



# Phương pháp nghiên cứu sinh thái học vi sinh vật

Bởi:

Nguyễn Lâm Dũng

buivietha

chungchithanh

## Những phương pháp nghiên cứu truyền thống

Sinh thái học vi sinh vật là khoa học nghiên cứu mối tác động qua lại giữa vi sinh vật và môi trường, cũng như các quy luật của chúng. Do đặc điểm của vi sinh vật cho nên không thể phân tích và quan sát tất cả các vi sinh vật trong hệ sinh thái của chúng, mà phải phân tích và nghiên cứu có mục tiêu một số loại hình vi sinh vật trong đó, bao gồm nghiên cứu về số lượng, đặc tính, chức năng. Một số loài phải nuôi cấy thuần khiết mới có thể nghiên cứu được. Trong quá trình nghiên cứu và quan sát thực tiễn lâu dài người ta đã tích lũy được những phương tiện kỹ thuật và phương pháp nghiên cứu có hiệu quả, như lấy mẫu, phân lập, nuôi cấy làm giàu, đếm trực tiếp (qua kính hiển vi), đếm khuẩn lạc (phương pháp CFU), đếm bằng phương pháp giá trị xác suất cực đại (phương pháp MPN). Sau đây sẽ giới thiệu sơ lược các phương tiện kỹ thuật và phương pháp nói trên.

## Lấy mẫu, nuôi cấy làm giàu và phân lập thuần khiết

Căn cứ vào những mục đích và yêu cầu khác nhau, cách lấy mẫu cũng khác nhau. Lấy mẫu đất và bùn không yêu cầu thao tác vô trùng, vì số lượng vi sinh vật trong đất vốn đã cực kỳ lớn, những ô nhiễm do không khí và dụng cụ lấy mẫu mang lại có thể bỏ qua, phải chú ý vào phạm vi và chiều sâu lấy mẫu. Khi lấy mẫu nước thì căn cứ vào độ trong sạch của nước, có thể lấy mẫu trực tiếp hoặc cô đặc bằng cách lọc qua giấy lọc (yêu cầu vật dụng và thao tác vô khuẩn). Khi lấy mẫu không khí cần lọc qua giấy lọc và bằng thao tác vô trùng. Lấy mẫu trên cơ thể sinh vật, thường cần phải lấy lượng mô nhất định, rồi rửa bằng dung dịch vô khuẩn để thu gom vi sinh vật. Mẫu lấy được thường tiến hành phân tích ngay hoặc giữ trong tủ lạnh.

Sau khi lấy mẫu phải đếm số lượng vi sinh vật hoặc nuôi cấy, phân lập. Nuôi cấy làm giàu (hay nuôi cấy phong phú) là nuôi cấy vi sinh vật trên môi trường chọn lọc, nhằm tăng số lượng chúng trong mẫu để dễ phân lập. Thường chỉ tiến hành 2-3 lần nuôi cấy làm giàu là có thể phân lập được. Thông thường dùng cùng loại môi trường đổ trên đĩa

Petri, lấy que gạt để gạt đều trên mặt thạch. Tiếp theo, tách khuẩn lạc đứng riêng biệt và cấy chuyển trên một môi trường nhật định. Sau 2-3 lần như vậy sẽ thu được chủng thuần khiết.

a- Phương pháp giá trị xác suất cực đại

Để nghiên cứu kết cấu và chức năng vi sinh vật trong hệ sinh thái vi sinh vật, cần phải xác định số lượng vi sinh vật. Ngoài phương pháp đếm trực tiếp bằng kính hiển vi, còn có thể sử dụng phương pháp các định giá trị xác suất cực đại (Most possible number-MPN, hoặc còn gọi là phương pháp pha loãng). Pha loãng mẫu (thường phải làm tới 5 độ pha loãng), cấy vào môi trường dịch thể, sau một thời gian nuôi cấy, quan sát tình trạng sinh trưởng của chúng ở các độ pha loãng khác nhau. Căn cứ vào số lượng những ống nghiệm có vi sinh vật sinh trưởng, dùng phương pháp thống kê để tìm ra số lượng vi sinh vật (tìm trên các bản thống kê có sẵn). Phương pháp giá trị xác suất cực đại thường dùng 3 ống nghiệm hoặc 5 ống nghiệm đựng môi trường nuôi cấy. Phương pháp này có thể dùng để định lượng tổng số các vi khuẩn dị dưỡng hiếu khí, dị dưỡng kỵ khí, nitrate hóa và phản nitrate hóa, vi khuẩn khử sulfate...

b- Phương pháp kiểm tra số lượng vi sinh vật sống

Có thể đếm số lượng vi sinh vật sống thông qua việc xác định số khuẩn lạc xuất hiện trên môi trường thạch đĩa. Vì mỗi khuẩn lạc có thể do vài vi sinh vật đứng cạnh nhau tạo thành, cho nên mới có khái niệm Đơn vị hình thành khuẩn lạc (colony forming units, CFU). Thao tác cụ thể về phương pháp này là dùng nước sinh lý vô khuẩn pha loãng thành một dãy các độ pha loãng khác nhau. Lựa chọn ba độ pha loãng thích hợp để cấy 1 giọt lên mặt thạch của môi trường thích hợp đựng trong hộp Petri. Gạt đều giọt dịch huyền phù ấy bằng 1 que gạt thủy tinh rồi đưa vào nuôi cấy ở nhiệt độ thích hợp. Sau đó lấy ra đếm số khuẩn lạc trên mỗi đĩa Petri, nên chọn các độ pha loãng nào cho số lượng khoảng 30-300 khuẩn lạc trên mỗi hộp Petri. Phương pháp này dùng để đếm số lượng vi sinh vật sống, vì có sống thì mới tạo thành được khuẩn lạc. Phương pháp này thường được dùng để xác định tổng số nấm men, nấm sợi, vi khuẩn, xạ khuẩn.

Khi tính số lượng vi sinh vật còn phải chú ý đến số lượng các vi sinh vật không nuôi cấy được, mà đa số vi sinh vật trong thiên nhiên hiện nay thực ra vẫn chưa có thể nuôi cấy được trong phòng thí nghiệm (Pace, 1996). Số lượng các vi sinh vật nuôi cấy được chưa tới 1% tổng số vi sinh vật. Đối với việc phân bố và tính đa dạng của các vi sinh vật không nuôi cấy được cần sử dụng những phương pháp khác, bao gồm các phương pháp sinh học phân tử..

## Các phương pháp sinh học phân tử dùng trong nghiên cứu sinh thái học vi sinh vật

Các kỹ thuật sinh học phân tử hiện đại đã được ứng dụng trong nghiên cứu Sinh thái học nói chung và Sinh thái học vi sinh vật nói riêng. Các kỹ thuật này đã giúp khắc phục những khiếm khuyết của các phương pháp Sinh thái học vi sinh vật truyền thống, giúp trực tiếp khám phá cấu trúc quần thể Vi sinh vật trong thiên nhiên và mối quan hệ giữa chúng với môi trường. Những kỹ thuật sinh học phân tử được ứng dụng trong Sinh thái học vi sinh vật chủ yếu gồm các kỹ thuật dò DNA (DNA probing), kỹ thuật nhân bản DNA đặc hiệu PCR (polymerase chain reaction), kỹ thuật phân tích RNA ribosom, phương pháp điện di gel gradient biến tính v.v... Ứng dụng các kỹ thuật nói trên có thể giúp thu được các thành quả quan trọng và tạo ra sự đột phá trong nghiên cứu Sinh thái học vi sinh vật, làm cho một số nghiên cứu về vi sinh vật trở nên khả thi và cho phép tìm hiểu những vấn đề sinh thái ở mức độ phân tử.

### a- Kỹ thuật lai DNA

Kỹ thuật lai DNA cho phép xác định chính xác DNA của vi sinh vật môi trường. Kỹ thuật này kết hợp với phương pháp xác định mật độ quang học còn có thể dùng để trực tiếp để so sánh cường độ các mẫu lai dương tính (băng điện di hoặc vết chấm do lai), từ đó cho phép phát hiện các vi sinh vật có liên quan và đánh giá mức độ biểu hiện chức năng của chúng.

Các mẫu dò dùng cho lai DNA dạng chuỗi nucleotide đánh dấu có thể được dùng trực tiếp để phát hiện các trình tự DNA được quan tâm trong dung dịch, cố định trên màng, trong tế bào hoặc trong mô. Mẫu dò có thể dài (100-1000 cặp base), cũng có thể là chuỗi ngắn (10-50 cặp base), sẽ liên kết bổ sung với trình tự DNA được quan tâm. Phương thức lai có thể là lai giữa khuẩn lạc, lai *in situ* (lai nguyên vị hay lai tại chỗ). Người ta đã dùng phương pháp sinh học phân tử để thăm dò và phân tích định lượng gen mã hoá enzyme khử thủy ngân của quần thể Vi sinh vật trong nguồn nước đã bị ô nhiễm bởi thủy ngân. Lai vết chấm (dot blot) của gen mã hóa enzyme phân hủy polychlorinated biphenyl (PCB) có thể giúp xác định sự phân giải PCB trong quần thể vi sinh vật đất ở mức độ phân tử. Có người dùng cách lai với khuẩn lạc để theo dõi quần thể vi sinh vật trong hồ đã được cấy chủng *Alcaligenes* có khả năng phân giải chlorophenol. Người ta đã phát hiện thấy rằng khi xử lý bằng chlorophenol với những nồng độ khác nhau, hoạt tính của quần thể phân giải chlorophenol tỷ lệ thuận với nồng độ chlorophenol. Hosein đã ứng dụng phương pháp lai bằng mẫu dò gen trao đổi chất phân hủy để nghiên cứu, phân tích những quần thể vi sinh vật thủy sinh có thể phân hủy creosot, các hydrocarbon dị vòng thơm và đa vòng thơm. Kết quả cho thấy, sau khi được thuần hóa, tổng số vi sinh vật nuôi cấy được đã tăng gấp 100 lần, mà tổng số vi sinh vật chứa gen phân hủy đã tăng 3 lần. Hogan và đồng sự ứng dụng phương pháp lai bằng mẫu dò nucleotide nghiên cứu sự phân bố của gen *tfdA* (gen mã hoá enzyme dioxydase trong bước đầu tiên phân hủy 2,4-D) trong các vi sinh vật đất không phân hủy 2,4-D. Kết quả cho thấy, gen nói

trên phân bố rộng rãi trong các vi khuẩn đất. Có thể gen này còn có những chức năng khác. Guo và cộng sự đã ứng dụng phương pháp lai DNA để nghiên cứu DNA chiết xuất từ vi khuẩn trong các mẫu đất bị ô nhiễm dầu mỏ hoặc chưa bị ô nhiễm. Kết quả cho thấy, tỷ lệ phát hiện các gen mã hóa các enzyme phân hủy hydratcarbon trong DNA của vi khuẩn lấy từ đất bị ô nhiễm rõ ràng cao hơn so với từ các mẫu không bị ô nhiễm. Phân tích định lượng còn cho thấy, ô nhiễm càng nghiêm trọng, hàm lượng gen mã hóa enzyme phân hủy càng cao. Vì vậy có thể dùng phương pháp này để đánh giá mức độ ô nhiễm dầu mỏ trong đất. Pollard, nhà nghiên cứu sinh thái học người Australia đã dùng phương pháp lai bằng mẫu dò DNA để đo tốc độ sinh trưởng của các vi sinh vật xác định trong bùn hoạt tính. Ông thêm tymin đánh dấu phóng xạ vào hệ thống xử lý bùn hoạt tính, khiến vi khuẩn khi phân bào bị đánh dấu phóng xạ. Sau đó chiết xuất toàn bộ DNA của bùn hoạt tính. Cuối cùng lấy mẫu dò nucleotide chuyên biệt cố định trên màng lai, cho lai với toàn bộ DNA bùn hoạt tính, rồi căn cứ vào cường độ phóng xạ để có thể phân tích định lượng DNA của vi khuẩn xác định. Điều này cho thấy dùng phương pháp này có thể nghiên cứu động học của quần xã vi khuẩn trong bùn hoạt tính.

Đối với các vi sinh vật ở kích thước có thể quan sát được bằng kính hiển vi, kỹ thuật lai *in situ* có thể giúp định lượng vi sinh vật trong môi trường một cách hữu hiệu. Kỹ thuật này cũng đã được ứng dụng rộng rãi trong ngành Sinh học môi trường.

#### b- Kỹ thuật nhân bản đặc hiệu PCR

Trong công tác kiểm tra môi trường thực địa, đối với việc thăm dò những vi sinh vật nhất định hoặc những gen nào đó trong quần thể phức tạp, phương pháp lai DNA trực tiếp sẽ không còn nhạy nữa vì các đoạn DNA được quan tâm thường lẫn trong hỗn hợp dịch chiết xuất tế bào, nhưng với hàm lượng thấp. Dùng kỹ thuật PCR có thể nhân đoạn DNA được quan tâm lên nhiều lần, sao đó lai bằng mẫu dò để phát hiện những đoạn DNA đích được nhân lên đó, qua đó nghiên cứu phân tích cấu trúc quần thể Vi sinh vật định tính hoặc định lượng. Kỹ thuật PCR thường được kết hợp sử dụng với các kỹ thuật khác như PT-PCR, PCR cạnh tranh, PCR dạng máng, RAPD, ARDRA v.v...

Kỹ thuật PCR cũng đã được kết hợp với kỹ thuật cắt bằng enzyme giới hạn để xác định sự tồn tại của gen phân hủy naphthalen *nah* Ac trong bùn đáy tự nhiên. Enzyme giới hạn được dùng để cắt sản phẩm nhân bản PCR của gen *nah* Ac, rồi thông qua phân tích sản phẩm cắt để đánh giá tính đa dạng của gen đó. Erb và cộng sự đã từng dùng phương pháp nhân bản PCR từ bùn đáy bị ô nhiễm PCB để chiết xuất gen *bph* C từ DNA tổng số, từ đó nghiên cứu sâu hơn đối với sự biểu hiện của gen *bph* trong quá trình phân hủy PCB. Phân tích bằng enzyme giới hạn sau đó chứng tỏ quần xã vi sinh vật phân hủy PCB trong bùn đáy có tính đa dạng sinh học cao. Kết quả cũng cho thấy số lượng gen *bph* C trong bùn đáy của nước hồ chưa bị ô nhiễm PCB tương đối ít hơn.

RAPD (randomly amplified polimorphic DNA) cũng là kỹ thuật được ứng dụng rộng rãi. RAPD là dùng mỗi (đoạn nucleotide) không đặc hiệu để nhân bản một đoạn gen

nhất định nào đó. Điện di đồ đặc trưng (finger-printing) của phân tích RAPD đối với các nhóm gen là rất hữu dụng khi so sánh sự thay đổi quần thể vi sinh vật trong quãng thời gian xác định của thiết bị xử lý có quy mô vừa và nhỏ, nhưng chưa đủ để dự đoán tính đa dạng sinh học của quần thể. Dùng phân tích RAPD để kiểm tra quần xã vi sinh vật trong môi trường sinh lầy nhiều lần cận ở quy mô phòng thí nghiệm đã cho thấy: dùng môi trường có thêm sinh lầy dầu cận còn thích hợp hơn cho sự phát triển và hoạt tính của những nhóm loài vi sinh vật khác nhau so với môi trường ban đầu.

### *c- Phương pháp phân tích gen RNA ribosom (rRNA)*

Phương pháp phân tích gen rRNA là ứng dụng tổng hợp nhiều kỹ thuật sinh học phân tử để phân tích gen rRNA trong vi khuẩn, từ đó vạch ra tính đa dạng của vi sinh vật. Đây là phương pháp quan trọng nhất trong Sinh thái học vi sinh vật phân tử, và kết quả đạt được cũng nhiều nhất.

Trong phương pháp này, những kỹ thuật sử dụng chủ yếu bao gồm chiết xuất DNA tổng số từ mẫu môi trường, thiết kế môi và mẫu dò, nhân bản PCR, điện di gel gradien biến tính (bao gồm DGGE và TGGE), phân tích đoạn đồng hình (restricted fragment length polyphorism – RFLP), sàng lọc kho lưu trữ gen, xác định trình tự, phân tích trình tự và xây dựng cây tiến hóa hệ thống, lai tái tổ hợp điểm, lai tái tổ hợp *in situ* (tại chỗ), *in vivo* và lai tái tổ hợp dò tuần tự (nested probes) v.v... Tùy theo đối tượng và mục đích nghiên cứu khác nhau, những kỹ thuật đó có thể sử dụng đơn độc hoặc kết hợp. Phương pháp phân tích gen rRNA, thực sự đã tạo ra cuộc cách mạng về phương pháp nghiên cứu tính đa dạng vi sinh vật cũng như Sinh thái học vi sinh vật, và qua đó thúc đẩy mạnh mẽ việc nghiên cứu tính đa dạng vi sinh vật, khiến người ta có nhận thức hoàn toàn mới về quần thể vi sinh vật không nuôi cấy được (uncultured microbes).

Phương pháp phân tích gen rRNA được ứng dụng lần đầu để phân tích quần thể vi sinh vật phù du biển. Đây là nhóm vi khuẩn SARII không nuôi cấy được, chuỗi rRNA có 12,5% khác với trình tự gen trong kho số liệu; dùng phương pháp RFLP phân tích 51 clone thì có đến 47% trình tự khác với của quần thể đã biết. Phương pháp này cũng đã được sử dụng để tiến hành giám định phân tử và hiển vi đối với quần thể vi khuẩn trên màng sinh vật của giá tạo thể rắn. Quá trình thực hiện như sau: dùng 1 cặp môi đặc hiệu để nhân bản 16S rDNA của vi khuẩn khử sulfate, lấy sản phẩm PCR làm mẫu dò, tiến hành lai tái tổ hợp *in situ*. Kết quả cho thấy: có 2 quần thể vi khuẩn có hình thái khác biệt rõ ràng (phẩy khuẩn to và phẩy khuẩn nhỏ), và các vi khuẩn đó sinh sôi nảy nở nhanh chóng ở mặt phẳng giới hạn mới tạo thành. Qua phân tích trình tự DNA, có 3 loài chính được phát hiện: *Desulfovibrio vulgaris* (độ tương quan trình tự 98%), *Desulfuromouas acefoscidans* (độ tương quan 96%) và một dạng xoắn thể (*Spirochaeta*).

Dùng bùn hoạt tính xử lý nước thải là một trong những phương pháp kỹ thuật và công nghệ quan trọng nhất hiện nay nhưng người ta lại biết rất ít về tương quan giữa thành phần và chức năng của các thể hội sinh vi sinh vật trong bùn hoạt tính. Phần đáy bùn

hoạt tính có thể được coi là một lớp biofilm cố định. Biofilm có thể tiêu thụ rất nhiều hợp chất hữu cơ và các chất ô nhiễm. Kỹ thuật lai tái tổ hợp dò tuần tự (nested probe hybridization) rất thích hợp để nghiên cứu thể hội sinh cực kỳ phức tạp này: Sử dụng mẫu dò chuyên biệt tiến hành nghiên cứu từ cấp độ lớn đến nhỏ (top-to-bottom) đối với những phân loài khác nhau. Ví dụ lai tái tổ hợp vòng một lần lượt sử dụng mẫu dò chuyên biệt cho vi khuẩn hoặc cổ khuẩn; kết quả: phát hiện nhiều tế bào kết hợp với mẫu dò vi khuẩn. Vòng hai sử dụng mẫu dò vi khuẩn cho các lớp phụ  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  trong lớp trực khuẩn biến hình cũng như vi khuẩn thuộc các phả hệ khác để tiến hành tái tổ hợp. Kết quả là việc sử dụng mỗi mẫu dò đều giúp phát hiện được vài loại hình thái khác nhau.

Vi khuẩn oxy hóa ammon có ý nghĩa sinh thái học quan trọng. Đó là nhóm vi khuẩn tự dưỡng đặc biệt và có vai trò rất quan trọng trong vòng tuần hoàn nitơ. Dựa trên các đặc tính hình thái, chỉ có thể phân biệt được các vi khuẩn này tới cấp độ chi. Để phân biệt các loài thuộc từng chi phải căn cứ vào tỷ lệ % (G+C) trong DNA và việc lai DNA-DNA. Vì vậy phương pháp phân tích rRNA đặc biệt thích hợp để nghiên cứu nhóm vi khuẩn này. Kết quả phân tích trật tự gen 16S rRNA chứng tỏ vi khuẩn tự dưỡng oxy hóa ammon có hai nhóm: một nhóm có chứa vi khuẩn *Nitrosococcus oceanus* - thuộc về lớp phụ  $\gamma$ , còn nhóm kia có chứa vi khuẩn *Nitrosococcus mobilis* và các chi vi khuẩn khác - thuộc về lớp phụ  $\beta$ . Có thể nói phương pháp phân tích gen rRNA là một phương pháp lý tưởng khi nghiên cứu hệ thống sinh thái. Kết hợp nhiều phương pháp nghiên cứu sinh học phân tử cho thấy *Nitrospira* phân bố rộng rãi trong các loại môi trường, còn *Nitrosomonas* lại chỉ tìm thấy trong rất ít loại môi trường. Nhưng các kết quả thu được trong nghiên cứu phòng thí nghiệm thì lại cho kết luận ngược lại. Điều đó chứng tỏ các loài phân lập nuôi cấy dễ dàng không luôn luôn là loài ưu thế trong sinh thái học.

Phương pháp phân tích rRNA còn được ứng dụng để xác định vi khuẩn đất, xác định tính an toàn của các vi sinh vật chuyển gen, sự chuyển gen giữa các vi sinh vật trong đất, v.v... Woese và cộng sự đã kiến nghị xây dựng kho dữ liệu về 18S rRNA và 16S rRNA (dự án RDP- the ribosomal database project). Muốn liên hệ với kho dữ liệu này có thể theo địa chỉ e-mail: [rdp@phylo.life.uicu.edu](mailto:rdp@phylo.life.uicu.edu) hoặc server [@rdp.life.uicu.edu](mailto:@rdp.life.uicu.edu)

#### d- Kỹ thuật điện di gel gradient biến tính

Kỹ thuật điện di gel gradient biến tính (denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE). Đây là một dạng kỹ thuật "dấu vân tay" (fingerprinting) phân tử. Kỹ thuật này cho phép phân biệt các trình tự DNA khác nhau dựa trên sự khác nhau về tỷ lệ (G+C)/(A+T) giữa các trình tự. Khi được điện di trên một gel có gradien chất biến tính, tùy theo thành phần nucleotit mà một phân tử DNA sẽ dừng lại ở một vị trí nhất định đặc trưng: trong phân tử càng nhiều G và C thì phân tử càng lâu bị biến tính và do đó càng lâu dừng lại trên gel điện di. Vì vậy, vị trí khác nhau trên điện di đồ DGGE phản ánh sự khác nhau về trình tự của các đoạn DNA được phân tích. Trong từng trường hợp cụ thể, mỗi vị trí có thể đặc trưng cho một trình tự DNA và phản ánh sự có mặt của một loài hay cá thể trong quần xã được phân tích.

## Phương pháp nghiên cứu sinh thái học vi sinh vật

Myuzer lần đầu tiên dùng kỹ thuật DGGE để nghiên cứu Sinh thái học vi sinh vật, xác định tính đa dạng di truyền của quần thể vi sinh vật trong môi trường thiên nhiên. Gần đây người ta còn mở rộng phương pháp DGGE để tuyển chọn các chủng vi sinh vật và rút ngắn được rất nhiều khối lượng công việc.

Trong thực tế, nên phối hợp các phương pháp nghiên cứu truyền thống với các phương pháp nghiên cứu sinh học phân tử mới có thể nghiên cứu tính đa dạng vi sinh vật và cấu trúc quần lạc vi sinh vật trong hệ thống sinh thái vi sinh vật vô cùng phức tạp. Khi phân tích tính đa dạng vi sinh vật cần sử dụng DNA chung của quần thể vi sinh vật chứ không thể sử dụng DNA của các vi sinh vật nuôi cấy thuần khiết.