chúng tăng trưởng theo phương thức tự dưỡng).

### 2.7. Vi khuẩn nảy chồi, có mấu

Vi khuẩn nảy chồi, có mấu (budding and appendage, prosthecate bacteria) là nhóm các vi khuẩn có nhiều cấu trúc do tế bào chất nhô ra. Các cấu trúc này khác tiên mao và khuẩn ở chỗ chúng có chứa tế bào chất và được bao bọc bởi vách tế bào.

Nhóm vi khuẩn này rất đa dạng về sinh lý và là đối tượng tốt để nghiên cứu về sự phân hóa của tế bào do sản phẩm của sự phân bào (hai tế bào con) là không đồng

nhất, khác với trường hợp sự phân bào, cắt đôi bình thường (Hình 5.12). Hai loại điển hình của nhóm này là vi khuẩn có cuống (stalked bacteria) và vi khuẩn nảy chồi (budding bacteria).

### 2.8. *Spirilla*

*Spirilla* là nhóm đa dạng các vi khuẩn có hình xoắn, hóa năng hữu cơ hiếu khí, trong đó nhiều loài có vai trò quan trọng trong việc phân hủy các chất hữu cơ trong môi trường. Một số loài thuộc nhóm này có tính hướng từ (magnetotaxis) do thỏi từ (magnetite) bên trong tế bào, một số có khả năng ăn vi khuẩn khác (vi khuẩn ăn thịt, predatory bacteria).

### 2.9. *Spirochetes*

*Spirochetes* là nhóm các vi khuẩn cũng có dạng xoắn nhưng có cơ chế di động rất đặc biệt. Ở mỗi đầu của tế bào có các sợi lông trục (axial fibril) có thành phần hóa học giống tiên mao nhưng bị quấn quanh tế bào. Sự quay của các lông trục khiến tế bào bị vặn xoắn như con rắn giúp tế bào di động.

### 2.10. Vi khuẩn trượt

Vi khuẩn trượt (gliding bacteria) không có tiên mao nhưng có thể tự trượt trên một bề mặt. Cơ chế chính xác của kiểu di động bằng cách trượt này chưa được hiểu rõ nhưng có thể có liên quan đến những cấu trúc quay gần bề mặt tế bào hoặc do sự tiết của chất hoạt động bề mặt. Một nhóm vi khuẩn trượt được gọi là khuẩn nhầy tạo quả thể (fruiting myxobacteria) có chu kỳ sống phức tạp, cuối cùng là sự hình thành quả thể chứa các bào tử nhầy (myxospore) là trạng thái nghỉ của tế bào (Hình 5.13). Việc hình thành thể quả cần sự phối hợp của nhiều tế bào được kết tụ với nhau theo cơ chế đáp ứng hướng hóa.

### 2.11. Vi khuẩn áo giáp

Vi khuẩn áo giáp (sheathed bacteria) là nhóm gồm ba giống vi khuẩn có chu kỳ sống đặc trưng với sự hình thành các bào tử động có tiên mao bên trong một ống hay bao (áo giáp). Khi điều kiện môi trường thuận lợi, các tế bào nằm bên trong bao. Khi bị stress, tế bào rời bao để tìm môi trường sống thích hợp hơn.

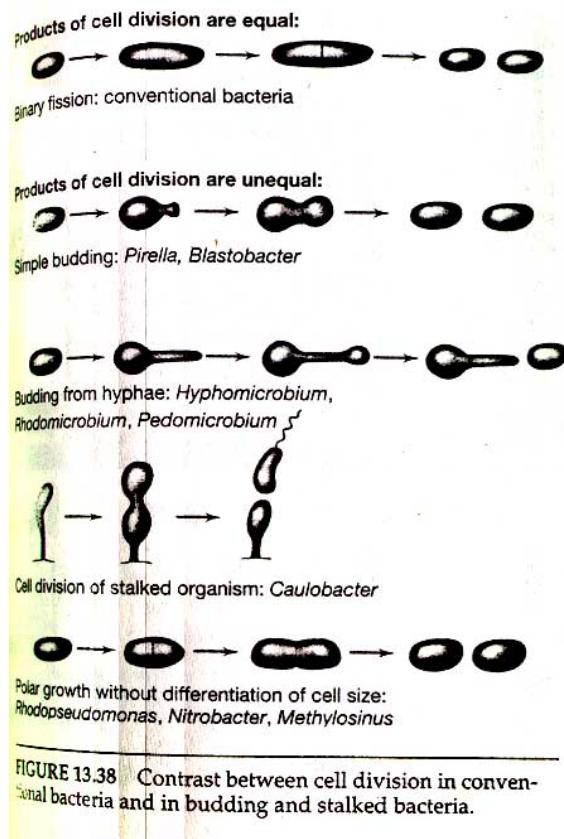
### 2.12. *Pseudomonas*

*Pseudomonas* là một giống quan trọng gồm các vi khuẩn hình que, Gram âm có tiên mao ở một đầu, hóa năng hữu cơ hiếu khí, không lên men. Nhóm này có thể biến dưỡng nhiều loại hợp chất hữu cơ khác nhau nhưng không có khả năng phân hủy polymer.

### 2.13. Vi khuẩn cố định đạm tự do

Vi khuẩn cố định đạm tự do hiếu khí là nhóm vi khuẩn có khả năng cố định  $N_2$  trong điều kiện hiếu khí; đa số hiện diện trong đất và có vai trò quan trọng trong việc tạo ra đạm khử trong nhiều hệ sinh thái khác nhau.





Hình 5.12 Sinh sản bằng phân đôi ở vi khuẩn và phân cắt không đều ở vi khuẩn nảy chồi

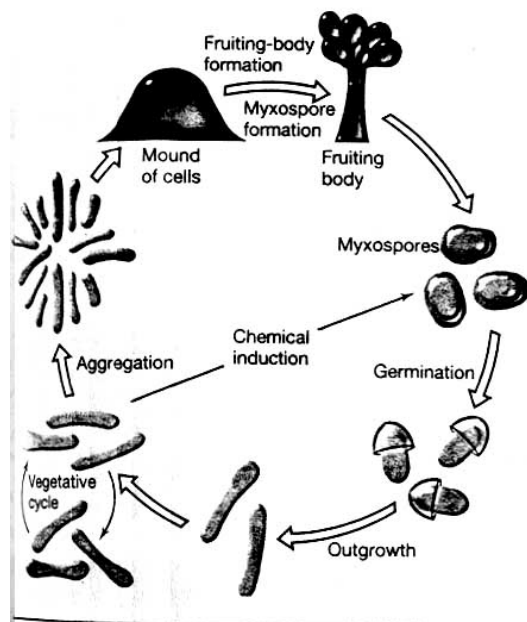


FIGURE 13.48 Life cycle of *Myxococcus xanthus*. Aggregation serves to assemble vegetative cells for fruiting-body formation. Vegetative cells undergo morphogenesis to resting cells called myxospores. The latter germinate under favorable nutritional and physical conditions to yield vegetative cells. Vegetative cells can be converted directly to myxospores without fruiting-body formation by certain chemical inducers, notably high concentrations of glycerol. See the photograph of *Myxococcus* fruiting bodies in Figure 13.47.

Hình 5.13 Vòng đời của vi khuẩn nhảy *Myxococcus xanthus*

## 2.14. Vi khuẩn acetic acid

Vi khuẩn acetic acid là nhóm vi khuẩn có ý nghĩa quan trọng trong công nghiệp, là nguyên nhân gây hư hỏng các thức uống có cồn do ôxi hóa ethanol thành acetic acid trong điều kiện hiếu khí; vi khuẩn này cũng được dùng để sản xuất giấm ăn bằng qui trình công nghiệp.

## 2.15. Vibrio

*Vibrio* là nhóm vi khuẩn Gram âm, hiện diện trong môi trường nước có đặc điểm giống với vi khuẩn đường ruột là kỵ khí tùy ý, có khả năng lên men khi môi trường trở nên yếm khí. Chúng khác với các vi khuẩn đường ruột là có oxidase, khác với *Pseudomonas* là có khả năng lên men và tăng trưởng kỵ khí. Một số loài có khả năng phát sáng gây nên hiện tượng phát sáng ở một số mô ở cá. Sự phát sáng được xúc tác bởi enzyme luciferase trong một phản ứng làm tiêu tốn lực khử khi điện tử được chuyển đến  $O_2$ .

## 2.16. Vi khuẩn đường ruột

Vi khuẩn đường ruột (enteric bacteria) là các vi khuẩn Gram âm hiếu khí tùy ý, hình que và oxidase âm tính; trong điều kiện không có ôxi có khả năng lên men đường.

Nhóm này có thể được phân thành những nhóm nhỏ hơn dựa vào kiểu sản phẩm lên men tạo thành, đặc biệt là lượng các loại acid hữu cơ và sự hiện diện của butanediol (Bảng 5.5). Nhiều chủng thuộc nhóm này là tác nhân gây bệnh ở người, động vật và thực vật. Các loài *Salmonella*, *Shigella* và *Yersinia* thường gây bệnh ở người và động vật. Một số loài *Erwinia* gây bệnh ở thực vật.

## 2.17. Neisseria và cầu khuẩn Gram âm

*Neisseria* và cầu khuẩn (coccobacilli) Gram âm là một nhóm vi khuẩn đa dạng có đặc điểm chung về vách tế bào, hình thái, không có khả năng di động, biến dưỡng hiếu khí, không lên men và giống nhau về thành phần base trong DNA. Khác biệt chính trong nhóm này dựa trên phản ứng oxidase.

Bảng 5.5 Các phản ứng chủ yếu phân biệt các giống vi khuẩn đường ruột

Genus	H <sub>2</sub> S (TSI)	Urease	VP <sup>b</sup>	Indole	Motility	Gas from glucose <sup>b</sup>	β-Galactosidase
<i>Escherichia</i>	–	–	–	+	+ or –	+	+
<i>Enterobacter</i>	–	–	+	–	+	+	+
<i>Shigella</i>	–	–	–	+ or –	–	–	+ or –
<i>Edwardsiella</i>	+	–	–	+	+	+	–
<i>Salmonella</i>	+	–	–	–	+	+	+ or –
<i>Klebsiella</i>	–	+	+ or –	–	–	+	+
<i>Arizona</i>	+	–	–	–	+	+	+
<i>Citrobacter</i>	+ or –	–	–	–	+	+	+
<i>Proteus</i>	+ or –	+	–	+ or –	+	+ or –	–
<i>Providencia</i>	–	–	–	+	+	–	–
<i>Yersinia</i>	–	+	–	–	+ <sup>c</sup>	–	+
<i>Hafnia</i>	–	–	+	–	+	+	+ or –

Genus	KCN	Citrate	Mucate utilization	Phenyl-methyl red	Tartrate utilization	Alanine deaminase	DNA (mol % GC)
<i>Escherichia</i>	–	–	+	+	+	–	48–52
<i>Enterobacter</i>	+	+	+	–	–	–	52–60
<i>Shigella</i>	–	–	–	+	–	–	50
<i>Edwardsiella</i>	–	–	–	+ or –	–	–	53–59
<i>Salmonella</i>	–	+ or –	+ or –	+	+ or –	–	50–53
<i>Klebsiella</i>	+	+	+	–	+ or –	–	53–58
<i>Arizona</i>	–	+	+ or –	+	–	–	50
<i>Citrobacter</i>	+ or –	+	+	+	+	–	50–52
<i>Proteus</i>	+	+ or –	–	+	+	+	38–41
<i>Providencia</i>	+	+	–	+	+	+	39–42
<i>Yersinia</i>	–	–	–	+	–	–	46–50
<i>Hafnia</i>	+	+	–	+	–	–	48–49

<sup>a</sup> See Table 21.3 for the procedures for these diagnostic reactions.  
<sup>b</sup> See Figure 13.25 for a photo of this reaction.  
<sup>c</sup> Motile when grown at room temperature; nonmotile at 37°C.

## 2.18. Rickettsia

Rickettsia là các ký sinh nội bào bắt buộc, không thể sống ngoài tế bào động vật. Chúng có hình dạng tế bào vi khuẩn bình thường nhưng khả năng biến dưỡng rất hạn chế; có thể thu năng lượng bằng phosphoryl hóa ôxi hóa và sinh tổng hợp một số monomer là thành phần của các đại phân tử. Cấu tạo màng dễ rò rỉ hơn bình thường và có thể thu nhận một số coenzyme từ vật chủ. Rickettsia được lan truyền thông qua các động vật chân khớp.

## 2.19. Chlamydia

Chlamydia cũng là ký sinh nội bào gây bệnh thường được truyền qua không khí, có ít chức năng biến dưỡng hơn Rickettsia, không thể tự tổng hợp ATP mà cần được cung cấp bởi tế bào chủ.

## 2.20. Cầu khuẩn Gram dương

Cầu khuẩn Gram dương là nhóm có nhiều thành viên với các đặc tính sinh lý đa dạng. Các giống thuộc nhóm này được phân biệt dựa vào sự sắp xếp tế bào và khả năng tăng trưởng bằng lên men. Chúng chịu hạn khá tốt nên có thể sống sót trong không khí và trên bề mặt của da.

## 2.21. Vi khuẩn lactic acid

Vi khuẩn lactic acid là nhóm các vi khuẩn mà quá trình lên men đường chỉ tạo lactic acid hoặc acid này là sản phẩm chủ yếu của quá trình lên men. Chúng bị hạn chế về khả năng sinh tổng hợp amino acid và khả năng tạo tiền chất của các đại phân tử, không khả năng tạo ATP bằng phosphoryl hóa ôxi hóa. Do vậy ngay trong điều kiện có ôxi, các vi khuẩn này cũng biến dưỡng bằng phương thức lên men. Nhóm thành được chia thành hai nhóm nhỏ hơn dựa vào con đường lên men đường: vi khuẩn sinh lên men lactic acid đồng hình (homofermentative) chỉ tạo ra lactic acid và vi khuẩn lên men lactic acid dị hình (heterofermentative) có thể tạo ra ethanol và  $\text{CO}_2$  bên cạnh lactic acid (Hình 5.14). Nhiều loài vi khuẩn lactic acid có vai trò quan trọng trong sản xuất thực phẩm lên men, đặc biệt là các sản phẩm từ sữa.

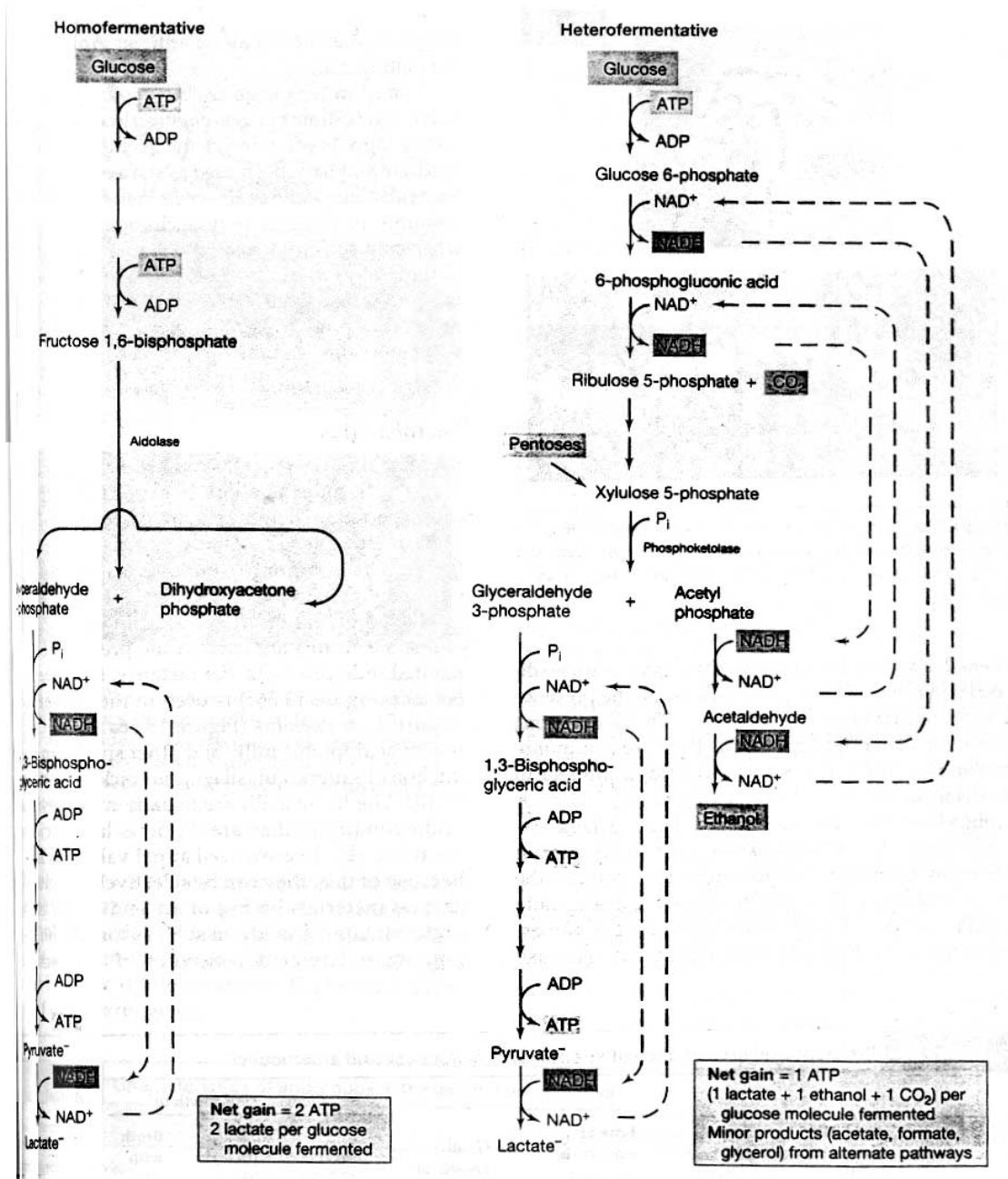


FIGURE 13.54 The fermentation of glucose in homofermentative and heterofermentative lactic acid bacteria. Note that no  $\text{H}_2$  is made in reactions leading to ethanol formation.

**Hình 5.14 Sự khác biệt trong lên men đường ở vi khuẩn lactic acid lên men đồng hình và lên men dị hình**

thấp, Gram dương, có đặc tính riêng về hình thái, mối quan hệ với ôxi và về biên dưỡng năng lượng. Hình dạng và vị trí của bào tử trong tế bào là đặc điểm phân loại quan trọng trong cùng một giống.

Các thành viên của nhóm này rất khác nhau về di truyền nhưng lại có quan hệ mật thiết về sinh thái. Tất cả các loài đều hiện diện trong đất và nội bào tử là cơ chế giúp tế bào sống sót trong điều kiện hay thay đổi của môi trường đất. Các loài *Bacillus* thường tiết ra hydrolase ngoại bào để phân hủy các đại phân tử. Các kháng sinh có thể được tổng hợp trong quá trình hình thành bào tử. *Clostridium* là các loài kỵ khí bắt buộc, chỉ có khả năng tổng hợp ATP theo cơ chế phosphoryl hóa cơ chất.

### 2.23. *Mycoplasma*

*Mycoplasma* là các vi khuẩn không có vách tế bào, thành phần GC thấp, hình dạng thay đổi, có bộ gen rất nhỏ. Nhiều loài cần sterols để tăng cường sự bền vững của màng. Nhiều loài gây bệnh ở người và động vật.

### 2.24. *Corynebacterium*

Đây là nhóm các vi khuẩn Gram dương, hiếu khí, không di động, hình que. Các tế bào sắp xếp thành nhiều hình dáng đa dạng khi vi khuẩn tăng trưởng. Nhóm này có thành phần loài rất đa dạng, một số gây bệnh trên thực, động vật.

### 2.25. *Mycobacterium*

Đây là nhóm vi khuẩn có thành phần GC cao, Gram dương, hình que nhưng thay đổi. Trong chu trình sống, có giai đoạn vi khuẩn tổng hợp mycolic acid trên bề mặt tế bào, ăm màu đặc biệt (nhuộm Ziehl-Neelsen, hay Acid-Fastness). Nhu cầu dinh dưỡng đơn giản, có thể tăng trưởng trong môi trường chỉ chứa glycerol (hoặc acetate) và ammonium. *M. tuberculosis* gây bệnh lao ở người.

### 2.26. *Actinomycetes*

Đây là nhóm đa dạng các vi khuẩn Gram dương, thành phần GC cao, có cấu trúc khuẩn ty, phân nhánh. Mặc dù đường kính khuẩn ty nhỏ tương ứng với kích thước vi khuẩn, nhưng hệ sợi của xạ khuẩn khá giống hệ sợi nấm mốc. Xạ khuẩn tạo bào tử và cách thức tạo bào tử là một trong những đặc điểm dùng trong phân loại. Nhóm này có hai giống là *Streptomyces* và *Actinomyces*. *Streptomyces* là giống thường tạo kháng sinh trong đó có những kháng sinh được ứng dụng rộng rãi trong điều trị bệnh như tetracycline, neomycin... (Bảng 5.6).

## 3. Vi khuẩn cổ (Archaea)

Giới Archeae gồm hai nhánh tiến hóa chính là Euryarchaeota và Crenarchaeota. Một nhóm thứ ba hiện chưa có nhiều đại diện tách ra rất sớm trên cây phát sinh chủng loại là Korarchaeota (Hình 5.15).



Bảng 5.6 Một số kháng sinh thông dụng tổng hợp bởi các loài *Streptomyces*

TABLE 13.32

Some common antibiotics synthesized by species of *Streptomyces*

Chemical class	Common name	Produced by	Active against <sup>a</sup>
Aminoglycosides	Streptomycin	<i>S. griseus</i>	Most gram-negative Bacteria
	Spectinomycin	<i>Streptomyces</i> spp.	<i>M. tuberculosis</i> , penicillinase-producing <i>N. gonorrhoeae</i>
	Neomycin	<i>S. fradiae</i>	Broad spectrum, usually used in topical applications because of toxicity
Tetracyclines	Tetracycline	<i>S. aureofaciens</i>	Broad spectrum, gram-positive and gram-negative Bacteria, rickettsias and chlamydias, <i>Mycoplasma</i>
Macrolides	Chlortetracycline	<i>S. aureofaciens</i>	As for tetracycline
	Erythromycin	<i>S. erythreus</i>	Most gram-positive Bacteria, frequently used in place of penicillin, <i>Legionella</i>
	Clindamycin	<i>S. lincolnensis</i>	Effective against obligate anaerobes, especially <i>Bacteroides fragilis</i>
Polyenes	Nystatin	<i>S. noursei</i>	Fungi, especially <i>Candida</i> infections
None	Amphotericin B	<i>S. nodosus</i>	Fungi
	Chloramphenicol	<i>S. venezuelae</i>	Broad spectrum; drug of choice for typhoid fever

<sup>a</sup> Most antibiotics are effective against several different Bacteria. The entries in this column refer to the common clinical application of a given antibiotic. The structures and mode of action of many of these antibiotics are discussed in Sections 18.7–18.9.

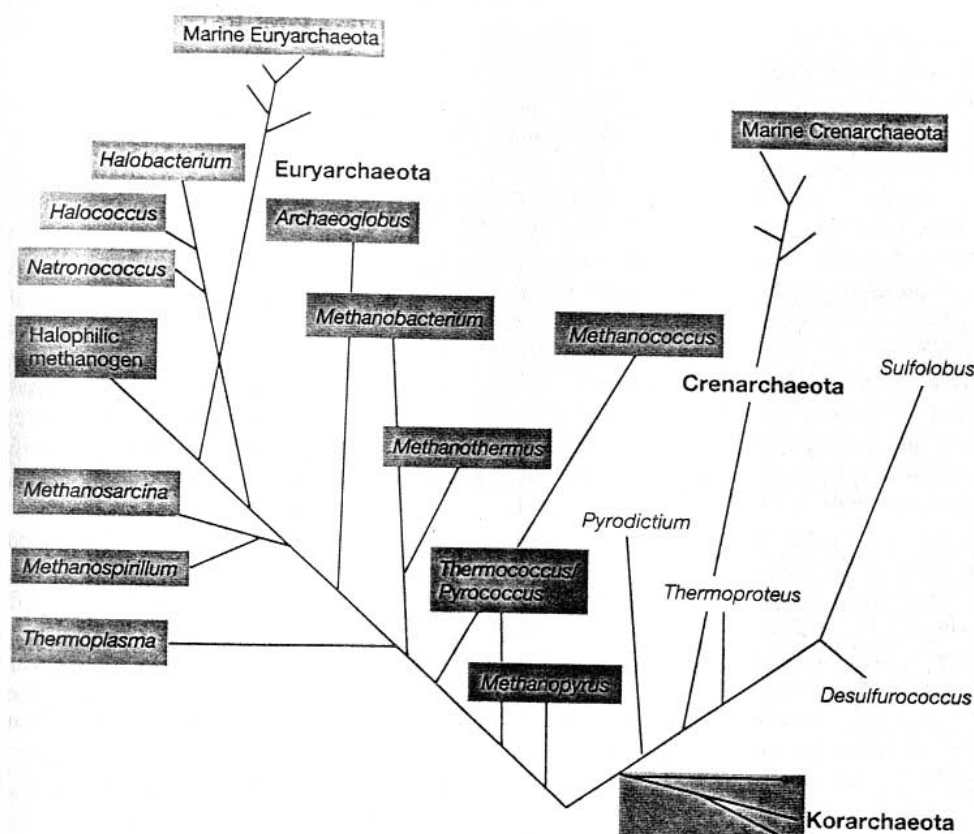


FIGURE 14.1 Detailed phylogenetic tree of the Archaea based on 16S ribosomal RNA sequence comparisons. See note in Figure 13.1 for comparisons of detailed tree with the universal tree. The marine Euryarchaeota and marine Crenarchaeota are thus far known only from community sampling (see Section 12.6).

Hình 5.15 Cây phát sinh chủng loại của Archaea dựa theo trình tự SSU rRNA

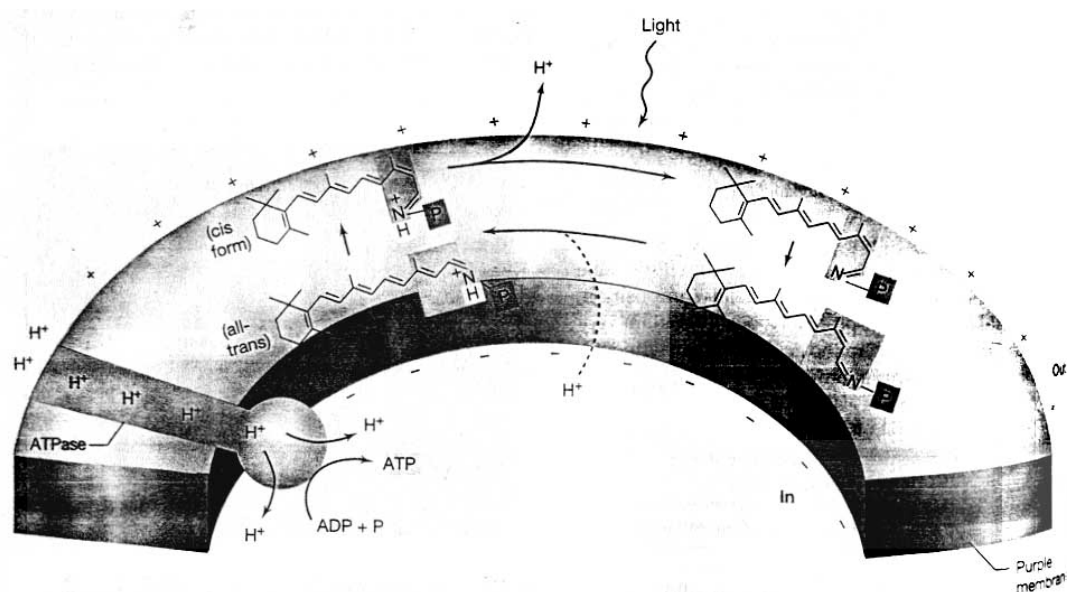
Khác với vi khuẩn, lipid của màng tế bào Archaea chứa liên kết ether giữa acid béo và glycerol, trong đó hai loại lipid chính là glycerol diether và diglycerol tetraether. Archaea còn chứa một lượng lớn acid béo không phân cực. Về sự sắp xếp tổ chức màng thì không có sự khác biệt giữa Archaea với vi khuẩn và nhân thật. Archaea có thể thay đổi bề dày của màng bằng cơ chế bổ sung hoặc bỏ bớt các vòng pentacyclic trong cấu trúc màng.

Vách tế bào Archaea không có muramic acid và D-amino acid là các đơn phân cấu trúc thành peptidoglycan. Một số loại trong vách có pseudopeptidoglycan, polysaccharide, glycoprotein hoặc protein.

Archaea có phương thức biến dưỡng đa dạng, tự dưỡng hoặc dị dưỡng carbon; nói chung tương tự như vi khuẩn. Riêng trong giới này, có thêm phương thức biến dưỡng dẫn đến sự tạo thành methane.

Có sáu giống Archaea ưa mặn cực đoạn (extreme halophile) hiện diện trong các môi trường có nồng độ muối cao, không tăng trưởng được khi nồng độ muối thấp hơn 1,5M, tăng trưởng được ở nồng độ muối gần bão hòa. Có hai giống vừa ưa mặn vừa ưa kiềm (alkalinophile), tăng trưởng tối ưu ở pH trên 9, là các loài dị dưỡng carbon, cần nồng độ ion  $\text{Na}^+$  cao để giữ vách tế bào bằng glycoprotein được ổn định. Archaea tích tụ ion  $\text{K}^+$  bên trong tế bào để cân bằng với nồng độ muối cao bên ngoài.

Một số loài *Halobacterium* có khả năng sử dụng ánh sáng làm nguồn năng lượng nhưng không sử dụng sắc tố chlorophyll như trong quang tổng hợp bình thường mà dùng một protein màng gọi là bacteriorhodopsin. Ánh sáng được hấp thu bởi retinal gắn trong bacteriorhodopsin và được dùng để bơm proton xuyên qua màng, hình thành nên động lực proton để tổng hợp ATP nhờ enzyme ATPase gắn vào màng (Hình 5.16).



**FIGURE 14.4** Model of the light-mediated bacteriorhodopsin proton pump in the purple membrane of *Halobacterium*. The P stands for the protein (bacteriorhodopsin) to which the chromophore retinal is attached. "Out" and "In" designate opposite sides of the cytoplasmic membrane.

**Hình 5.16** Mô hình bơm proton bacteriorhodopsin thu năng lượng từ ánh sáng ở *Halobacterium*

Nhóm sinh methane gồm các loài kỵ khí bắt buộc có khả năng chuyển hóa CO<sub>2</sub>, hợp chất methyl hoặc acetate thành methane (Bảng 5.7). Sự tạo thành methane có thể được xem như là một phương thức hô hấp kỵ khí. Nhóm Archaea này có một bộ các coenzyme cần để khử các hợp chất chứa một carbon thành methane; ví dụ coenzyme M tham gia vào bước cuối cùng trong sự tạo thành methane. Trong sự tạo thành methane từ CO<sub>2</sub>, Archaea sử dụng con đường acetyl CoA (không sử dụng chu trình Calvin). Mặc dù không đa dạng về sinh lý, nhóm methanogen cũng được chia thành sáu nhóm nhỏ dựa vào sự khác nhau về hình thái.

Archaea siêu ưa nhiệt (hyperthermophylic) là nhóm có các đại diện chịu được nhiệt mạnh nhất trong prokaryote. Chúng cần lưu huỳnh khử để biến dưỡng, trong đa số trường hợp, lưu huỳnh khử được dùng làm chất nhận điện tử trong hô hấp kỵ khí (Bảng 5.8). Các loài *Sulfolobus* có khả năng tự dưỡng dùng lưu huỳnh làm nguồn năng lượng.

Bảng 5.7 Các cơ chất được biến đổi thành methane bởi Archaea

TABLE 14.6	Substrates converted to methane by various methanogenic Archaea
<b>I CO<sub>2</sub>-type substrates</b>	
Carbon dioxide, CO <sub>2</sub> (with electrons derived from H <sub>2</sub> , certain alcohols, or pyruvate)	
Formate, HCOO <sup>-</sup>	
Carbon monoxide, CO	
<b>II Methyl substrates</b>	
Methanol, CH <sub>3</sub> OH	
Methylamine, CH <sub>3</sub> NH <sub>3</sub> <sup>+</sup>	
Dimethylamine, (CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> NH <sub>2</sub> <sup>+</sup>	
Trimethylamine, (CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> NH <sup>+</sup>	
Methylmercaptan, CH <sub>3</sub> SH	
Dimethylsulfide, (CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> S	
<b>III Acetotrophic substrate</b>	
Acetate, CH <sub>3</sub> COO <sup>-</sup>	

Bảng 5.8 Các phản ứng thu năng lượng ở Archaea siêu chịu nhiệt

TABLE 14.8 Energy-yielding reactions of hyperthermophilic Archaea		
Nutritional class	Energy-yielding reaction	Example
Chemoorganotrophic	Organic compound + S <sup>0</sup> → H <sub>2</sub> S + CO <sub>2</sub>	<i>Thermoproteus</i> , <i>Thermococcus</i> , <i>Desulfurococcus</i> , <i>Thermofilum</i> , <i>Pyrococcus</i>
	Organic compound + SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> → H <sub>2</sub> S + CO <sub>2</sub>	<i>Archaeoglobus</i>
	Organic compound + O <sub>2</sub> → H <sub>2</sub> O + CO <sub>2</sub>	<i>Sulfolobus</i>
	Organic compound → CO <sub>2</sub> + H <sub>2</sub> + fatty acids	<i>Staphylothermus</i> , <i>Pyrodicticum</i>
	Pyruvate → CO <sub>2</sub> + H <sub>2</sub> + acetate	<i>Pyrococcus</i>
Chemolithotrophic	H <sub>2</sub> + S <sup>0</sup> → H <sub>2</sub> S	<i>Acidianus</i> , <i>Pyrodicticum</i> , <i>Thermoproteus</i> , <i>Stygiolobus</i>
	H <sub>2</sub> + NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> → NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> + H <sub>2</sub> O (NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> reduced to N <sub>2</sub> by some species)	<i>Pyrobaculum</i> , <i>Aquifex</i> <sup>a</sup>
	4 H <sub>2</sub> + NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> + H <sup>+</sup> → NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> + 2 H <sub>2</sub> O + OH <sup>-</sup>	<i>Pyrolobus</i>
	H <sub>2</sub> + 2 Fe <sup>3+</sup> → 2 Fe <sup>2+</sup> + 2 H <sup>+</sup>	<i>Pyrobaculum</i> , <i>Pyrodicticum</i> , <i>Archaeoglobus</i>
	2 H <sub>2</sub> + O <sub>2</sub> → 2 H <sub>2</sub> O	<i>Acidianus</i> , <i>Sulfolobus</i> , <i>Pyrobaculum</i> , <i>Aquifex</i> <sup>a</sup>
	2 S <sup>0</sup> + 3 O <sub>2</sub> + 2 H <sub>2</sub> O → 2 H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	<i>Sulfolobus</i> , <i>Acidianus</i>
	2 FeS <sub>2</sub> + 7 O <sub>2</sub> + 2 H <sub>2</sub> O → 2 FeSO <sub>4</sub> + 2 H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	<i>Sulfolobus</i> , <i>Acidianus</i> , <i>Metallosphaera</i>
	2 FeCO <sub>3</sub> + NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> + 6 H <sub>2</sub> O → 2 Fe(OH) <sub>3</sub> + NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> + 2 HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> + 2 H <sup>+</sup> + H <sub>2</sub> O	<i>Ferroplasma</i>
	4 H <sub>2</sub> + SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> + 2 H <sup>+</sup> → 4 H <sub>2</sub> O + H <sub>2</sub> S	<i>Archaeoglobus</i>
	4 H <sub>2</sub> + CO <sub>2</sub> → CH <sub>4</sub> + 2 H <sub>2</sub> O	<i>Methanopyrus</i> , <i>Methanococcus</i> , <i>Methanothermus</i>

<sup>a</sup> Member of the Bacteria.

Thermoplasma là archaea không có vách tế bào giống như trường hợp mycoplasma, nhưng là dạng hóa dưỡng hữu cơ hiếu khí, ưa acid và ưa nhiệt, thường hiện diện trong những đồng thải than đá tự phát nhiệt. Màng tế bào của Thermoplasma đặc trưng ở sự hiện diện của lipopolysaccharide chứa tetraether lipid với các đường mannose, glucose.

#### 4. Vi sinh vật nhân thật (Eukarya)

Tảo chứa diệp lục tố chlorophyll, thực hiện được sự quang tổng hợp sinh ôxi dùng nước làm chất cho điện tử. Nhóm này được chia thành các nhóm nhỏ hơn tùy theo loại sắc tố phụ chứa trong tế bào, thành phần hóa học của chất lưu trữ carbon, vách tế bào và tính di động. Về màu sắc, tảo có thể màu xanh do chỉ chứa chlorophyll hay có màu nâu hoặc đỏ do có chứa thêm các sắc tố carotenoid che bớt màu xanh. Diệp lục tố được chứa trong bào quan gọi là diệp lục thể (chloroplast). Tảo có thể ở dạng đơn bào hoặc sự kết tụ của nhiều tế bào, hiện diện chủ yếu trong các hệ sinh thái nước và trên bề mặt đất. Cần nhớ, vi khuẩn lam (cyanobacteria) thuộc vi khuẩn, không phải là tảo.

Nấm sợi gồm các thành viên có phương thức biến dưỡng hóa năng hữu cơ, không chứa diệp lục tố, có nhu cầu dinh dưỡng đơn giản hơn so với vi khuẩn. Có thể phân biệt nấm sợi với các prokaryote do kích thước tế bào lớn hơn nhiều, có nhân, không bào và ti thể. Ngoài ra, nấm sợi khác nhiều so với vi khuẩn và archaea về tính đa dạng về hình thái và chu kỳ sinh sản hữu tính. Ba nhóm nấm sợi có ý nghĩa quan trọng là nấm mốc (mold), nấm men (yeast) và nấm lớn (mushroom). Nấm sợi có vai trò đặc biệt quan trọng trong sự phân hủy gỗ và các sản phẩm của gỗ.

Nấm mốc là nhóm nấm sợi có phân bố rất rộng trong tự nhiên. Về hình thái, nấm mốc có những đặc điểm tương tự như trường hợp xạ khuẩn: có khuẩn ty bề mặt (surface mycelium), khuẩn ty khí sinh (aerial hyphae) có chứa các bào tử vô tính.

Nấm men là dạng nấm đơn bào thường có hình cầu, bầu dục hoặc hình trụ, thích môi trường có nhiều đường như bề mặt thực vật. Một số thành viên của nấm men là tác nhân gây bệnh. Nấm men có thể sinh sản vô tính bằng cách nảy chồi và sinh sản hữu tính bằng cách tạo bào tử. Nấm lớn (Basidiomycetes) là nhóm nấm sợi có khả năng tạo thành những quả thể lớn phía trên môi trường mặc dù phần lớn sinh khối chủ yếu ở dạng khuẩn ty nằm bên trong môi trường.

Mốc nhày là nhóm vi sinh vật nhân thật không có khả năng quang dưỡng, sống trên vật chất thực vật đang phân hủy bằng cách ăn vi sinh vật hiện diện trên bề mặt theo cơ chế. Mốc nhày được chia thành hai nhóm nhỏ là: (1) mốc nhày có tế bào (cellular slime mold), ví dụ như *Dictyostelium* có chu trình sống trong đó tế bào tồn tại độc lập như một tế bào amíp; (2) mốc nhày không tế bào (acellular slime mold) có thể dinh dưỡng là khối tế bào chất trần gọi là plasmodium.

Động vật nguyên sinh là các vi sinh vật đơn bào không có vách, thu lấy chất dinh dưỡng bằng cách ăn vi sinh vật khác hoặc ăn các đại phân tử trong dung dịch theo cơ chế ẩm bào (pinocytosis). Chúng không có sắc tố và có khả năng di động. Nguyên sinh động vật được chia thành 4 nhóm chính khác nhau bởi cơ chế di động và bởi các đặc trưng của vòng đời. Nhóm *Mastigophora* di động bằng flagella; *Sarcodina* di động bằng chân giả; *Ciliophora* di động bằng cilia và *Sporozoa* không khả năng di động. Mỗi nhóm đều có các thành viên là tác nhân gây bệnh quan trọng trên người.