

www.mientayvn.com

Dịch tiếng anh chuyên ngành khoa học tự nhiên và kỹ thuật.

Dịch các bài giảng trong chương trình học liệu mở của học viện MIT, Yale.

Tìm và dịch tài liệu phục vụ cho sinh viên làm seminar, luận văn.

Tại sao mọi thứ đều miễn phí và chuyên nghiệp ???

Trao i tr c tuy n t i:

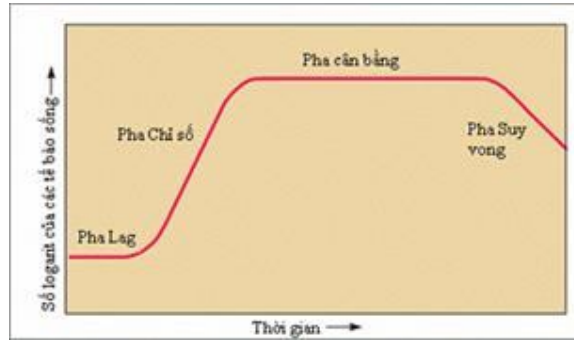
www.mientayvn.com/chat_box_sinh.html

sinh trưởng và phát triển của vi sinh vật

Sinh trưởng là biểu thị sự tăng trưởng các thành phần của tế bào. Đối với các vi sinh vật có hình thức sinh sản bằng nảy chồi hay phân đôi thì sinh trưởng dẫn tới sự gia tăng số lượng tế bào. Tế bào tăng trưởng đến một mức độ nhất định thì sẽ phân cắt thành hai tế bào thế hệ con có kích thước hầu như bằng nhau. Đối với các vi sinh vật đa nhân thì sự phân cách nhân không đồng hành với sự phân cắt tế bào - sự sinh trưởng làm tăng kích thước tế bào mà không làm tăng số lượng tế bào. Vì vi sinh vật rất nhỏ bé cho nên là đối tượng rất không thuận tiện để nghiên cứu về sinh trưởng và phát triển. Chính vì vậy mà khi nghiên cứu về sinh trưởng, người ta thường xét đến sự biến đổi về số lượng của cả quần thể vi sinh vật.

14.1. ĐƯỜNG CONG SINH TRƯỞNG

Sự sinh trưởng quần thể vi sinh vật được nghiên cứu bằng cách phân tích đường cong sinh trưởng trong một môi trường nuôi cấy vi sinh vật theo phương pháp nuôi cấy theo mẻ (batch culture) hoặc trong một hệ thống kín. Có nghĩa là vi sinh vật được nuôi cấy trong một thiết bị kín, trong quá trình nuôi cấy không thay đổi môi trường và thời gian nuôi cấy càng kéo dài thì nồng độ chất dinh dưỡng càng giảm sút, các chất phế thải của trao đổi chất càng tăng lên. Nếu lấy thời gian nuôi cấy là trục hoành và lấy số logarit của số lượng tế bào sống làm trục tung sẽ có thể vẽ được đường cong sinh trưởng của các vi sinh vật sinh sản bằng cách phân đôi. Đường cong này có 4 giai đoạn (phases) khác nhau.



Hình 14.1: Đường cong sinh trưởng trong hệ thống kín
(Theo sách của Prescott, Harley và Klein)

14.1.1. Giai đoạn Tiềm phát (Lag phase)

Khi cấy vi sinh vật vào một môi trường mới số lượng thường không tăng lên ngay, đó là giai đoạn Tiềm phát hay pha Lag. Trong giai đoạn này tế bào chưa phân cắt nhưng thể tích và khối lượng tăng lên rõ rệt do có sự tăng các thành phần mới của tế bào. Nguyên nhân là do tế bào ở trạng thái già, thiếu hụt ATP, các cofactor cần thiết và ribosome. Thành phần môi trường mới không giống môi trường cũ cho nên tế bào cần một thời gian nhất định để tổng hợp các enzyme mới nhằm sử dụng được các chất dinh dưỡng mới. Các tế bào cũng có thể bị thương tổn và cần một thời gian để hồi phục. Bất kỳ vì nguyên nhân gì thì kết quả vẫn là tế bào phải tự trang bị lại các thành phần của mình, tái tạo ADN và bắt đầu tăng khối lượng. Giai đoạn tiềm phát dài hay ngắn liên quan đến bản thân từng loại vi sinh vật và tính chất của môi trường. Nếu tính chất hóa học của môi trường mới sai khác nhiều với môi trường cũ thì giai đoạn tiềm phát sẽ kéo dài. Ngược lại, nếu cấy từ giai đoạn logarit vào một môi trường có thành phần tương tự thì giai đoạn tiềm phát sẽ rút ngắn lại. Nếu cấy vi sinh vật từ giai đoạn tiềm phát hay từ giai đoạn tử vong thì giai đoạn tiềm phát sẽ kéo dài.

14.1.2. Giai đoạn logarit (Log Phase) hay Pha Chỉ số (Exponential Phase)

Trong giai đoạn này vi sinh vật sinh trưởng và phân cắt với nhịp độ tối đa so với bản tính di truyền của chúng nếu gặp môi trường và điều kiện nuôi cấy thích hợp. Nhịp độ sinh trưởng của chúng là không thay đổi trong suốt giai đoạn này, các tế bào phân đôi một cách đều đặn. Do các tế bào sinh ra chỉ khác nhau rất ít cho nên

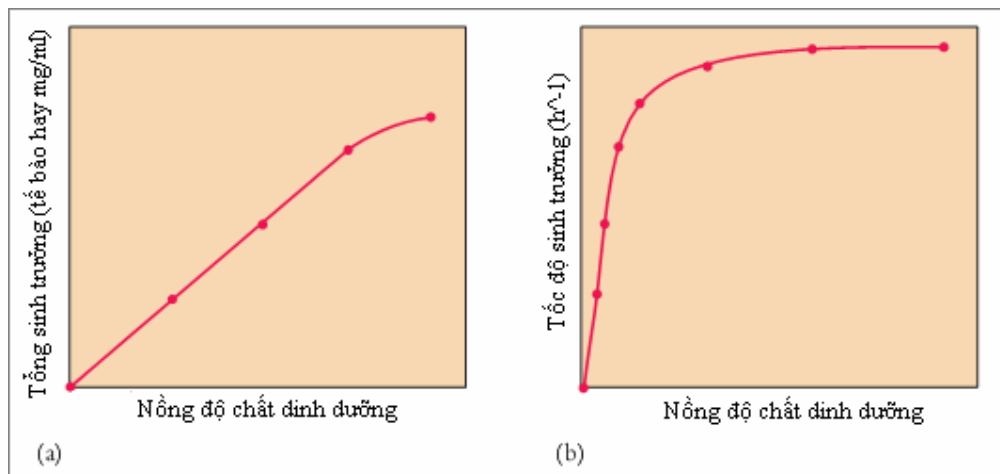
đường cong sinh trưởng là một đường trơn nhẵn chứ không gấp khúc (hình 14.1). Quần thể tế bào trong giai đoạn này có trạng thái hóa học và sinh lý học cơ bản là như nhau cho nên việc nuôi cấy ở giai đoạn này thường được sử dụng để nghiên cứu sinh hóa học và sinh lý học vi sinh vật.

Sinh trưởng logarit là sinh trưởng đồng đều, tức là các thành phần tế bào được tổng hợp với tốc độ tương đối ổn định. Nếu cân bằng dinh dưỡng hay các điều kiện môi trường thay đổi sẽ dẫn đến sự sinh trưởng không đồng đều. Sự sinh trưởng khi nhịp độ tổng hợp các thành phần của tế bào tương đối biến hóa sẽ biến đổi theo cho đến khi đạt tới một sự cân bằng mới. Phản ứng này rất dễ quan sát thấy khi làm thực nghiệm chuyển tế bào từ một môi trường nghèo dinh dưỡng sang một môi trường giàu hơn. Tế bào trước hết phải tạo nên các ribosome mới có thể nâng cao năng lực tổng hợp protein, sau đó là sự tăng cường tổng hợp protein và ADN. Cuối cùng tất yếu dẫn đến tốc độ phát triển nhanh chóng.

Lúc chuyển quần thể tế bào từ một môi trường giàu dinh dưỡng tới một môi trường nghèo thì cũng có kết quả về sự sinh trưởng không đồng đều như vậy. Vi sinh vật trước đó có thể thu được từ môi trường nhiều thành phần của tế bào nhưng khi chuyển sang môi trường nghèo chúng cần có thời gian để tạo ra các enzyme cần thiết để sinh tổng hợp các thành phần không có sẵn trong môi trường. Sau đó tế bào mới có thể phân cắt, ADN mới có thể tái tạo, nhưng việc tổng hợp protein và ARN là chậm cho nên tế bào nhỏ lại và tổ chức lại sự trao đổi chất của chúng cho đến khi chúng có thể sinh trưởng tiếp. Sau đó sự sinh trưởng cân bằng sẽ được hồi phục và trở về lại giai đoạn logarit.

Các thí nghiệm trên đây cho thấy sự sinh trưởng của vi sinh vật được kiểm soát một cách chính xác, phối hợp và phản ứng nhanh chóng với những sự biến đổi của môi trường.

Khi sự sinh trưởng của vi sinh vật bị hạn chế bởi nồng độ thấp của các chất dinh dưỡng cần thiết thì sản lượng tế bào cuối cùng sẽ tăng lên cùng với sự tăng lên của các chất dinh dưỡng bị hạn chế (hình 14.2a). Đây chính là cơ sở để sử dụng vi sinh vật trong việc định lượng vitamin và các nhân tố sinh trưởng khác. Tốc độ sinh trưởng cũng tăng lên cùng với sự tăng nồng độ các chất dinh dưỡng (hình 14.2b). Hình dáng của đường cong hầu như phản ánh tốc độ hấp thu chất dinh dưỡng nhờ sự chuyển vận protein của vi sinh vật. Lúc nồng độ chất dinh dưỡng đủ cao thì hệ thống vận chuyển sẽ bão hòa và tốc độ sinh trưởng không tăng lên cùng với sự tăng lên của nồng độ chất dinh dưỡng.



Hình 14.2: Nồng độ chất dinh dưỡng và sinh trưởng

(a) - Ảnh hưởng của sự hạn chế chất dinh dưỡng đối với sản lượng chung của vi sinh vật. Lúc nồng độ đủ cao thì sản lượng chung sẽ đạt tới ổn định.

(b)- Ảnh hưởng của sự hạn chế chất dinh dưỡng tới tốc độ sinh trưởng.

14.1.3. Giai đoạn Ổn định (Stationary Phase) hay Pha Cân bằng

Qua giai đoạn Logarit sự sinh trưởng của quần thể cuối cùng sẽ dừng lại, đường cong sinh trưởng đi ngang (hình 14.1). Nồng độ vi khuẩn trong giai đoạn ổn định thường vào khoảng 10^9 /ml. Với các vi sinh vật khác thường không đạt được đến nồng độ này. Với động vật nguyên sinh và vi tảo thường chỉ đạt đến nồng độ 10^6 /ml. Đương nhiên, số lượng tế bào cuối cùng quyết định bởi ảnh hưởng chung của điều kiện dinh dưỡng, chủng loại vi sinh vật và các nhân tố khác. Trong giai đoạn này số lượng tế bào sống là không thay đổi, có thể do số lượng tế bào mới sinh ra cân bằng với số lượng tế bào chết đi, hoặc là tế bào ngừng phân cắt mà vẫn giữ nguyên hoạt tính trao đổi chất.

Có nhiều nguyên nhân làm cho quần thể vi sinh vật chuyển sang giai đoạn ổn định. Trong đó nguyên nhân chủ yếu là sự hạn chế của chất dinh dưỡng. Nếu một chất dinh dưỡng thiết yếu bị thiếu hụt nghiêm trọng thì sự sinh trưởng sẽ chậm lại. Vi sinh vật hiếu khí thường bị hạn chế bởi nồng độ oxygen. Oxygen thường hòa tan ít trong nước, O_2 trong nội bộ môi trường rất nhanh chóng bị tiêu thụ hết, chỉ có các vi sinh vật sinh trưởng ở bề mặt môi trường mới có đủ nồng độ O_2 để sinh trưởng. Vì vậy khi nuôi cấy vi sinh vật phải sử dụng tới máy lắc hay các biện pháp thông khí khác. Quần thể vi sinh vật cũng có thể bị đình chỉ sinh trưởng khi gặp sự tích lũy của các sản phẩm trao đổi chất có hại. Một số vi sinh vật kỵ khí (như *Streptococcus*) có thể lên men đường làm sản sinh một lượng lớn acid lactic hay các acid hữu cơ khác, làm acid hóa môi trường và ức chế sự sinh trưởng của vi sinh vật. Đồng thời sự

tiêu hao hết đường cũng làm cho tế bào đi vào giai đoạn ổn định. Sau nữa là, một số chứng cứ cho thấy khi số lượng vi sinh vật đạt đến một giới hạn nhất định thì sự sinh trưởng có thể bị đình chỉ. Sự sinh trưởng của vi sinh vật chuyển sang giai đoạn ổn định có thể do kết quả chung của rất nhiều nhân tố khác nhau

Như chúng ta đã thấy vi khuẩn khi nuôi cấy theo mẻ sẽ chuyển sang giai đoạn ổn định khi thiếu thức ăn. Trong tự nhiên, do nhiều môi trường có nồng độ chất dinh dưỡng rất thấp nên vi sinh vật thường chuyển sang giai đoạn ổn định. Đối với vi khuẩn việc chuyển sang giai đoạn ổn định có thể là một loại thích ứng tốt. Nhiều loại vi khuẩn không có sự biến hóa rõ rệt về hình thái (như hình thành bào tử nội sinh-*endospore*) nhưng chúng có thể thu nhỏ kích thước lại, thường do chất nguyên sinh co lại và nhân giả (nucleoid) đậm đặc lại. Một biến đổi quan trọng hơn là, khi thiếu thức ăn vi khuẩn sẽ sinh ra một loại protein đói (*starvation proteins*) làm cho tế bào đề kháng nhiều hơn với các thương tổn bằng nhiều con đường khác nhau. Chúng làm tăng các liên kết peptidoglycan và sự bền vững của thành tế bào. Chẳng hạn Dps (DNA-binding protein from starved cells), một loại protein kết hợp với ADN lấy từ các tế bào đói, có thể bảo vệ cho ADN. Phân tử Chaperones cản trở sự biến tính của protein và hồi phục lại được các protein bị tổn thương. Vì những việc đó và nhiều cơ chế khác mà các tế bào đói có thể khó bị chết đi và đề kháng được với tình trạng bị đói, với sự biến hóa của nhiệt độ, sự tổn thương về oxy hóa và sự thẩm thấu, cũng như tăng sức đề kháng với các hóa chất có hại (như chlorine chẳng hạn). Những cải biến này rất có hiệu quả và làm cho một số vi khuẩn có thể sống lại sau vài năm bị đói. Rõ ràng việc hiểu rõ những vấn đề này sẽ có tầm quan trọng thực tiễn to lớn đối với y học và vi sinh vật học công nghiệp.

Chúng còn có thể chứng minh vi khuẩn thương hàn (*Salmonella typhimurium*) và nhiều vi khuẩn gây bệnh khác có thể có khả năng gây bệnh mạnh hơn khi bị đói.

14.1.4. Giai đoạn tử vong (Death Phase)

Việc tiêu hao chất dinh dưỡng và việc tích lũy các chất thải độc hại sẽ làm tổn thất đến môi trường sống của vi sinh vật, làm cho số lượng tế bào sống giảm xuống. Đó là đặc điểm của giai đoạn tử vong. Giống như giai đoạn logarit, sự tử vong của quần thể vi sinh vật cũng có tính logarit (tỷ lệ tế bào chết trong mỗi giờ là không đổi). Tổng số tế bào sống và tế bào chết không thay đổi vì các tế bào chết chưa bị phân hủy. Muốn xác định số lượng tế bào sống phải pha loãng ra rồi cấy lên thạch đĩa và đưa vào điều kiện thích hợp để xác định số khuẩn lạc xuất hiện. Mặc dầu phần lớn vi sinh vật tử vong theo phương thức logarit nhưng sau khi số lượng tế bào đột nhiên giảm xuống thì tốc độ chết của tế bào chậm lại. Đó là do một số cá thể sống lại nhờ có tính đề kháng đặc biệt mạnh. Vì điều này và những nguyên nhân khác làm cho đường cong của giai đoạn tử vong có thể khá phức tạp.

14.1.5. Tính toán về quá trình sinh trưởng

Không ít các nhà vi sinh vật học đã tính toán về tốc độ sinh trưởng của vi sinh vật trong giai đoạn logarit. Tính toán nhịp độ sinh trưởng sẽ làm cơ sở cho các nghiên cứu về sinh lý học, sinh thái học vi sinh vật, và còn để giải quyết một số vấn đề ứng dụng trong sản xuất công nghiệp.

Trong giai đoạn logarit mỗi cá thể vi sinh vật tiến hành phân cắt trong một thời gian hằng định. Số lượng tế bào tăng theo phương

thức 2^n . Thời gian giữa hai lần phân chia liên tiếp hay thời gian cần cho sự tăng đôi số tế bào được gọi là *thời gian thế hệ* (*generation time* hay *doubling time*). Ví dụ đưa một tế bào vào môi trường nuôi cấy, cứ 20 phút phân cắt một lần thì sau 20 phút có 2 tế bào, sau 40 phút có 4 tế bào và tiếp tục như vậy (bảng 14.1)

Bảng 14.1: Một ví dụ về sinh trưởng theo logarit

Thời gian *	Số lần phân cắt	2^n	Số lượng ($N_0 \times 2^n$)	$\lg_{10} N_t$
0	0	$2^0=1$	1	0,000
20	1	$2^1=2$	2	0,301
40	2	$2^2=4$	4	0,602
60	3	$2^3=8$	8	0,903
80	4	$2^4=16$	16	1,204
100	5	$2^5=32$	32	1,505
120	6	$2^6=64$	64	1,806

*Thời gian thế hệ là 20 phút, giả thiết là nuôi cấy từ 1 tế bào

Số lượng logarit tế bào là 2^n , n là số thế hệ. Có thể biểu thị các số liệu trong bảng 14.1 bằng công thức sau đây:

$$N_t = N_0 \times 2^n$$

Trong đó: N_0 là số lượng tế bào ban đầu; N_t là số lượng tế bào ở thời gian t; n là số thế hệ.

Từ công thức trên có thể biến đổi như sau và số thế hệ n được tính bằng logarit thập phân:

$$\log N_t = \log N_0 + n \log 2$$

$$n = \frac{\log N_t - \log N_0}{\log 2} = \frac{\log N_t - \log N_0}{0,301}$$

Khi nuôi cấy phân mẻ (batch culture) tốc độ sinh trưởng trong giai đoạn logarit có thể biểu thị bằng hằng số tốc độ sinh trưởng bình quân k (mean growth rate constant k). Đó là số thế hệ sinh ra trong đơn vị thời gian, thường biểu thị bằng số thế hệ trong 1 giờ:

$$k = \frac{n}{t} = \frac{\log N_t - \log N_0}{0,301 t}$$

Thời gian cần thiết để tăng gấp đôi tổng số tế bào là thời gian thế hệ bình quân (mean generation time) hay thời gian tăng gấp đôi bình quân (mean doubling time) và được biểu thị bằng g. Nếu $t=g$ thì $N_t = 2N_0$. Thay vào công thức trên ta có:

$$k = \frac{\log (2N_0) - \log N_0}{0,301 g} = \frac{\log 2 + \log N_0 - \log N_0}{0,301 g} = \frac{1}{g}$$

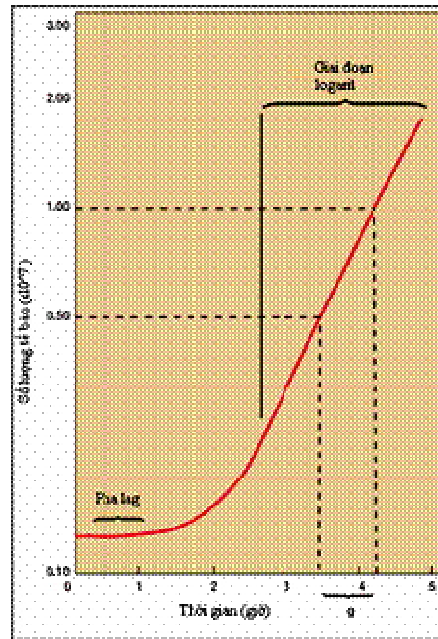
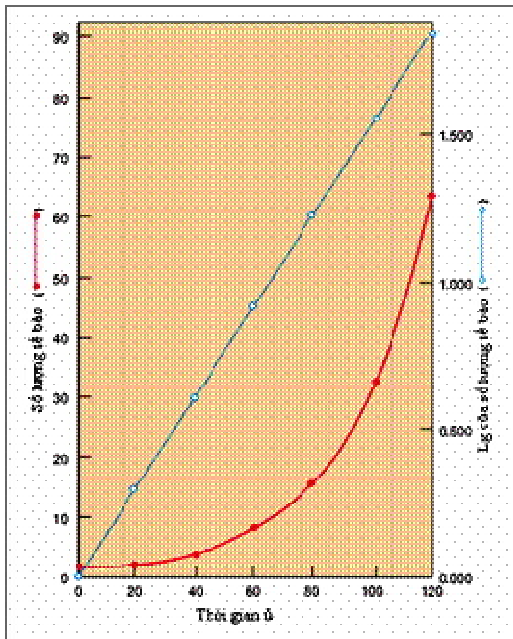
Thời gian thế hệ bình quân là đảo số của hằng số tốc độ sinh trưởng bình quân:

$$g = \frac{1}{k}$$

Thời gian thế hệ bình quân g có thể căn cứ trực tiếp vào đồ thị bán logarit (semilogarithmic plot) và hằng số tốc độ sinh trưởng để tính ra (hình 14.4). Ví dụ ,số lượng vi khuẩn tại giờ thứ 10 là từ 10^3 tăng lên đến 10^9 thì :

$$k = \frac{\text{Log } 10^9 - \text{log} 10^3}{(0,301)(10h)} = \frac{9-3}{3.01h} = 2.0 \quad (\text{thế hệ/h})$$

$$g = \frac{1}{2.0} = 0.5 \quad \text{giờ/thế hệ hay 30 phút/thế hệ}$$



<p><i>Hình 14.3: Sinh trưởng thế hệ của vi sinh vật (biểu thị 6 thế hệ)</i></p> <p><i>(Theo sách của Prescott, Harley và Klein).</i></p>	<p><i>Hình 14.4; Xác định thời gian thế hệ.</i></p> <p><i>Thời gian thế hệ có thể xác định bằng đường cong sinh trưởng của vi sinh vật. Lấy thời gian là trục hoành và lấy số lượng tế bào làm trục tung. Thời gian tăng gấp đôi số</i></p>
--	---

	<i>lượng của quần thể (thời gian thế hệ) có thể đọc trực tiếp trên đồ thị</i>
--	---

Thời gian thế hệ thay đổi tùy theo chủng loại vi sinh vật, điều kiện nuôi cấy. Một số vi khuẩn thời gian thế hệ không quá 10 phút (0,17h) trong khi ở một số vi sinh vật nhân thực (eucaryotic) lại dài tới vài ngày (Bảng 14.2). Thời gian thế hệ trong tự nhiên thường là dài hơn so với khi nuôi cấy.

Bảng 14.2: Thời gian thế hệ của một số loài vi sinh vật

Vi sinh vật	Nhiệt độ (°C)	Thời gian thế hệ (giờ)
Vi khuẩn và Vi khuẩn lam		
Beneckea natriegens	37	0,16
Escherichia coli	40	0,35
Bacillus subtilis	40	0,43
Staphylococcus aureus	37	0,47
Pseudomonas aeruginosa	37	0,58

Clostridium botulinum	37	0,58
Rhodospirillum rubrum	25	4,6-5,3
Anabaena cylindrica	25	10,6
Mycobacterium tuberculosis	37	Khoảng 12
Treponema pallidum	37	33
Tảo		
Scenedesmus quadricauda	25	5,9
Chlorella pyrenoidosa	25	7,75
Asterionella formosa	20	9,6
Euglena gracilis	25	10,9
Ceratium tripos	20	82,8
Động vật nguyên sinh		
Tetrahymena geleii	24	2,2-4,2

Leishmania donovani	26	10-12
Paramecium caudatum	26	10,4
Acanthamoeba castellanii	30	11-12
Giardia lamblia	37	18
Nấm		
Saccharomyces cerevisiae	30	2
Monilinia fructicola	25	30

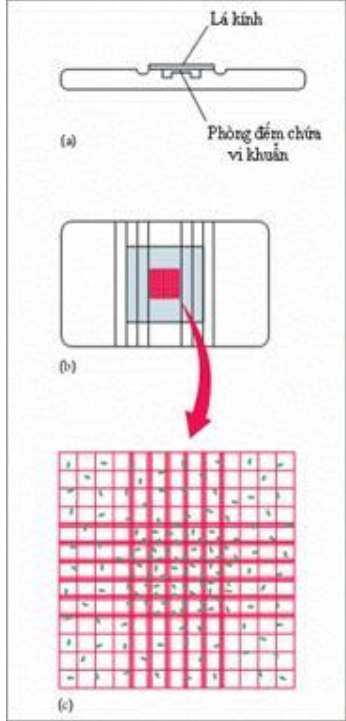
14.2. XÁC ĐỊNH SỰ SINH TRƯỞNG CỦA VI SINH VẬT

Có nhiều cách thông qua việc xác định sự biến đổi số lượng và chất lượng vi sinh vật để hiểu được sự sinh trưởng của vi sinh vật, biết được tốc độ sinh trưởng và thời gian thế hệ. Dưới đây sẽ giới thiệu các phương pháp thường dùng nhất cùng các ưu, khuyết điểm của các phương pháp này. Không có phương pháp nào là tốt

nhất, lựa chọn phương pháp nào còn phụ thuộc vào từng trường hợp cụ thể.

14.2.1. Xác định số lượng tế bào

Phương pháp đơn giản nhất để xác định số lượng tế bào là đếm trực tiếp dưới kính hiển vi. Dùng các phòng đếm để đếm vừa nhanh chóng, dễ dàng, lại rẻ tiền nhất, lại có thể quan sát thấy kích cỡ và hình dáng tế bào. Thường dùng phòng đếm Petroff-Hausser để đếm tế bào động vật nguyên sinh. Dùng phòng đếm hồng cầu có thể đếm được các tế bào nhân nguyên thủy cũng như tế bào nhân thật. Với tế bào nhân nguyên thủy cần nhuộm màu hoặc là dùng kính hiển vi tương phản pha hay kính hiển vi huỳnh quang (phase-contrast or fluorescence microscope) để dễ quan sát hơn. Phòng đếm có cấu trúc để có một độ sâu nhất định lại có chia ra thành các ô nhỏ (hình 14.5). Khi đếm số lượng ta đưa dịch pha loãng vào phòng đếm, đặt lá kính (lamelle/ cover glass) lên trên, sau đó tiến hành đếm số lượng dưới kính hiển vi. Khuyết điểm của phương pháp này là không xác định được với các mẫu có số lượng vi khuẩn quá nhỏ, độ chính xác cũng không cao vì không phân biệt được giữa tế bào sống và tế bào chết.



Hình 14.5: Phòng đếm Petroff-Hauser:

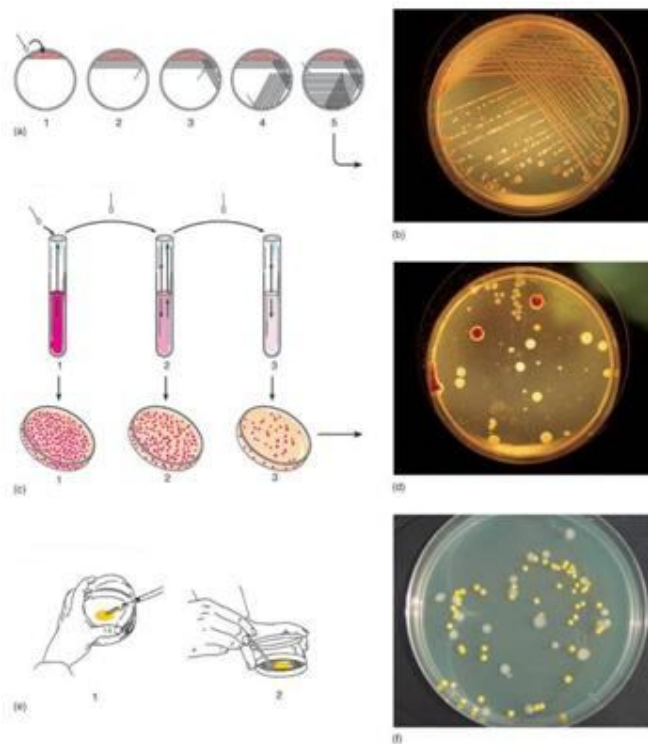
(a)- Mặt nhìn nghiêng của phòng đếm- Phòng đếm chứa dịch huyền phù vi khuẩn là khoảng không gian bên dưới lá kính; (b)- Giữa phiến kính có phòng đếm với các ô nhỏ; (c) Ở độ phóng đại khoảng x 400-500 tiến hành đếm số lượng vi khuẩn trong các ô nhỏ. Lấy số lượng bình quân để tính ra mật độ vi khuẩn trong mẫu vật. Trong phạm vi 1mm^2 có 225 ô nhỏ, do đó số lượng vi khuẩn trên 1mm^2 là $(\text{số vi khuẩn}/\text{mm}) \times 25$; vì phòng đếm có chiều dày là $0,02\text{mm}$ do đó nồng độ vi khuẩn trong phòng đếm là: $(\text{số vi khuẩn})/\text{m}^2 \times 25$ (tổng số ô nhỏ) $\times 50 = \text{số vi khuẩn}/\text{mm}^3$.
 Vì $1\text{cm}^3 = 1\text{mm}^3 \times 10^3$ cho nên giả thử số lượng vi khuẩn bình quân trong mỗi ô nhỏ là 28 thì trong 1cm^3 có nồng độ vi khuẩn là $28 \times 25 \times 50 \times 10^3 = 3,5 \times 10^7$ vi khuẩn. Nhân với độ pha loãng ban đầu (nếu có) sẽ biết được nồng độ vi khuẩn trong mẫu kiểm tra.

Với động vật nguyên sinh, vi tảo và nấm men có thể dùng máy đếm điện tử như loại máy Coulter Counter để xác định số lượng. Nguyên lý là hai bên mỗi lỗ nhỏ có điện cực và nối điện. Khi tế bào trong dịch huyền phù đi qua lỗ nhỏ thì cứ mỗi tế bào đi qua thì điện trở lại tăng lên (hoặc tính dẫn điện giảm xuống) và sinh ra một tín hiệu điện, máy đếm sẽ tự động ghi số. Kết quả xác định của loại máy này khá chính xác, có thể ứng dụng rộng rãi để xác định số lượng hồng cầu và bạch cầu, nhưng phương pháp này không thích hợp xác định số lượng vi khuẩn vì dễ bị can thiệp bởi các hạt nhỏ và các vật chất dạng sợi trong mẫu vật.

Cả hai phương pháp nói trên đều không phân biệt được tế bào sống và tế bào chết. Để xác định số lượng tế bào sống người ta thường dùng phương pháp cấy dịch pha loãng lên bề mặt môi trường thạch đĩa. Sau khi nuôi cấy mỗi vi khuẩn sẽ tạo thành 1 khuẩn lạc. Ví dụ ở độ pha loãng 1×10^{-6} đếm được 150 khuẩn lạc thì có nghĩa là mật độ vi khuẩn trong mẫu là $1,5 \times 10^8$.

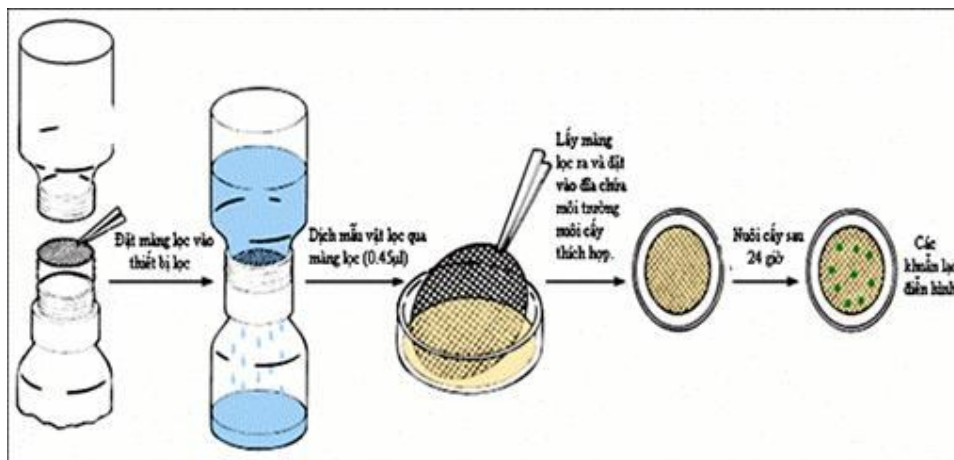
Dùng dụng cụ đếm khuẩn lạc càng thêm thuận tiện. Phương pháp này cho biết số lượng các tế bào sống của vi sinh vật. Phương pháp này đơn giản, nhạy cảm và thích hợp ứng dụng rộng rãi để xác định số lượng vi sinh vật sống khi phân tích các mẫu thực phẩm, nước, đất... Tuy nhiên kết quả cũng chịu ảnh hưởng của một số nhân tố. Nếu vi khuẩn dính thành khối không tách rời nhau ra thì kết quả thu được là thấp hơn thực tế., vì mỗi khuẩn lạc

không phát triển từ một tế bào riêng rẽ. Vì vậy kết quả thu được từ phương pháp này được coi là số đơn vị hình thành khuẩn lạc (CFU-colony forming unit). CFU không hoàn toàn phù hợp với số tế bào sống trong mẫu vật. Trong quá trình sử dụng phương pháp này nên sử dụng độ pha loãng nào cho số khuẩn lạc xuất hiện trên đĩa chỉ nằm trong phạm vi khoảng 30-300 mà thôi. Đương nhiên môi trường dinh dưỡng không thể đáp ứng chung cho mọi loại vi sinh vật, do đó kết quả thu được bao giờ cũng thấp hơn thực tế. Khi trộn thạch với dịch pha loãng thì thạch đã đủ nguội để không làm chết vi khuẩn hay làm thương tổn với một số loại mẫn cảm với nhiệt độ. Việc cấy cấy dịch pha loãng trên bề mặt rồi dàn đều bằng que gạt thủy tinh thường cho kết quả cao hơn về số lượng vi sinh vật so với phương pháp trộn với môi trường thạch chưa đông.



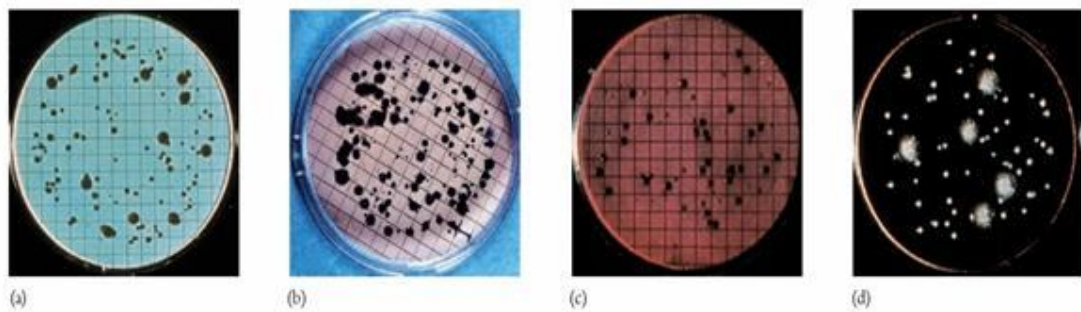
Hình 14.6: Tách khuẩn lạc và phương pháp kiểm tra số lượng vi sinh vật thông qua đếm khuẩn lạc mọc trên môi trường thạch đĩa.
 (a) (b)- Cách ria cấy để tách khuẩn lạc riêng rẽ (không dùng để đếm số lượng) (c)(d)- Cách pha loãng rồi trộn với môi trường thạch chưa đông
 (e)(f)- Cách dàn dịch pha loãng bằng que gạt trên mặt thạch (cho số lượng khuẩn lạc nhiều hơn). Theo sách của K.P.Talaro, 2005.

Để xác định số lượng vi sinh vật còn có thể nuôi cấy giấy lọc đã lọc dịch pha loãng mẫu vật. Phương pháp này gọi là phương pháp màng lọc (membrane filter). Dùng một thiết bị lọc đặc biệt đặt vừa một giấy lọc hình tròn có các lỗ nhỏ hơn kích thước vi khuẩn và các vi sinh vật khác. Sau khi lọc đặt giấy lọc lên môi trường thạch thích hợp hoặc thấm ướt màng lọc bằng dịch môi trường thích hợp rồi để nuôi cấy 24 giờ. Đếm số khuẩn lạc mọc trên giấy lọc để tính ra mật độ vi khuẩn sống có mặt trong mẫu vật (hình 14.7)



Hình 14.7: Phương pháp lọc màng để xác định số lượng vi sinh vật

Phương pháp này thích hợp để sử dụng phân tích vi sinh vật trong nước. Có thể dùng các môi trường khác nhau thích hợp với các nhóm vi sinh vật khác nhau (hình 14.8)



Hình 14.8: Các loại khuẩn lạc mọc trên màng lọc.

Theo sách của Prescott, Harley và Klein (2005)

(a)- Tổng số vi khuẩn mọc trên môi trường tiêu chuẩn, Dùng chỉ thị màu để nhuộm đỏ khuẩn lạc cho dễ đếm;

(b)- Dùng môi trường thích hợp để kiểm tra nhóm vi khuẩn coliform có nguồn gốc từ phân (khuẩn lạc bắt màu xanh);

(c)- Dùng môi trường thạch m-Endo để xác định vi khuẩn E.coli và các Coliform khác- khuẩn lạc có màu lục;

(d)- Nấm sợi và nấm men mọc trên môi trường Thạch - Mạch nha.

Phương pháp màng lọc còn dùng để đếm trực tiếp vi khuẩn. Dịch mẫu vật được lọc qua một màng polycarbonate màu đen. Vi khuẩn trên màng lọc được nhuộm màu huỳnh quang bằng thuốc nhuộm acridine da cam hoặc DAPI (diamidino-2-phenylindole). Quan sát dưới kính hiển vi huỳnh quang có thể thấy các tế bào vi sinh vật hiện lên màu da cam hay màu lục trên một nền đen. Hiện đã có

những kit thương mại cho phép phân biệt tế bào sống và tế bào chết khi kiểm tra.

14.2.2. Xác định khối lượng tế bào

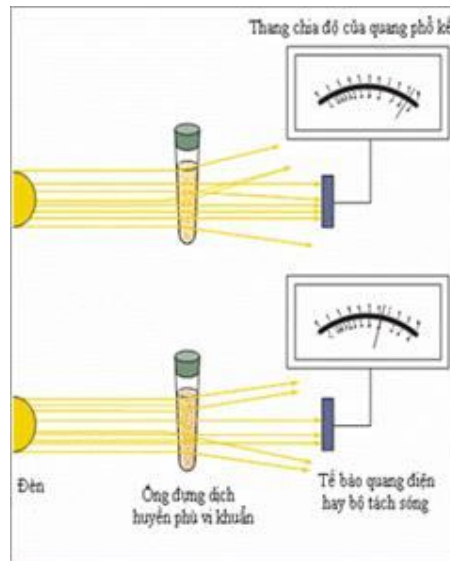
Sự sinh trưởng của vi sinh vật không chỉ biểu hiện ở số lượng tế bào mà còn ở cả sự tăng trưởng của tổng khối lượng tế bào.

Phương pháp trực tiếp nhất là xác định trọng lượng khô của tế bào. Trước hết cần ly tâm để thu nhận sinh khối tế bào. Sau đó rửa tế bào rồi làm khô trong lò sấy rồi cân trọng lượng khô.

Phương pháp này thích hợp để xác định sự sinh trưởng của nấm. Phương pháp này tốn thời gian và không thật miễn cảm. Đối với vi khuẩn vì trọng lượng từng cá thể là rất nhỏ, thậm chí phải ly tâm tới vài trăm ml mới đủ số lượng để xác định trọng lượng sinh khối khô.

Phương pháp nhanh hơn, miễn cảm hơn là dùng phương pháp đo độ đục nhờ tán xạ ánh sáng. Mức độ tán xạ ánh sáng tỷ lệ thuận với nồng độ tế bào. Lúc nồng độ vi khuẩn đạt đến 10^7 tế bào/ml thì dịch nuôi cấy sẽ vẫn đục, nồng độ càng tăng thì độ đục cũng tăng theo và làm cản trở ánh sáng đi qua dịch nuôi. Có thể đo độ tán xạ ánh sáng bằng quang phổ kế (spectrophotometer). Ở một mức độ hấp thụ ánh sáng thấp, giữa nồng độ tế bào và giá trị hấp thụ ánh sáng có quan hệ tuyến tính (hình 14.9). Chỉ cần nồng độ vi sinh vật đạt tới nồng độ có thể đo được là đều có thể dùng phương pháp đo độ đục trên quang phổ kế để xác định sự sinh trưởng của vi sinh vật. Nếu hàm lượng một số vật chất trong mỗi tế bào là giống nhau thì tổng lượng chất đó trong tế bào có tương quan trực tiếp với tổng sinh khối vi sinh vật. Chẳng hạn, thu tế bào trong một thể tích nhất định của dịch nuôi cấy, rửa sạch đi rồi đo tổng lượng

protein hay tổng lượng nitrogen, có thể thấy sự tăng quần thể vi sinh vật là phù hợp với sự tăng tổng lượng protein (hay N). Cũng tương tự như vậy, việc xác định tổng lượng chlorophyll có thể dùng để đo sinh khối tảo; đo hàm lượng ATP có thể biết được sinh khối của các vi sinh vật sống.



Hình 14.9: Đo số lượng vi sinh vật bằng phương pháp đo độ đục.

Thông qua việc đo độ hấp thụ ánh sáng có thể xác định được sinh khối vi sinh vật. Khi số lượng tế bào tăng lên sẽ dẫn đến việc tăng độ đục, mức độ tán xạ ánh sáng nhiều hơn và quang phổ kế sẽ đo được mức độ tăng lên của trị số hấp thụ ánh sáng. Trên quang phổ kế có hai thang chia độ: phía dưới là trị số hấp thụ ánh sáng, phía trên là mức độ thấu quang. Khi trị số hấp thụ ánh sáng tăng lên thì mức độ thấu quang hạ xuống.

14.3. NUÔI CẤY LIÊN TỤC VI SINH VẬT

Trong các phần trên chúng ta xem xét việc nuôi cấy phân mẻ (batch cultures) trong các hệ thống kín, tức là không có chuyện bổ sung chất dinh dưỡng, cũng không thải loại các sản phẩm có hại sinh ra trong quá trình sống. Giai đoạn logarit chỉ duy trì qua vài thế hệ sau đó chuyển vào giai đoạn ổn định. Nếu nuôi cấy vi sinh vật trong một hệ thống hở, trong quá trình nuôi cấy thường xuyên bổ sung chất dinh dưỡng và thải loại các chất cặn bã thì có thể làm cho môi trường luôn giữ ở trạng thái ổn định. Đó là hệ thống

nuôi cấy liên tục (continuous culture system). Trong hệ thống này sự sinh trưởng của vi sinh vật luôn giữ được ở trạng thái logarit, nồng độ sinh khối vi sinh vật luôn giữ được ổn định trong một thời gian tương đối dài.

Giả thử ta có một bình nuôi cấy trong đó vi khuẩn đang sinh trưởng, phát triển. Ta cho chảy liên tục vào bình một môi trường mới có thành phần không thay đổi. Thể tích bình nuôi cấy giữ ổn định. Dòng môi trường đi vào bù đắp cho dòng môi trường đi ra với cùng một tốc độ. Ta gọi thể tích của bình là v (lit), tốc độ dòng môi trường đi vào là f (lít/ giờ). Tốc độ (hay Hệ số) pha loãng được gọi là D (f/v). Đại lượng D biểu thị sự thay đổi thể tích sau 1 giờ. Nếu vi khuẩn không sinh trưởng và phát triển thì chúng sẽ bị rút dần ra khỏi bình nuôi cấy theo tốc độ:

$$v = dX/dt = D.X$$

X là sinh khối tế bào

Người ta thường dùng hai loại thiết bị để nuôi cấy liên tục vi sinh vật. Đó là Chemostat và Turbidostat.

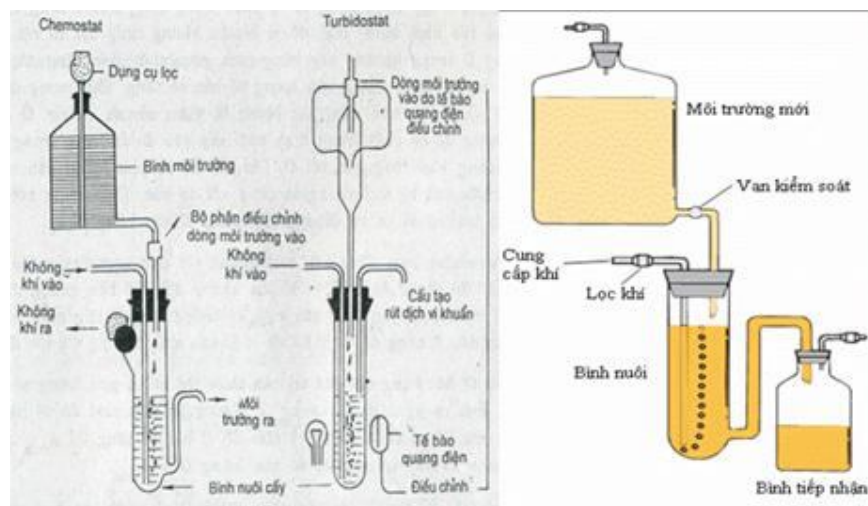
14.3.1. Chemostat

Khi sử dụng Chemostat để nuôi cấy vi sinh vật người ta đưa môi trường vô khuẩn vào bình nuôi cấy với lượng tương đương với tốc độ đưa môi trường chứa vi khuẩn ra khỏi bình nuôi cấy (xem hình 14.10). Trong môi trường một số chất dinh dưỡng thiết yếu (như một vài acid amin) cần khống chế nồng độ trong một phạm vi nhất định. Vì vậy tốc độ sinh trưởng của vi sinh vật trong hệ thống quyết định bởi tốc độ môi trường mới được đưa vào hệ thống và

nồng độ tế bào phụ thuộc vào nồng độ các chất dinh dưỡng được hạn chế. Nhịp độ đổi mới chất dinh dưỡng biểu thị bởi nhịp độ pha loãng D (dilution rate). Tốc độ lưu thông của chất dinh dưỡng (ml/h) được biểu thị bằng f và thể tích bình nuôi cấy là V (ml):

$$D = f/V$$

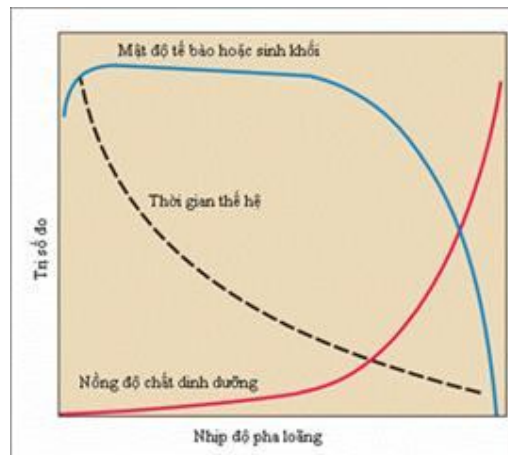
Chẳng hạn nếu f là 30ml/h và V là 100ml thì nhịp độ pha loãng D là $0,30h^{-1}$. Cả số lượng vi sinh vật và thời gian thế hệ đều có liên quan đến nhịp độ pha loãng (hình 14.11). Trong một phạm vi nhịp độ pha loãng tương đối rộng thì mật độ vi sinh vật trong hệ thống là không thay đổi. Khi nhịp độ pha loãng tăng lên, thời gian thế hệ hạ xuống (tốc độ sinh trưởng tăng lên), khi đó chất dinh dưỡng hạn chế bị tiêu hao hết. Nếu nhịp độ pha loãng quá cao thì vi sinh vật bị loại ra khỏi bình nuôi cấy trước khi kịp sinh sôi nảy nở bởi vì lúc đó nhịp độ pha loãng cao hơn tốc độ sinh trưởng của vi sinh vật. Nồng độ các chất dinh dưỡng hạn chế tăng lên khi nhịp độ pha loãng tăng cao vì có ít vi sinh vật sử dụng chúng.



*Hình 14.10: Nuôi cấy liên tục
trong
Chemostat và Turbidostat*

*Hình 14.11: Hệ thống nuôi cấy
liên tục (Chemostat)*

Khi nhịp độ pha loãng rất thấp thì nếu tăng nhịp độ pha loãng sẽ làm cho cả mật độ tế bào và tốc độ sinh trưởng đều tăng lên. Đó là do hiệu ứng của nồng độ chất dinh dưỡng đối với nhịp độ sinh trưởng (growth rate). Quan hệ này có lúc được gọi là quan hệ Monod (Monod relationship). Trong điều kiện nhịp độ pha loãng thấp, chỉ có ít ỏi chất dinh dưỡng được cung cấp thì tế bào phải dùng phần lớn năng lượng để duy trì sự sống chứ không dùng để sinh trưởng, phát triển. Lúc nhịp độ pha loãng tăng lên, chất dinh dưỡng tăng lên, tế bào có nhiều năng lượng được cung cấp, không những để duy trì sự sống mà còn có thể dùng để sinh trưởng, phát triển, làm tăng cao mật độ tế bào. Nói cách khác, khi tế bào có thể sử dụng năng lượng vượt quá năng lượng duy trì (maintenance energy) thì nhịp độ sinh trưởng sẽ bắt đầu tăng lên.



Hình 14.12: Tỷ lệ pha loãng trong chemostat và sinh trưởng của vi sinh vật

14.3.2. Turbidostat

Turbidostat là loại hệ thống nuôi cấy liên tục thứ hai. Thông qua tế bào quang điện (photocell) để đo độ hấp thụ ánh sáng hay độ đục trong bình nuôi cấy để tự động điều chỉnh lưu lượng môi trường dinh dưỡng, làm cho độ đục hay mật độ tế bào giữ ở mức độ như dự kiến. Turbidostat và Chemostat có nhiều điểm khác nhau. Trong hệ thống Turbidostat môi trường không chứa các chất dinh dưỡng hạn chế, nhịp độ pha loãng không cố định. Turbidostat hoạt

động tốt nhất khi nhịp độ pha loãng cao trong khi Chemostat lại ổn định nhất và hiệu quả nhất khi nhịp độ pha loãng tương đối thấp.

Hệ thống nuôi cấy liên tục là rất có lợi vì các tế bào luôn ở trạng thái sinh trưởng thuộc giai đoạn logarit. Hơn nữa có thể dùng làm mô hình để nghiên cứu sự sinh trưởng của vi sinh vật trong điều kiện nồng độ chất dinh dưỡng thấp tương tự như ở môi trường tự nhiên. Hệ thống nuôi cấy liên tục rất có ích trong việc nghiên cứu nhiều lĩnh vực khác. Chẳng hạn, để nghiên cứu tác dụng tương hỗ giữa các loài vi sinh vật trong điều kiện môi trường tương tự như môi trường nước ao hồ nước ngọt. Hệ thống nuôi cấy liên tục đã được sử dụng trong các ngành vi sinh vật học công nghiệp và thực phẩm.

14.4. ẢNH HƯỞNG CỦA CÁC NHÂN TỐ MÔI TRƯỜNG ĐẾN SỰ SINH TRƯỞNG CỦA VI SINH VẬT

Như chúng ta đã biết vi sinh vật có khả năng đáp ứng với sự biến hóa của nồng độ chất dinh dưỡng, nhất là các chất dinh dưỡng hạn chế. Sự sinh trưởng của vi sinh vật chịu ảnh hưởng rất lớn đối với các nhân tố vật lý, hóa học của môi trường sống. Hiểu biết về ảnh hưởng của các nhân tố môi trường đối với sự sinh trưởng của vi sinh vật giúp ích rất nhiều cho việc khống chế vi sinh vật cũng như đối với việc nghiên cứu sự phân bố sinh thái của vi sinh vật. Đáng chú ý là một số vi sinh vật có thể sống được trong những điều kiện cực đoan (extreme) và khó sống (inhospitable). Các vi sinh vật nhân nguyên thủy (Procaryotes) có thể sinh tồn tại ở mọi nơi có thể sinh sống. Nhiều nơi các vi sinh vật khác không thể tồn tại được nhưng vi sinh vật nhân nguyên thủy vẫn có thể sinh trưởng rất tốt. Chẳng hạn vi khuẩn *Bacillus infernus* có thể sống ở

độ sâu 1,5 dặm dưới mặt đất, nơi không có ôxy và có nhiệt độ cao đến 60°C. Những vi sinh vật có thể sinh trưởng được trong những hoàn cảnh hà khắc như vậy được gọi là các vi sinh vật ưa cực đoan.

Trong phần này chúng ta sẽ xem xét ảnh hưởng của một số nhân tố chủ yếu của môi trường đối với sự sinh trưởng của vi sinh vật (bảng 14.3)

Bảng 14.3: Phản ứng của vi sinh vật với các nhân tố môi trường

Thuật ngữ	Định nghĩa	Vi sinh vật đại diện
Hoạt tính của nước và dung chất		
<i>Vi sinh vật ưa áp (Osmotolerant)</i>	Có thể sinh trưởng trong một phạm vi rộng về hoạt tính của nước và nồng độ thẩm thấu.	<i>Staphylococcus aureus, Saccharomyces</i>
<i>Vi sinh vật ưa mặn (Halophile)</i>	Cần sinh trưởng ở nồng độ NaCl cao, thường là từ 0,2 mol/L trở lên.	<i>Halobacterium, Dunaliella, Ectothiorhodospira</i>
pH		
<i>Ưa acid (Acidophile)</i>	Sinh trưởng tốt nhất trong	<i>Sulfolobus, Picrophilus, Ferroplasma, Acontium,</i>

	phạm vi pH 0-5,5	<i>Cyanidium caldarium</i> .
<i>Ưa trung tính (Neutrophile)</i>	Sinh trưởng tốt nhất trong phạm vi pH 5,5- 8,0	<i>Escherichia, Euglena, Paramecium</i>
<i>Ưa kiềm (Alkalophile)</i>	Sinh trưởng tốt nhất trong phạm vi pH 8,5-11,5	<i>Bacillus alcalophilus, Natronobacterium</i>
Nhiệt độ		
<i>Ưa lạnh (Psychrophyle)</i>	Sinh trưởng tốt nhất ở 15 ⁰ C hay thấp hơn.	<i>Bacillus psychrophilus, Chlamydomonas nivalis</i>
<i>Chịu lạnh (Psychrotroph)</i>	Có thể sinh trưởng ở 0-7 ⁰ C nhưng sinh trưởng tốt nhất ở 20-30 ⁰ C, còn có thể sinh trưởng được ở khoảng 35 ⁰ C	<i>Listeria monocytogenes, Pseudomonas fluorescens</i>
<i>Ưa ấm (Mesophile)</i>	Sinh trưởng tốt nhất ở 25-45 ⁰ C.	<i>Escherichia coli, Neisseria, Gonorrhoeae, Trichomona vaginalis.</i>
<i>Ưa nhiệt (Thermophile)</i>	Có thể sinh trưởng ở nhiệt	<i>Bacillus stearothermophilus,</i>

	độ 55 ⁰ C hoặc cao hơn, nhiệt độ thích hợp nhất thường là giữa 55 và 65 ⁰ C	<i>Thermus aquaticus</i> , <i>Cyanidium caldarium</i> , <i>Chaetomium thermophile</i>
<i>Ưa nhiệt cao</i> (<i>Hyperthermophile</i>)	Thích hợp phát triển ở nhiệt độ giữa 80 và khoảng 113 ⁰ C	<i>Sulfolobus</i> , <i>Pyrodictium</i> , <i>Pyrococcus</i> .
Nồng độ Ôxy		
<i>Hiếu khí bắt buộc</i> (<i>Obligate aerobe</i>)	Hoàn toàn dựa vào O ₂ của không khí để sinh trưởng	<i>Micrococcus luteus</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Mycobacterium</i> , phần lớn <i>Tảo</i> , <i>Nấm</i> và <i>ĐV nguyên sinh</i>
<i>Kỵ khí không bắt buộc</i> (<i>Facultative anaerobe</i>)	Không cần O ₂ để sinh trưởng nhưng sinh trưởng tốt hơn khi có mặt O ₂ .	<i>Escherichia</i> , <i>Enterococcus</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>Kỵ khí chịu Oxy</i> (<i>Aerotolerant anaerobe</i>)	Sinh trưởng như nhau khi có mặt hay không có ôxy	<i>Streptococcus pyogenes</i>
<i>Kỵ khí bắt buộc</i>	Bị chết khi có	<i>Clostridium</i> , <i>Bacteroides</i> ,

<i>(Obligate anaerobe)</i>	mặt O ₂	<i>Methanobacterium,</i> <i>Trepomonas agilis.</i>
<i>Vi hiếu khí</i> <i>(Microaerophile)</i>	Cần O ₂ ở mức độ thấp hơn 2- 10% để sinh trưởng và bị tổn hại trong không khí (20%)	<i>Campylobacter, Spirillum</i> <i>volutans, Treponema</i> <i>pallidum</i>
Áp suất		
<i>Ưa áp (Barophile)</i>	Sinh trưởng nhanh hơn khi áp suất thủy tĩnh cao	<i>Photobacterium profundum,</i> <i>Shewanella benthica,</i> <i>Methanococcus jannaschii</i>

14.4.1. Hoạt tính của nước và dung chất

Vì tế bào vi sinh vật tách với môi trường của chúng bằng loại màng sinh chất có tính thẩm thấu chọn lọc cho nên vi sinh vật chịu ảnh hưởng của sự biến đổi nồng độ thẩm thấu trong môi trường. Nếu một vi sinh vật được đưa vào dung dịch có nồng độ thẩm thấu thấp thì nước sẽ xâm nhập vào tế bào, nếu không có sự khống chế hữu hiệu thì tế bào sẽ bị trương lên và vỡ ra. Nhờ có các thể nội hàm mà có thể giảm thấp nồng độ thẩm thấu của tế bào chất. Lúc tính thẩm thấu của môi trường thấp hơn tính thẩm thấu của tế bào chất, các vi sinh vật nhân nguyên thủy cũng có thể phá vỡ các kênh mẫn cảm với áp suất làm cho dung chất thẩm ra.

Phần lớn vi khuẩn, tảo và nấm thường có thành tế bào vững chắc, có thể duy trì hình thái và tính hoàn chỉnh của tế bào. Lúc đưa tế bào các vi sinh vật có thành tế bào vững chắc vào môi trường áp suất thẩm thấu cao thì nước sẽ thoát ra, màng sinh chất sẽ tách ra khỏi thành tế bào và tạo ra tình trạng co nguyên sinh. Sự mất nước này của tế bào sẽ tổn hại tới màng tế bào chất, tế bào sẽ mất khả năng trao đổi chất và ngừng sinh trưởng. Điều này liên quan đến việc bảo quản thực phẩm nhờ muối mặn hoặc tẩm đường (làm mứt, ngâm mật ong...).

Nhiều vi sinh vật sử dụng dung chất hỗn hợp (compatible solute) để làm cho nồng độ thẩm thấu của nguyên sinh chất cao hơn môi trường chung quanh, làm cho màng sinh chất vẫn gắn được với thành tế bào. Sở dĩ gọi là dung chất hỗn hợp là vì dung chất đó có thể thích hợp để tế bào sinh trưởng và phát triển ngay khi có nồng độ cao trong tế bào. Phần lớn vi sinh vật nhân nguyên thủy có thể nâng cao nồng độ thẩm thấu trong tế bào ở môi trường áp suất thẩm thấu cao là nhờ tổng hợp hoặc hấp thu choline, betaine, proline, acid glutamic và các acid amin khác. Việc nâng cao nồng độ K^+ cũng có thể ở một mức độ nào đó giúp nâng cao nồng độ thẩm thấu trong tế bào. Tảo và nấm thì sử dụng saccharose và các polyol, ví dụ như arabitol, glycerol, mannitol,... để đạt được mục đích như vậy. Polyol và acid amin là những dung chất lý tưởng để nâng cao nồng độ thẩm thấu trong tế bào bởi vì chúng không phá hủy cấu trúc và chức năng của enzym. Nhiều vi sinh vật nhân nguyên thủy như *Halobacterium salinarium* sử dụng K^+ để nâng cao nồng độ thẩm thấu trong tế bào, Na^+ cũng có tác dụng này nhưng không sử dụng được cao như K^+ . Các enzyme của *Halobacterium* cần nồng độ muối cao để duy trì hoạt tính.

Động vật nguyên sinh do không có thành tế bào nên phải sử dụng các không bào (vacuoles) để bài xuất phần nước dư thừa khi sống trong môi trường có nồng độ thẩm thấu thấp.

Tác dụng tương hỗ giữa phân tử nước và phân tử dung chất được gọi là hiệu ứng thẩm thấu (osmotic effect) còn hiệu ứng cơ chất (matric effect) là biểu thị các phân tử nước bị hấp phụ (adsorption) trên bề mặt các chất rắn. Hai hiệu ứng này dẫn đến việc giảm sút phần nước có thể được vi sinh vật sử dụng. Vì nồng độ thẩm thấu trong môi trường có ảnh hưởng sâu sắc đối với vi sinh vật cho nên để định lượng khả năng sử dụng nước các nhà vi sinh vật học thường dùng khái niệm hoạt độ nước a_w (water activity a_w) để biểu thị tính hữu hiệu của nước. Cũng có thể dùng thế năng nước (water potential) tương quan với a_w để biểu thị tính hữu hiệu của nước. Hoạt độ nước của một dung dịch là 1/100 của độ ẩm tương đối của dung dịch này (tính theo %), cũng là tương đương với tỷ lệ giữa áp suất bay hơi của dung dịch này (P_{soln}) và áp suất bay hơi của nước tinh khiết (P_{water}):

$$a_w = \frac{P_{\text{soln}}}{P_{\text{water}}}$$

Hoạt độ nước của một dung dịch hay một chất rắn có thể xác định bằng cách đưa vào một vật chứa kín và đo độ ẩm tương đối sau khi hệ thống đạt tới trạng thái cân bằng (equilibrium). Ví dụ, một mẫu vật sau khi đạt tới trạng thái cân bằng trong hệ thống này mà không khí đạt tới 95% bão hòa, thì cũng tức là không khí chứa 95% độ ẩm khi đạt tới cân bằng ở cùng nhiệt độ với một mẫu nước thuần khiết, hoạt độ nước của mẫu vật này là 0,95%. Hoạt độ nước tỷ lệ nghịch với áp suất thẩm thấu, nếu áp suất thẩm thấu cao thì trị số a_w là thấp.

Các vi sinh vật khác nhau có năng lực thích ứng khác nhau rất lớn đối với môi trường có hoạt độ nước thấp (bảng 14.4)

Bảng 14.4: Trị số tương đối về hoạt độ nước (a_w) thấp nhất đối với sự sinh trưởng của vi sinh vật (theo A.D. Brown, 1976)

Hoạt độ nước	Môi trường	Vi khuẩn, Nấm, Tảo
1,00	Nước thuần khiết	Phần lớn VK Gram (-) không ưa mặn
0,95	Bánh mì	Phần lớn trực khuẩn Gram (-) <i>Basidiomycetes Fusarium</i> Phần lớn <i>Mucor, Rhizopus, Bacillus</i> .
0,90	Đùi gia súc	Phần lớn cầu khuẩn, Nấm men có bào tử túi.
0,85	Salami Ý	<i>Staphylococcus</i>
0,80	Thực phẩm muối	<i>Saccharomyces rouxii</i> (trong muối), <i>Penicillium</i>
0,75	Hồ muối Cá muối	<i>Halobacterium, Aspergillus, Dunaliella, Actinospora</i>
0,70	Ngũ cốc, kẹo, quả khô	<i>Aspergillus</i>
0,60	Sôcôla, mật ong, sữa bột	<i>Saccharomyces rouxii</i> (trong đường), <i>Xeromyces bisporus</i>
0,55	ADN bị phá hủy	

Có thể kể thêm vài ví dụ khác về trị số a_w : máu người- 0,995; quả tươi- 0,97-0,98; nước biển- 0,98; thịt gia súc tươi- 0,97; sirô- 0,90;

giảm bông- 0,90; lạp xường- 0,85; mút quả- 0,80; nước đường
bão hòa- 0,76; bột mỳ- 0,65...

Vi sinh vật muốn giữ lượng nước bằng cách duy trì dung chất nội bào ở nồng độ cao khi sinh trưởng trong môi trường có hoạt độ nước thấp sẽ gặp khó khăn khá lớn. Những vi sinh vật có thể tồn tại trong những điều kiện như vậy được gọi là các vi sinh vật *chịu áp* (osmotolerant). Chúng có thể sinh trưởng được trong một phạm vi nồng độ thẩm thấu hoặc hoạt độ nước khá rộng. Ví dụ , vi khuẩn *Staphylococcus aureus* có thể nuôi cấy trên môi trường có nồng độ NaCl cao tới 3 mol/L. Chúng cũng có thể thích ứng sinh trưởng trên da người. Nấm men *Saccharomyces rouxii* có thể sinh trưởng trên dung dịch đường có hoạt độ nước thấp đến 0,6. Tảo lục *Dunaliella viridis* có thể chịu được nồng độ NaCl cao đến 1,7mol/L hoặc nồng độ bão hòa.

Mặc dầu một số ít vi sinh vật có thể thực sự chịu áp nhưng phần lớn vi sinh vật chỉ có thể sinh trưởng tốt ở hoạt độ nước khoảng 0,98 (tương đương với a_w của nước biển) hoặc cao hơn nữa. Lợi dụng điều này người ta sử dụng phương pháp sấy khô hay dùng muối, dùng đường để bảo quản thực phẩm, phòng tạp nhiễm bởi vi sinh vật. Tuy nhiên nhiều nấm chịu áp vẫn có thể làm hư hỏng các thực phẩm đã sấy khô hoặc ướp muối, tẩm đường.

Vi sinh vật ưa mặn (Halophile) hoàn toàn thích ứng với môi trường cao áp (hypertonic), cần nồng độ NaCl cao để sinh trưởng. Phạm vi nồng độ muối cần thiết để sinh trưởng đối với nhóm vi khuẩn ưa mặn cực đoan (extreme halophilic bacteria) là 2,8-6,2 mol/L (nồng độ muối bão hòa). Tại Biển Chết (Dead Sea)- một hồ thấp nhất thế giới nằm giữa Israel và Jordan, và tại hồ Đại Diêm (Great Salt Lake) ở bang Utah (Hoa Kỳ) và tại các môi trường khác có nồng độ muối gần với bão hòa, có thể phân lập được các Cổ khuẩn

(archeon) thuộc chi *Halobacterium*. Chúng cùng các vi khuẩn ưa mặn cực đoan khác không giống với phần lớn các vi sinh vật chịu áp (osmotolerant) ở chỗ không phải là đơn giản thông qua việc nâng cao nồng độ dung chất nội bào, mà chủ yếu là sửa đổi cấu trúc protein và màng của mình để thích ứng với nồng độ muối cao. Những vi khuẩn ưa mặn cực đoan này duy trì nồng độ kali nội bào sao cho áp suất thẩm thấu cao hơn môi trường sống; nồng độ K^+ nội bào có thể tới 4-7 mol/L. Các enzym, ribosom và protein vận chuyển của các vi khuẩn này cần nồng độ K^+ cao để duy trì tính ổn định và hoạt tính. Ngoài ra nồng độ Na^+ cao cũng giúp cho sự ổn định của tế bào và màng sinh chất của vi khuẩn *Halobacterium*. Nếu nồng độ Na^+ quá thấp thì thành tế bào và màng sinh chất sẽ hoàn toàn bị phá hủy. Vi khuẩn ưa mặn cực đoan thích ứng thành công với điều kiện môi trường muối cao, nơi có thể tiêu diệt hầu hết các sinh vật khác. Tuy nhiên chúng cũng đã biệt hóa (specialized), mất đi tính linh hoạt (flexibility) sinh thái và chỉ có thể sinh trưởng trong một ít môi trường cực đoan.

14.4.2. pH

pH là số đo hoạt tính ion hydrogen của một dung dịch và đó là số logarit âm của nồng độ ion hydrogen (biểu thị bằng nồng độ phân tử):

$$pH = -\log[H^+] = \log(1/[H^+])$$

Thang pH từ pH 0,0 ($1,0 \text{ mol H}^+$) đến pH 14,0 ($1,0 \times 10^{-14} \text{ mol H}^+$). Mỗi đơn vị pH đại biểu cho sự biến đổi 10 lần về nồng độ ion hydrogen. Hình 14.13 cho thấy nơi cư trú mà vi sinh vật có thể sinh trưởng là rất rộng, từ pH rất acid (pH 1-2) đến những hồ hay đất rất kiềm với pH giữa 2 và 10.

pH có ảnh hưởng rõ rệt đối với sự sinh trưởng của vi sinh vật. Mỗi vi sinh vật đều có một phạm vi pH sinh trưởng nhất định và pH sinh trưởng tốt nhất. Vi sinh vật ưa acid (acidophile) có pH sinh trưởng tốt nhất là pH 0-5,5 ; đối với vi sinh vật ưa trung tính là pH 5,5-8,0 ; đối với vi sinh vật ưa kiềm (alkalophile) là pH 8,5-11,5. Vi sinh vật ưa kiềm cực đoan có mức sinh trưởng tối ưu ở pH 10 hay cao hơn nữa. Nói chung, các nhóm vi sinh vật khác nhau đều có phạm vi sinh trưởng riêng của mình. Phần lớn vi khuẩn và động vật nguyên sinh là ưa trung tính. Phần lớn nấm là ưa hơi acid (pH 4-6). Cũng có nhiều trường hợp ngoại lệ. Ví dụ, tảo *Cyanidium caldarium* và cổ khuẩn *Sulfolobus acidocaldarius* thường sống trong các suối nước nóng acid, chúng sinh trưởng tốt ở nhiệt độ cao và pH từ 1 đến 3. Cổ khuẩn *Ferroplasma acidarmanus* và *Picrophilus oshimae* có thể sinh trưởng ở pH=0 hay rất gần với 0.

Bảng 14.5: Thang pH

pH	[H ⁺] nồng độ phân tử	Ví dụ về môi trường	Ví dụ về vi sinh vật
0	10 ⁰ (1,0)	Acid nitric đậm đặc	<i>Ferroplasma</i> <i>Picrophilus_torresmaris</i>
1	10 ⁻¹	Dịch dạ dày, nước nóng axit	<i>Dunaliella_acidophila</i>
2	10 ⁻²	Nước ép chanh Dịch axit ở mỏ	<i>Cyanidium_caldarium</i> <i>Thiobacillus_thiooxidans</i> <i>Sulfolobus_acidocaldarius</i>
3	10 ⁻³	Giấm, Dứa	
4	10 ⁻⁴	Nước ép cà chua, cam Đất rất axit	
5	10 ⁻⁵	Pho mát, bắp cải Bánh mỳ	<i>Physarum_polycephalum</i> <i>Acanthamoeba_castellanii</i>
6	10 ⁻⁶	Thịt bò, thịt gà Nước mưa Sữa	<i>Lactobacillus_acidophilus</i> <i>E.coli</i> , <i>Pseudomonas_aeruginosa</i> , <i>Euglena_gracilis</i> , <i>Paramecium_bursaria</i>
7	10 ⁻⁷	Nước bọt Nước tinh khiết Máu	<i>Staphylococcus_aureus</i>
8	10 ⁻⁸	Nước biển	<i>Nitrosomonas_spp.</i>
9	10 ⁻⁹	Đất rất kiềm Hồ nước kiềm	
10	10 ⁻¹⁰	Xả phòng	<i>Microcystis_aeruginosa</i> <i>Bacillus_alkalophilus</i>
11	10 ⁻¹¹	Nước ammonia gia dụng	
12	10 ⁻¹²	Dung dịch Ca hydroxide bão hòa	
13	10 ⁻¹³	Thuốc tẩy trắng	
14	10 ⁻¹⁴	Thuốc tẩy ống cống	

Mặc dầu vi sinh vật thường có thể sinh trưởng trong một phạm vi pH khá rộng, và xa với pH tốt nhất của chúng, nhưng tính chịu đựng (tolerance) của chúng cũng có giới hạn nhất định. Khi pH trong tế bào chất có sự biến hóa đột ngột sẽ làm phá vỡ màng sinh chất hoặc làm ức chế hoạt tính của enzyme hay proteine chuyển màng, do đó làm tổn thương đến vi sinh vật. Vi sinh vật nhân nguyên thủy bị chết khi pH nội bào giảm xuống thấp hơn 5,0-5,5. Sự biến đổi pH của môi trường sẽ làm thay đổi trạng thái điện ly của phân tử các chất dinh dưỡng, làm hạ thấp khả năng sử dụng chúng của vi sinh vật.

Khi pH trong môi trường có sự biến hóa tương đối lớn thì pH nội bào của phần lớn vi sinh vật vẫn gần trung tính. Nguyên nhân có thể là do tính thấm của H⁺ qua màng sinh chất là tương đối thấp. Vi sinh vật ưa trung tính thông qua hệ thống vận chuyển đã sử

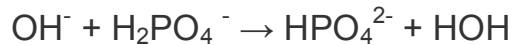
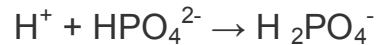
dùng K^+ thay cho H^+ . Vi sinh vật ưa kiềm cực đoan như *Bacillus alcalophilus* dùng Na^+ nội bào thay thế cho H^+ của môi trường bên ngoài, giữ cho pH nội bào gần với trung tính. Ngoài ra hệ thống chất đệm nội bào (internal buffering) cũng có vai trò quan trọng trong việc duy trì pH ổn định.

Vi sinh vật phải có năng lực thích ứng với sự biến đổi pH của môi trường thì mới có thể sinh tồn. Đối với vi khuẩn, hệ thống vận chuyển ngược K^+/H^+ và Na^+/H^+ có thể dùng để khắc phục những biến đổi nhỏ về pH. Nếu pH quá acid các cơ chế sẽ phát huy tác dụng. Lúc pH giảm xuống tới pH 5,5-6,0 vi khuẩn thương hàn (*Salmonella typhimurium*) và *Escherichia coli* có thể tổng hợp ra một loạt các protein mới và được gọi là một phần của đáp ứng chống chịu acid. ATPase chuyển vị proton được dùng để sản sinh ra nhiều ATP hoặc bơm proton

Ra ngoài tế bào. Nếu pH bên ngoài giảm xuống còn 4,5 hay thấp hơn nữa vi khuẩn sẽ tổng hợp ra các phân tử đi kèm, chẳng hạn như các protein gây sốc acid (acid shock proteins) hay các protein gây sốc nhiệt (heat shock proteins). Chúng được dùng để phòng ngừa sự biến tính acid của các protein khác và giúp sửa chữa lại các proteindins đã bị biến tính.

Vi sinh vật thường sinh ra các chất thải trao đổi chất có tính acid hay kiềm để làm thay đổi pH môi trường sống. Vi sinh vật lên men sử dụng nguồn carbohydrat để tạo ra các acid hữu cơ. Các vi sinh vật dinh dưỡng hóa năng vô cơ (chemolithotrophs) như *Thiobacillus* có thể ôxy hóa các hợp chất lưu huỳnh dạng khử để sinh ra acid sulfuric. Một số vi khuẩn khác thông qua việc phân giải các acid amin làm sinh ra NH_3 và làm kiềm hóa môi trường.

Người ta thường bổ sung các chất đệm (buffers) vào môi trường nuôi cấy để phòng ngừa sự ức chế quá trình sinh trưởng của vi sinh vật khi pH biến hóa quá lớn. Phosphat là chất đệm thường được sử dụng, điển hình là muối H_2PO_4^- acid yếu và muối HPO_4^{2-} kiềm yếu :



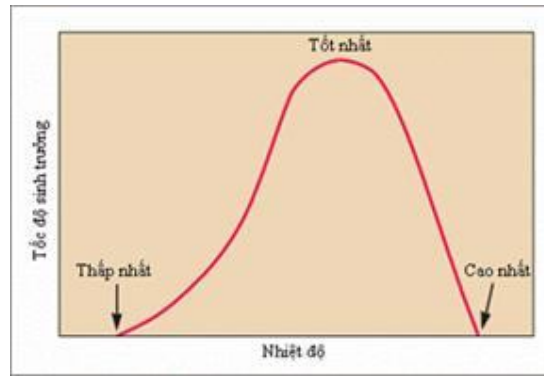
Nếu bổ sung H^+ vào hệ thống đệm nó sẽ kết hợp với HPO_4^{2-} để tạo ra acid yếu. Nếu bổ sung OH^- vào hệ thống đệm nó sẽ kết hợp với H_2PO_4^- để tạo thành nước. Như vậy là pH môi trường không bị biến hóa quá lớn. Trong các môi trường phức tạp thì peptid và các acid amin cũng có năng lực đệm (buffering effect) rất mạnh.

14.4.3. Nhiệt độ

Cũng giống như các sinh vật khác, nhiệt độ của môi trường cũng có ảnh hưởng rất lớn đối với vi sinh vật. Trên thực tế, do vi sinh vật thường là các sinh vật đơn bào cho nên chúng rất mẫn cảm với sự biến hóa của nhiệt độ, và thường bị biến hóa cùng với sự biến hóa về nhiệt độ của môi trường xung quanh. Chính vì vậy, nhiệt độ của tế bào vi sinh vật cũng phản ánh trực tiếp nhiệt độ của môi trường xung quanh. Một nhân tố quyết định ảnh hưởng của nhiệt độ đối với sự sinh trưởng của vi sinh vật đó là tính mẫn cảm với nhiệt độ của các phản ứng xúc tác nhờ enzym. Trong phạm vi nhiệt độ thấp, khi nhiệt độ tăng lên sẽ làm tăng tốc độ sinh trưởng của vi sinh vật, vì phản ứng xúc tác nhờ enzyme cũng giống như các phản ứng hóa học nói chung, khi nhiệt độ tăng lên 10°C tốc độ phản ứng sẽ tăng gấp đôi. Vì các phản ứng trong tế bào đều tăng cho nên toàn bộ hoạt động trao đổi chất sẽ tăng lên khi nhiệt độ cao hơn, và vi sinh vật sẽ sinh trưởng nhanh hơn. Lúc

nhệt độ tăng lên đến một mức độ nhất định thì nhiệt độ càng tăng tốc độ sinh trưởng càng giảm. Khi nhiệt độ tăng quá cao vi sinh vật sẽ chết. Khi nhiệt độ quá cao sẽ gây ra sự biến tính của enzym, của các thể vận chuyển (transport carriers) và các protein khác. Màng sinh chất sẽ bị tổn thương vì hai lớp lipid sẽ bị hòa tan. Do đó mặc dầu ở nhiệt độ càng cao các phản ứng xúc tác tiến hành càng nhanh nhưng do các nguyên nhân nói trên mà tế bào bị tổn thương đến mức khó hồi phục và dẫn đến việc ức chế sinh trưởng. Tại điều kiện nhiệt độ rất thấp màng sinh chất bị kết đông lại, enzyme cũng ngừng hoạt động. Nói chung, nếu vượt quá nhiệt độ tốt nhất đối với vi sinh vật, chức năng và kết cấu tế bào đều bị ảnh hưởng. Nếu nhiệt độ rất thấp, tuy chức năng chịu ảnh hưởng nhưng thành phần hóa học và kết cấu không nhất thiết chịu ảnh hưởng.

Do ảnh hưởng hai mặt, vừa có lợi vừa có hại của nhiệt độ đối với vi sinh vật mà có thể xác định các loại nhiệt độ cơ bản (cardinal temperature) đối với sự sinh trưởng của vi sinh vật. Đó là nhiệt độ thấp nhất (minimum), nhiệt độ tốt nhất (optimum) và nhiệt độ cao nhất (maximum) đối với sự sinh trưởng.



Hình 14.13: Ảnh hưởng của nhiệt độ đối với tốc độ sinh trưởng của vi sinh vật
(Theo sách của Prescott, Harley và Klein)

Mặc dầu đường biểu diễn ảnh hưởng của nhiệt độ đối với sinh trưởng của vi sinh vật là phụ thuộc vào từng vi sinh vật, từng điều kiện khác nhau nhưng nhiệt độ tốt nhất thường gần với nhiệt độ cao nhất hơn là so với nhiệt độ thấp nhất. Ba nhiệt độ cơ bản của cùng một loài vi sinh vật không phải là cố định mà thường phụ thuộc vào pH, thức ăn và các nhân tố khác. Chẳng hạn, một loại động vật nguyên sinh có tiên mai là *Crithidia fasciculate* sống trong đường tiêu hóa của muối có thể sinh trưởng trên môi trường đơn giản ở nhiệt độ 22-27⁰C nhưng ở nhiệt độ 33-34⁰C thì lại không sinh trưởng được nếu không bổ sung vào môi trường ion kim loại, acid amin, vitamin và lipid.

Nhiệt độ cơ bản của các vi sinh vật khác nhau là khác nhau rất nhiều. Nhiệt độ tốt nhất có thể thấp từ 0⁰C đến cao tới 75⁰C. Nhiệt độ thấp nhất để sinh trưởng có thể đến -20⁰C. Nhiệt độ cao nhất có thể vượt quá 100⁰C. Nhân tố chủ yếu quyết định phạm vi sinh trưởng này có thể là nước. Ngay trong điều kiện tối cực đoan thì vi sinh vật cũng cần có nước ở trạng thái dịch thể mới có thể sinh trưởng. Đối với số đông vi sinh vật thì phạm vi nhiệt độ sinh trưởng thường trong khoảng 30⁰C. Một số vi sinh vật (như Cầu khuẩn lậu - *Nisseria gonorrhoeae*) có phạm vi nhiệt độ sinh trưởng rất hẹp. Trong khi đó cũng có những vi sinh vật (như *Enterococcus faecalis*) lại có phạm vi nhiệt độ sinh trưởng rất rộng. Nhiệt độ sinh trưởng cao nhất là khác nhau giữa các nhóm lớn vi sinh vật. Nhiệt độ sinh trưởng cao nhất đối với động vật nguyên sinh (protozoa) là 50⁰C. Một số tảo và nấm có thể sinh trưởng ở nhiệt độ cao tới 55-60⁰C. Một số vi sinh vật nhân nguyên thủy có thể sinh trưởng ở 100⁰C (nhiệt độ nước sôi) hay gần như vậy. Gần đây người ta còn phát hiện thấy có những vi sinh vật sinh trưởng được ở cả những điều kiện nhiệt độ cao hơn 100⁰C. Đã có

các thông báo cho biết đã phát hiện thấy các vi sinh vật nhân nguyên thủy tại dịch phun giàu sulphid (black smoker) ở vết nứt dưới đáy biển - nơi nhiệt độ nước cao tới 350⁰C. Những vi sinh vật này sinh trưởng, phát triển rất tốt ở nhiệt độ 113⁰C và còn có thể sinh trưởng, phát triển ở nhiệt độ cao hơn nữa. Áp suất cao ở miệng núi lửa dưới đáy biển làm cho nước ở nhiệt độ siêu cao vẫn tồn tại ở trạng thái dịch thể (ở áp suất 265 atm nước biển sẽ sôi ở 460⁰C). Phát hiện này cho thấy protein, màng, acid nucleic của các vi sinh vật này có tính kháng nhiệt rất cao. Đây là những vật liệu rất tốt giúp cho việc nghiên cứu cơ chế ổn định của màng và các cao phân tử sinh học. Tương lai có thể nghĩ đến khả năng thiết kế các enzyme có thể phát huy tác dụng trong những điều kiện rất cao. Những enzyme bền nhiệt từ các vi sinh vật này sẽ có những ứng dụng rất quan trọng trong công nghiệp và trong nghiên cứu khoa học. Chẳng hạn men Taq polymerase nhận được từ cổ khuẩn *Thermus aquaticus* đã được ứng dụng rộng rãi trong phản ứng chuỗi polymerase. Rõ ràng là vi sinh vật nhân nguyên thủy có thể sinh trưởng được ở những nhiệt độ cao hơn vi sinh vật nhân thật. Đó là vì vi sinh vật nhân thật không có thể tạo ra được các màng cơ quan tử có chức năng tương ứng ở điều kiện nhiệt độ cao hơn 60⁰C. Ngoài ra các cơ quan quang hợp cũng hầu như không ổn định như vậy và do đó không phát hiện thấy có sự sinh trưởng của các vi sinh vật quang hợp trong môi trường nhiệt độ rất cao. Căn cứ vào phạm vi nhiệt độ sinh trưởng có thể chia vi sinh vật thành 5 nhóm.

Bảng 14.6: Phạm vi nhiệt độ (NĐ) đối với sự sinh trưởng của vi sinh vật

Vi sinh vật	NĐ thấp nhất	NĐ tốt nhất	NĐ cao nhất
VSV không quang hợp			
Bacillus psychrophilus	-10	23-34	28-30
Micrococcus cryophilus	-4	10	24
Pseudomonas fluorescens	4	25-30	40
Staphylococcus aureus	6,5	30-37	46
Enterococcus faecalis	0	37	44

Escherichia coli	10	37	45
Neisseria gonorrhoeae	30	35-36	38
Thermoplasma acidophilum	45	59	62
Bacillus stearothermophilus	30	60-65	75
Thermus aquaticus	40	70-72	79
Sulfolobus acidocaldarius	60	80	85
Pyrococcus abyssi	67	96	102
Pyrodictium occultum	82	105	110
Pyrolobus fumarii	90	106	113
Vi khuẩn quang hợp và vi khuẩn lam			
Rhodospirillum rubrum	-	30-35	-
Anabaena variabilis	-	35	-

<i>Osillatoria tenuis</i>	-	-	45-47
<i>Synechococcus eximius</i>	70	79	84
Tảo nhân thật			
<i>Chlamydomonas nivalis</i>	-36	0	4
<i>Fragilaria sublinearis</i>	-2	5-6	8-9
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	-	25-26	29
<i>Euglena gracilis</i>	-	23	-
<i>Skeletonema costatum</i>	6	16-26	>28
<i>Cyanidium caldarium</i>	30-34	45-50	56
Nấm			
<i>Candida scottii</i>	0	4-15	15
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1-3	28	40
<i>Mucor pusillus</i>	21-23	45-50	50-58

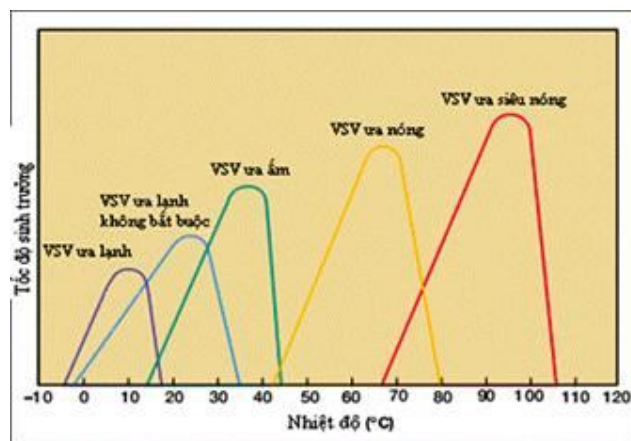
Động vật nguyên sinh			
Amoeba proteus	4-6	22	35
Naegleria fowleri	20-25	35	40
Trichomonas vaginalis	25	32-39	42
Paramecium caudatum		25	28-30
Tetrahymena pyriformis	6-7	20-25	33
Cyclidium citrullus	18	43	47

Vi sinh vật ưa lạnh (Psychrophile): Đó là các vi sinh vật có thể sinh trưởng ở 0⁰C, sinh trưởng tốt nhất ở 15⁰ C hay thấp hơn, nhiệt độ cao nhất chỉ là khoảng 20⁰C. Tại Nam cực và Bắc cực dễ dàng phân lập các vi sinh vật thuộc nhóm này. Vì có tới 90% nước biển thấp hơn hay bằng 5⁰C nên tại đó có lượng lớn các vi sinh vật ưa lạnh. Chlamydomonas nivalis là một loài tảo ưa lạnh, chúng sinh bào tử màu đỏ tươi làm cho khối băng tuyết có màu phấn hồng (pink). Phần lớn vi khuẩn ưa lạnh thuộc về các chi *Pseudomonas*, *Vibrio*, *Alcaligenes*, *Bacillus*, *Arthrobacter*, *Moritella*, *Photobacterium*, và *Shewanella*. Cổ khuẩn *Methanogenum* ưa lạnh gần đây đã được phân lập tại hồ Ace ở Châu Nam cực. Vi sinh vật ưa lạnh thông qua nhiều loại phương thức để thích ứng được với môi

trường lạnh. Chúng phát huy cơ chế rất tốt để tổng hợp protein, enzym, các hệ thống vận chuyển. Màng tế bào của vi sinh vật ưa lạnh có chứa nhiều các acid béo không bão hòa, có thể giữ được trạng thái chất bán lưu (semifluid) khi gặp lạnh. Tuy nhiên nhiều vi sinh vật ưa lạnh ở nhiệt độ cao hơn 20°C màng tế bào sẽ bị phá hại.

Nhiều vi sinh vật sinh trưởng tốt nhất ở nhiệt độ 20-30°C, nhiệt độ cao nhất là cao hơn 35°C, nhưng chúng vẫn có thể sinh trưởng trong điều kiện 0-7°C. Chúng thuộc về nhóm **ưa lạnh không bắt buộc** (Psychrotrophs hay facultative psychrophiles). Những vi khuẩn và nấm thuộc nhóm này là nguyên nhân chính làm hư hỏng thực phẩm giữ lạnh.

Vi sinh vật ưa ấm (Mesophile): Đó là các vi sinh vật sinh trưởng tốt nhất ở 20-45°C, nhiệt độ sinh trưởng thấp nhất là 15-20°C. Nhiệt độ sinh trưởng cao nhất là khoảng 45°C hoặc thấp hơn. Phần lớn vi sinh vật là thuộc về nhóm này. Hầu như mọi vi khuẩn gây bệnh cho người đều là vi sinh vật ưa ấm, bởi vì thân nhiệt của người là 37°C.



*Hình 14.14 :Phạm vi nhiệt độ sinh trưởng của vi sinh vật
(Theo sách của Prescott, Harley và Klein).*

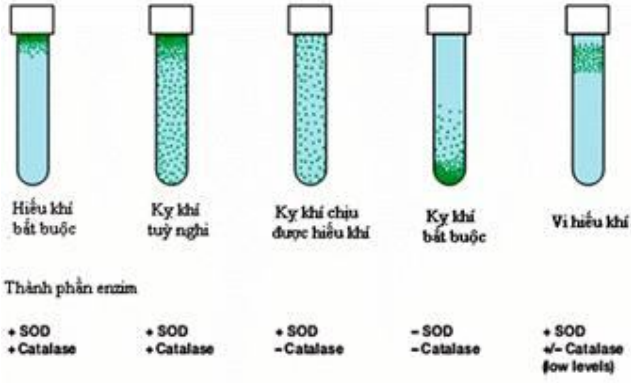
Vi sinh vật ưa nhiệt (Thermophile): Đó là các vi sinh vật sinh trưởng được ở nhiệt độ 55°C hay cao hơn nữa. Nhiệt độ sinh trưởng tốt nhất đối với chúng là $33-65^{\circ}\text{C}$. Thành phần chủ yếu của nhóm này là vi khuẩn (chủ yếu là xạ khuẩn), một ít tảo và nấm (bảng 14.6). Chúng phát triển trong đồng phân chuồng ủ, dưới đáy các cột rơm rạ hay cỏ khô, trong đường dẫn nước nóng, trong các suối nước nóng...Vi sinh vật ưa nóng khác với vi sinh vật ưa ấm ở chỗ chúng có hệ thống tổng hợp enzyme và protein bền nhiệt (heat-stable) và có thể hoạt động ở nhiệt độ cao. Màng sinh học

của chúng có lipid bão hòa ở mức cao, có điểm sôi cao hơn và vì vậy vẫn giữ được nguyên vẹn ở nhiệt độ cao.

Có một số ít các vi sinh vật ưa nhiệt có thể sinh trưởng ở nhiệt độ 90°C hay cao hơn. Nhiệt độ sinh trưởng cao nhất là 100 °C. Người ta xếp các vi sinh vật có nhiệt độ sinh trưởng tốt nhất ở 80-113°C vào nhóm **Vi sinh vật ưa siêu nóng** (Hyperthermophiles). Chúng thường không thể sinh trưởng bình thường ở nhiệt độ thấp hơn 55°C. Vi khuẩn *Pyrococcus abyssi* và *Pyrodictium occultum* là ví dụ về những vi sinh vật ưa siêu nhiệt được tìm thấy ở những đáy biển nóng.

14.4.4. Nồng độ oxygen

Các vi sinh vật sinh trưởng trong điều kiện có oxygen được gọi là **vi sinh vật hiếu khí** (aerobe), còn các vi sinh vật sinh trưởng trong điều kiện không có oxygen được gọi là các **vi sinh vật kỵ khí** (anaerobe). Hầu hết các cơ thể đa bào đều phải cần sinh trưởng trong điều kiện có oxygen, chúng là các sinh vật **hiếu khí bắt buộc** (obligate aerobes). Oxygen là chất nhận điện tử cuối cùng trong chuỗi vận chuyển điện tử khi hô hấp hiếu khí. Ngoài ra, các vi sinh vật nhân thật (eucaryotes) hiếu khí còn dùng oxygen để tổng hợp sterol và các acid béo không bão hòa. Các vi sinh vật **kỵ khí không bắt buộc** (facultative anaerobes) không cần oxygen để sinh trưởng nhưng khi có oxygen thì sinh trưởng tốt hơn. Khi có oxygen chúng sử dụng phương thức hô hấp hiếu khí. Các vi sinh vật **kỵ khí chịu oxygen** (aerotolerant anaerobes) như vi khuẩn *Enterococcus faecalis* có thể sinh trưởng như nhau trong điều kiện có oxygen cũng như không có oxygen. Ngược lại, vi khuẩn *Bacteroides*, *Fusobacterium*, *Clostridium pasteurianum*, *Methanococcus*.... sẽ bị chết khi có oxygen.



Hình 14.15: Oxygen và sự sinh trưởng của vi khuẩn

Chú thích: Các nhóm vi sinh vật xem trong bài

Mỗi chấm biểu hiện khuẩn lạc của vi khuẩn trong hay trên bề mặt môi trường. SOD và catalase là biểu thị vi khuẩn có tồn tại enzyme superoxide dismutase và catalase hay không?(Theo sách của Prescott,Harley và Klein)

Vi sinh vật kỵ khí chịu oxygen và vi sinh vật kỵ khí bắt buộc không sinh năng lượng thông qua quá trình hô hấp, chúng thu được năng lượng thông qua quá trình lên men hay hô hấp kỵ khí (anaerobic respiration). Sau cùng, phải kể đến nhóm vi sinh vật **vi hiếu khí** (microaerophiles), chúng không sinh trưởng được trong điều kiện không khí bình thường (20% O₂) và cần sinh trưởng trong điều kiện nồng độ O₂ khoảng 2-10% Quan hệ giữa vi sinh vật và oxygen có thể xác định bằng một thí nghiệm đơn giản như sau: nuôi cấy vi sinh vật trong ống nghiệm chứa môi trường đặc hoặc môi trường đặc biệt như môi trường chứa thioglycollate (là chất khử làm giảm nồng độ oxygen trong môi trường).

Cùng một nhóm vi sinh vật có thể có nhiều loại quan hệ khác nhau với O₂. Cả 5 loại hình đều có thể thấy ở vi sinh vật nhân nguyên thủy (prokaryotes) và động vật nguyên sinh. Nấm thường là hiếu khí, chỉ trừ một số loài đặc biệt, nhất là nấm men, thuộc loại kỵ khí không bắt buộc. Tảo hầu như đều thuộc loại hiếu khí bắt buộc.

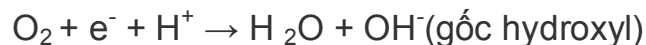
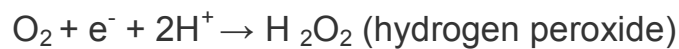
Đáng chú ý là năng lực có thể sinh trưởng cả trong môi trường hiếu khí lẫn môi trường kỵ khí làm cho vi sinh vật có tính linh hoạt cao và đó chính là một loại ưu thế sinh thái học.

Mặc dầu O₂ có thể làm chết các vi sinh vật kỵ khí bắt buộc, nhưng trong môi trường hiếu khí vẫn có thể phân lập được chúng. Đó là

do chúng thường sống chung với loại kỵ khí không bắt buộc và bộ này tiêu thụ hết O₂, tạo nên môi trường kỵ khí cục bộ giúp cho vi sinh vật kỵ khí bắt buộc có thể sinh trưởng được. Ví dụ trong khoang miệng vi khuẩn kỵ khí bắt buộc *Bacteroides gingivalis* có thể sinh trưởng được trong các khe kỵ khí quanh răng.

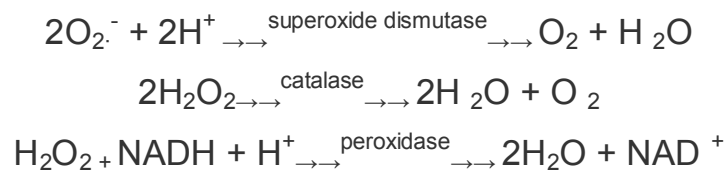
Sự khác biệt trong quan hệ của vi sinh vật với O₂ do nhiều nguyên nhân khác nhau, bao gồm việc bất hoạt của protein và tác dụng độc hại của O₂ trong điều kiện hiếu khí. Các enzyme có thể bị bất hoạt khi các nhóm mẫn cảm như sulfhydryls bị oxy hóa. Chẳng hạn như enzyme cố định đạm nitrogenase là loại rất mẫn cảm với O₂.

Vì hai điện tử bên ngoài của oxygen không thành cặp do đó rất dễ tiếp nhận điện tử và bị khử. Flavoprotein, một số thành phần tế bào khác và sự bức xạ đều có thể thúc đẩy việc khử oxy, tạo thành các sản phẩm khử như gốc tự do superoxide, hydrogen peroxide, gốc hydroxyl.



Các sản phẩm khử oxy này là cực kỳ có hại vì chúng là các chất oxy hóa mạnh và phá hủy nhanh chóng các thành phần tế bào. Vi sinh vật nào phải có năng lực tự chống lại được các sản phẩm khử này mới tránh khỏi bị tiêu diệt. Bạch cầu trung tính (neutrophils) và đại thực bào (macrophage) đã lợi dụng các sản phẩm độc hại này để tiêu diệt các vi sinh vật gây bệnh xâm nhập cơ thể.

Nhiều vi sinh vật sinh ra các enzyme để chống lại các sản phẩm khử độc hại này. Vi khuẩn hiếu khí bắt buộc và vi khuẩn kỵ khí không bắt buộc thường chứa các enzyme như superoxide dismutase (SOD) và catalase, chúng phân biệt xúc tác việc phá hủy gốc superoxide và hydrogen peroxide. Peroxidase cũng có thể dùng để phá hủy hydrogen peroxide:



Vi sinh vật kỵ khí chịu oxygen có thể thiếu catalase nhưng hầu hết luôn có superoxide dismutase. Vi khuẩn kỵ khí chịu oxygen *Lactobacillus plantarum* dùng ion Mn^{2+} thay thế SOD để phân giải gốc tự do của superoxide. Tất cả các vi sinh vật kỵ khí bắt buộc đều không có hai loại enzyme nói trên hoặc có với nồng độ rất thấp và do đó không có năng lực chống chịu được với oxygen.

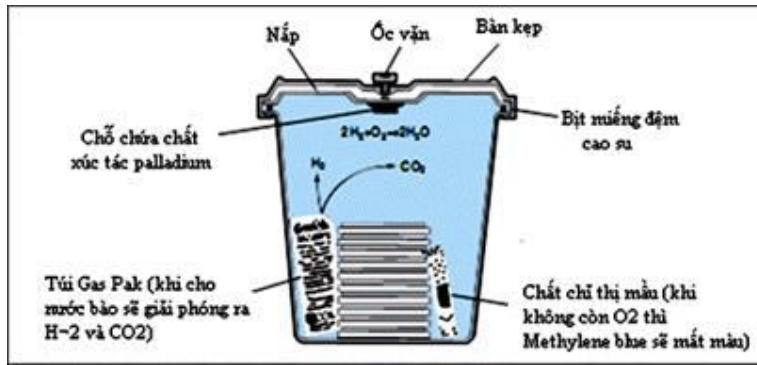
Vì vi sinh vật hiếu khí cần O_2 , trong khi vi sinh vật kỵ khí lại bị chết vì O_2 , cho nên việc nuôi cấy hai nhóm này phải bằng các phương pháp hoàn toàn khác nhau. Lúc nuôi cấy khối lượng lớn vi sinh vật hiếu khí phải nuôi cấy trên máy lắc hay phải thổi không khí vô khuẩn vào bình (hay nôi) nuôi cấy. Còn khi nuôi cấy vi khuẩn kỵ khí thì phải loại bỏ hết O_2 . Có thể dùng các phương pháp sau đây:

- Sử dụng môi trường kỵ khí đặc biệt, có chứa các chất khử như thioglycolate hay cysteine. Khi chế tạo môi trường cần đun lên để làm tan các thành phần và cũng đồng thời loại trừ hết O_2 hòa tan trong môi trường. Khi đó vi sinh vật kỵ khí có thể mọc được lên trên bề mặt môi trường.

- Nuôi cấy trong các tủ nuôi cấy kỵ khí (anaerobic work chamber) đã hút chân không và bổ sung bằng khí nitrogen. Thường còn cần bổ sung cả khí CO₂ bởi vì nhiều vi khuẩn kỵ khí sinh trưởng tốt khi có tồn tại một lượng nhỏ khí CO₂.
- Một phương pháp rất phổ biến khi nuôi cấy một lượng nhỏ vi sinh vật kỵ khí là dùng bình kỵ khí (Gas Pak jar). Trong hệ thống này lợi dụng H₂ và chất xúc tác palladium để làm cho O₂ kết hợp với H₂ tạo thành nước để không còn O₂ trong môi trường. Các chất khử đưa vào môi trường thạch cũng có thể giúp loại bỏ O₂.
- Có thể dùng túi nhựa để tạo ra các môi trường kỵ khí khi nuôi cấy một lượng nhỏ các vi sinh vật kỵ khí. Trong túi nhựa chứa CaCO₃ và chất xúc tác để tạo ra điều kiện kỵ khí giàu CO₂. Một dung dịch đặc biệt được đưa vào túi nhựa sau đó đưa hộp lồng (hộp Petri) hay các dụng cụ nuôi cấy khác vào và hàn kín túi nhựa lại.

Tùy từng trường hợp cụ thể mà sử dụng các phương pháp nuôi cấy kỵ khí khác nhau.





Hình 14.17: Nuôi cấy vi sinh vật kỵ khí trong các bình kỵ khí.
(Theo sách của Prescott, Harley và Klein).

14.4.5 Áp suất (Pressure)

Phần lớn vi sinh vật có thể sống trên lục địa hay trên bề mặt nước, là những nơi có áp suất không khí là 1 atm (atmosphere) và không chịu ảnh hưởng rõ rệt gì của áp suất này. Nhưng đáy biển (nơi có độ sâu 1000m trở lên) lại chiếm đến 75% thể tích đại dương. Ở

những nơi đóp áp suất cao đến 600-1000m, nhiệt độ lạnh tới 2-3 °C. Trong môi trường cực đoan (extreme) như vậy vẫn có một số vi sinh vật thích ứng để tồn tại. Phần lớn thuộc về nhóm **chịu áp** (barotolerant). Tuy áp suất tăng lên cao sẽ có ảnh hưởng đến chúng, nhưng ảnh hưởng bất lợi này nhỏ hơn nhiều khi so với các vi sinh vật **không chịu áp** (nontolerant). Một số vi khuẩn sống trong đường tiêu hóa của những động vật không xương sống ở dưới biển sâu (như amphipods và holothurians) là những vi khuẩn **ưa áp** (barophilic). Chúng sinh trưởng càng nhanh trong điều kiện áp suất cao. Chúng có vai trò quan trọng trong vòng tuần hoàn các chất dinh dưỡng dưới đáy biển. Tại khe biển Mariana gần Philippine (sâu khoảng 10 500m) người ta đã phân lập được những vi khuẩn ưa áp có thể sinh trưởng trong điều kiện 2⁰C với áp suất khoảng 400-500atm. Những vi khuẩn này hiện đã biết là thuộc về các chi *Photobacterium*, *Shewanella*, *Colwellia*... Một số thuộc về Cổ khuẩn **vừa ưa áp vừa ưa nhiệt**(thermobarophiles), chẳng hạn như *Pyrococcus spp.*, *Methanococcus jannasschi*...

14.4.6. Bức xạ (Radiation)

Thế giới mà chúng ta đang sống đầy các loại bức xạ điện từ trường (electromagnetic radiation). Các bức xạ này hình thành như sóng trên mặt nước và lan truyền trong không khí. Cự ly giữa hai đỉnh sóng hay cuối sóng được gọi là độ dài sóng (wavelength). Khi độ dài sóng giảm đi thì năng lượng bức xạ tăng lên. Tia gamma hay tia X có năng lượng cao hơn bức xạ của ánh sáng

nhìn thấy (ánh sáng khả kiến) hay tia hồng ngoại. Bức xạ điện từ trường còn giống như một dòng năng lượng hợp bởi các photon (quang tử). Mỗi photon đều có năng lượng nhất định, năng lượng cao hay thấp quyết định bởi độ dài sóng của bức xạ.

Ánh sáng mặt trời là nguồn bức xạ chủ yếu trên trái đất, bao gồm ánh sáng khả kiến (visible light), tia tử ngoại (ultraviolet), tia hồng ngoại (infrared rays) và sóng radio (vô tuyến điện). Ánh sáng khả kiến là loại thường thấy và quan trọng nhất trong môi trường chung quanh chúng ta: mọi sự sống đều phụ thuộc vào các cơ thể có khả năng quang hợp dựa vào năng lượng của mặt trời. Bức xạ mặt trời có 60% nằm ở vùng tia hồng ngoại chứ không phải ở vùng ánh sáng khả kiến. Tia hồng ngoại là nguồn nhiệt lượng chủ yếu của trái đất. Ở tầm mặt biển chỉ thấy có rất ít bức xạ tử ngoại 290-300nm (nanometre). Tia tử ngoại có bước sóng thấp hơn 287nm hấp thụ bởi oxygen trong không khí và tạo ra tầng ozone (O_3) ở độ cao cách mặt đất khoảng 25-50km. Tầng ozone hấp thụ các tia tử ngoại bước sóng tương đối dài và giải phóng ra O_2 . Bởi vì tia tử ngoại rất có hại cho sinh vật nên việc tầng ozone tiêu trừ bớt tia tử ngoại là có tác dụng rất quan trọng đối với sự sống trên trái đất. Vì các loại bước sóng trong ánh sáng mặt trời phân bố đồng đều trong phạm vi ánh sáng khả kiến cho nên ta thấy ánh sáng mặt trời cơ bản có màu “trắng”.

Nhiều bức xạ điện từ trường là rất có hại đối với vi sinh vật, nhất là các bức xạ có bước sóng ngắn, cao năng lượng là các bức xạ ion hóa (ionizing radiation), chúng làm nguyên tử mất đi điện tử (electron) hoặc ion hóa (ionize). Có hai loại bức xạ ion hóa. Một là, tia X tạo ra bởi con người, hai là, tia gamma (tia γ) sinh ra trong quá trình tan rã các đồng vị phóng xạ (radioisotope). Bức xạ ion

hóa mức thấp sẽ làm sản sinh các đột biến (mutations) và gián tiếp làm chết vi sinh vật. Bức xạ ion hóa cao sẽ trực tiếp giết chết vi sinh vật. Mặc dầu vi sinh vật có tính đề kháng cao hơn về các bức xạ ion hóa so với các sinh vật khác, nhưng với liều lượng đủ cao chúng sẽ giết hết vi sinh vật. Chính vì vậy có thể dùng bức xạ ion hóa để diệt khuẩn. Tuy vậy, một số sinh vật nhân nguyên thủy (như vi khuẩn *Deinococcus radiodurans* và các vi khuẩn sinh vật sinh bào tử) có thể vẫn tồn tại được ngay cả ở các mức bức xạ ion hóa khá cao.

Bức xạ ion hóa gây cho tế bào rất nhiều biến hóa, có thể phá vỡ liên kết hydrogen, oxy hóa liên kết đôi, phá hủy cấu trúc vòng, cao phân tử hóa một số phân tử. Oxygen có thể làm tăng các hiệu ứng này, có thể là do việc sản sinh gốc tự do hydroxyl (OH-)... Mặc dầu có rất nhiều thành phần tế bào chịu ảnh hưởng, nhưng nguyên nhân quan trọng nhất gây chết là sự phá hủy ADN.

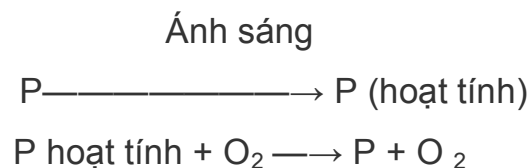
Vì bước sóng ngắn (10-400nm) có năng lượng cao cho nên bức xạ tử ngoại (Ultraviolet radiation) có thể tiêu diệt các loại vi sinh vật. Bức xạ tử ngoại (UV) mạnh nhất ở bước sóng 260nm. Chúng dễ bị ADN hấp thụ, làm cho trên 1 sợi đơn ADN hình thành những song phân tử (dimers) thymine, chúng làm ức chế quá trình tái tạo (replication) và công năng của ADN. Thiệt hại này có thể được sửa chữa qua một số con đường. Theo con đường quang hoạt hóa một loại enzyme quang hoạt hóa sử dụng ánh sáng xanh lam để tách song phân tử thymine. Trong hoạt hóa tối một đoạn ngắn ADN có chứa các song phân tử thymine có thể bị cắt rời và đổi chỗ để thành một đoạn ADN bình thường. Thiệt hại này cũng có thể sửa chữa nhờ các protein recA trong quá trình tái tổ hợp (recombination) hoặc quá trình SOS. Thiệt hại không có thể được

khắc phục nếu như liều lượng UV quá lớn, tạo nên những tổn thất quá nặng.

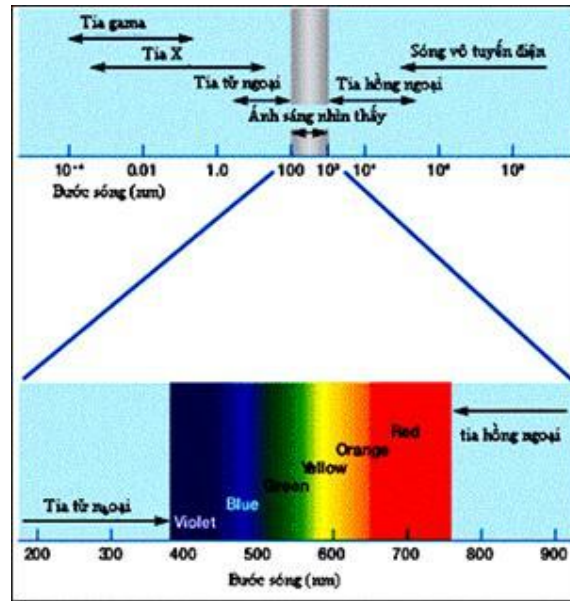
Mặc dầu bức xạ UV quá nhỏ (thấp hơn 290 và 300nm) khó có thể lọt xuống bề mặt trái đất, bức xạ UV nhưng bước sóng 325-400nm cũng có thể gây hại cho vi sinh vật. Chúng phân cắt tryptophan thành những quang sản phẩm (photoproducts) độc hại. Những sản phẩm này tác dụng đồng thời với các bức xạ gần tử ngoại làm phá vỡ sợi ADN. Cơ chế cụ thể của tác dụng này không giống với cơ chế tác dụng của UV với bước sóng 260nm.

Ánh sáng khả kiến là nguồn năng lượng chủ yếu của quá trình quang hợp.

(photosynthesis) vì vậy rất cần cho các sinh vật. Nhưng nếu ánh sáng khả kiến quá mạnh sẽ có thể gây hại hay làm chết vi sinh vật. Tham gia vào quá trình này có một loại sắc tố gọi là chất quang mẫn (photosensitizers) và oxygen. Các sắc tố ở vi sinh vật như chlorophyll, bacteriochlorophyll, cytochromes, và flavin có thể hấp thụ ánh sáng mặt trời và bị kích hoạt tạo ra các chất quang mẫn. Các chất quang mẫn (P) khi bị kích hoạt có thể chuyển năng lượng cho O₂ để làm ra oxygene đơn - singlet oxygen (¹O₂).



Oxygene đơn là chất có hoạt tính rất mạnh, là chất oxy hóa mạnh có thể phá hủy nhanh chóng tế bào, chúng cũng là nhân tố chủ yếu được các đại thực bào (phagocytes) dùng để diệt khuẩn.



Hình 14.18: Phạm vi bước sóng của các bức xạ điện từ trường - Phần ánh sáng khả kiến được trình bày phía dưới. (Theo sách của Prescott, Harley và Klein).

Nhiều vi sinh vật trong không khí hoặc sống trên bề mặt các vật tiếp xúc với không khí sử dụng sắc tố carotenoid để bảo vệ chống lại với quang oxy hóa (photooxidation). Carotenoid có thể làm phá hủy các oxygen đơn, hấp thu năng lượng của oxygen đơn và biến thành trạng thái phi hoạt tính. Cả các vi sinh vật quang hợp lẫn vi sinh vật không quang hợp đều sử dụng sắc tố vào mục đích này.

14.5. SỰ SINH TRƯỞNG CỦA VI SINH VẬT TRONG MÔI TRƯỜNG TỰ NHIÊN

14.5.1. Các nhân tố của môi trường làm hạn chế sự sinh trưởng

Môi trường sinh sống của vi sinh vật là phức tạp và thường xuyên biến đổi. Vi sinh vật đặc trưng cho mỗi môi trường cụ thể bị bao bọc bởi sự biến đổi của các chất dinh dưỡng và các nhân tố môi trường khác. Đúng là vi sinh vật đã sinh trưởng trong một màng sinh học (biofilm). Vi sinh vật sinh trưởng trong một “vi môi trường” (microenvironments) cho đến khi môi trường hay các nhân tố dinh dưỡng đạt tới sự sinh trưởng giới hạn. Nguyên tắc lượng tối thiểu của Liebig xác định rằng: tổng sinh khối của một cơ thể quyết định bởi sự có mặt của chất dinh dưỡng với nồng độ thấp nhất theo nhu cầu của cơ thể. Nguyên tắc này có thể phù hợp cho điều kiện phòng thí nghiệm cũng như trong môi trường đất và nước. Sự tăng lên của một nhân tố dinh dưỡng cần thiết (chẳng hạn như phosphate) sẽ làm tăng lên quần thể vi sinh vật cho đến khi một số

nhân tố dinh dưỡng khác trở thành nhân tố giới hạn. Nếu một chất dinh dưỡng nào đó là giới hạn thì tăng các nhân tố dinh dưỡng khác không có ích lợi gì. Tình hình thực tế còn phức tạp hơn thế nữa. Nhiều nhân tố giới hạn có thể ảnh hưởng thường xuyên lên quần thể vi sinh vật, chẳng hạn như nhiệt độ, pH, ánh sáng, nồng độ muối... Định luật chống chịu của Shelford (Shelford's law of tolerance) xác định: vi sinh vật có một yêu cầu nhất định đối với các nhân tố môi trường, Thấp hay cao hơn yêu cầu này thì vi sinh vật không thể tồn tại và sinh trưởng mặc dầu vẫn có đầy đủ các chất dinh dưỡng. Chẳng hạn mỗi vi sinh vật có một phạm vi nhiệt độ sinh trưởng nhất định. Cũng tương tự như vậy đối với pH, nồng độ oxygen, nồng độ muối... Sự sinh trưởng của vi sinh vật phụ thuộc vào cả sự cung cấp chất dinh dưỡng lẫn khả năng chống chịu với các điều kiện của môi trường.

Khi vi sinh vật có đủ điều kiện dinh dưỡng để sinh trưởng mạnh mẽ thì cũng đồng thời sinh ra các chất thải có hại và làm hạn chế sự sinh trưởng của chúng.

Đáp ứng với mức dinh dưỡng thấp (môi trường nghèo - oligotrophic environments) và có sự cạnh tranh, nhiều vi sinh vật đã chiếm đoạt thức ăn và khai thác chúng để làm nguồn cạnh tranh. Vi sinh vật thường biến đổi hình thái để làm tăng bề mặt và năng lực hấp thu chất dinh dưỡng. Các vi sinh vật nhân nguyên thủy hình que biến thành dạng "mini" hay "ultramini" (siêu nhỏ) hoặc mọc ra các cái cuống (prosthecae) để đáp ứng với tình trạng thiếu thức ăn. Sự thiếu hụt chất dinh dưỡng sẽ dẫn đến nhiều biến đổi ở vi sinh vật, chẳng hạn chúng có thể từng bước khép lại hoạt động của các gen liên quan đến trao đổi chất, trừ việc duy trì "gen quản gia" (housekeeping gene).

Nhiều nhân tố có thể làm cải biến mức dinh dưỡng trong môi trường nghèo. Chẳng hạn vi sinh vật có thể tách các chất dinh dưỡng hạn chế ra (như là sắt) khiến không còn sắt để cạnh tranh nữa. Không khí cũng có thể cung cấp chất dinh dưỡng giúp cho sự sinh trưởng của vi sinh vật. Điều này có thể thấy được trong phòng thí nghiệm cũng như ngoài thiên nhiên. Đã phát hiện thấy chất hữu cơ trong không khí có thể xúc tiến sự sinh trưởng của vi sinh vật trên môi trường pha loãng (dilute media). Môi trường sinh trưởng được làm giàu bằng chất hữu cơ trong không khí cũng có thể làm tăng rõ rệt sự phát triển của quần thể vi sinh vật. Ngay trong nước cất- thường chứa dấu vết chất hữu cơ, cũng có thể hấp thu những hợp chất 1 carbon từ không khí để giúp cho sự sinh trưởng của vi sinh vật. Sự tồn tại các chất dinh dưỡng trong không khí và tình trạng sinh trưởng của vi sinh vật, nếu không xem xét đến sẽ có thể ảnh hưởng đến các thực nghiệm về sinh hóa học hay sinh học phân tử, cũng như các nghiên cứu về sự sinh trưởng của vi sinh vật trong các môi trường dinh dưỡng nghèo (oligotrophic).

Các chất tự nhiên (natural substances) cũng có thể ức chế trực tiếp tới sự sinh trưởng và phát triển của vi sinh vật trong các môi trường dinh dưỡng thấp. Các chất đó bao gồm phenol, tannin, ammonia, ethylene, và các hợp chất lưu huỳnh bay hơi. Đây có thể là một phương thức giúp vi sinh vật tránh tận dụng các năng lượng giới hạn trước khi được cung cấp các chất dinh dưỡng cần thiết. Các hóa chất này là rất quan trọng trong bệnh lý học thực vật và có thể giúp khống chế các bệnh vi sinh vật trong đất.

14.5.2. Kiểm tra số lượng vi sinh vật nhân nguyên thủy tuy sống nhưng không nuôi cấy được

Khi nghiên cứu sự sinh trưởng của quần thể vi sinh vật nhân nguyên thủy (procariotic) trong thiên nhiên bên ngoài phòng thí nghiệm cần phải xác định số lượng vi sinh vật sống. Trong lịch sử vi sinh vật học thường người ta định nghĩa vi sinh vật sống là có thể sinh trưởng, có thể hình thành khuẩn lạc (colony) hoặc tạo ra độ đục rõ rệt trên môi trường dịch thể. John R. Postgate ở Đại học Sussex (nước Anh) là một trong những học giả đầu tiên xác định vi sinh vật chịu ức chế (stressed) khi sống trong môi trường thiên nhiên, hoặc trong nhiều môi trường phòng thí nghiệm đặc biệt, là đặc biệt mẫn cảm với các ức chế thứ sinh (secondary stresses). Các ức chế này làm cho vi sinh vật tuy sống nhưng không có thể tạo thành khuẩn lạc trên các môi trường đặc bình thường vẫn dùng để nuôi cấy chúng. Để xác định được sự sinh trưởng của các vi sinh vật này Postgate đưa ra một phương pháp thực nghiệm gọi là thí nghiệm vi hoạt tính Postgate (Postgate Microviability Assay). Trong thí nghiệm này đem vi sinh vật nuôi cấy trên lớp mặt thạch mỏng dưới lá kính (coverslip), làm cho chúng không qua được giai đoạn sinh trưởng đơn bào mà chỉ biến đổi hình thái tế bào, coi đó là biểu hiện *tín hiệu sống* (life sign) Từ đó, nhiều nhà nghiên cứu phát triển các phương pháp hiển vi mẫn cảm và phương pháp chất đồng vị để xác định sự tồn tại và ý nghĩa của dạng vi khuẩn sống nhưng không nuôi cấy được. Chẳng hạn dùng kháng thể huỳnh quang và thuốc nhuộm acridine orange để đánh giá mức độ số lượng; hoặc là dùng phương pháp số lượng khả năng tối đa (MPN-most probable number)...Việc sử dụng chỉ số giải phóng hoạt tính phóng xạ của vật chất tế bào cũng được dùng để xác định ảnh hưởng của hiệu ứng ức chế đối với vi sinh vật. Các phương pháp do Postgate đề ra là rất quan trọng. Nhiều nghiên cứu cho thấy có khi một số vi khuẩn

như *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterococcus faecalis* mất năng lực sinh trưởng trên các môi trường phòng thí nghiệm theo các kỹ thuật nuôi cấy tiêu chuẩn, nhưng chúng vẫn giữ vai trò gây bệnh truyền nhiễm.

Tình trạng một quần thể hỗn hợp trong môi trường thiên nhiên là rất phức tạp. Thông thường chỉ có khoảng 1-10% các tế bào là có thể hình thành khuẩn lạc. Trong tương lai có thể phải tìm ra các môi trường nuôi cấy thích hợp hơn đối với các vi sinh vật còn chưa được biết đến. Hiện nay người ta đã sử dụng kỹ thuật PCR và phân tích ARN của tiểu thể ribosome để đánh giá tính đa dạng của quần thể các vi sinh vật chưa nuôi cấy được.

14.5.3. Cảm ứng mật độ và các quần thể vi sinh vật

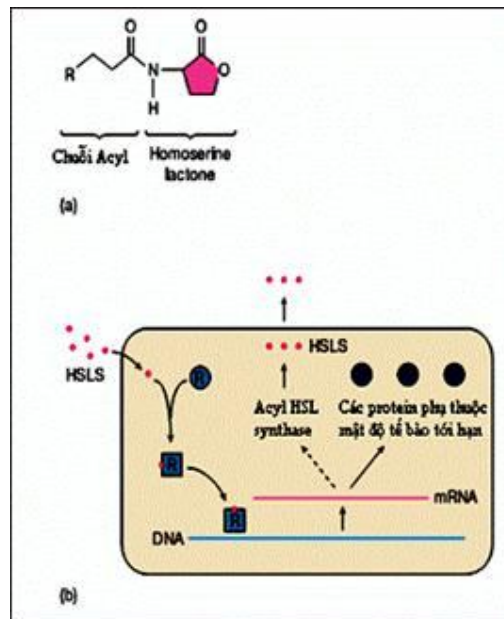
Từ nhiều thập kỷ nay, các nhà vi sinh vật học vẫn nghĩ rằng quần thể vi sinh vật là tập hợp của các cá thể riêng biệt, sinh trưởng và hoạt động độc lập với nhau. Tuy nhiên gần đây người ta đã phát hiện thấy nhiều vi khuẩn có khả năng giao tiếp và hoạt động hợp tác với nhau. Một trong những cách cơ bản để vi sinh vật hợp tác được với nhau đó là cảm ứng mật độ hay còn lại là sự tự cảm ứng. Đó là hiện tượng trong đó vi sinh vật tự điều chỉnh mật độ thông qua quá trình cảm nhận hàm lượng các phân tử tín hiệu, đôi khi gọi là các chất tự cảm ứng (autoinducer) bởi vì chúng có thể kích thích tế bào tiết ra chúng. Nồng độ các phân tử tín hiệu tăng lên cùng với sự tăng lên của số lượng vi khuẩn trong quần thể cho đến khi đạt đến ngưỡng đặc trưng (đối với quần thể đó) và ra tín hiệu cho vi khuẩn rằng mật độ quần thể đã đến mức tới hạn hay còn gọi là "quorum". Vi khuẩn lúc đó sẽ bắt đầu biểu hiện các gen

phụ thuộc mật độ tế bào tới hạn nhằm điều chỉnh mật độ tế bào. Cảm ứng mật độ đã được phát hiện ở cả vi khuẩn Gram âm và Gram dương.

Cảm ứng mật độ có ý nghĩa quan trọng với vi sinh vật. Có thể lấy ví dụ về sự sinh tổng hợp và giải phóng các enzyme ngoại bào. Nếu các enzyme này chỉ được giải phóng nhờ một số ít vi khuẩn, chúng sẽ bị khuếch tán và không phát huy được tác dụng do bị pha loãng. Với cách điều khiển bằng cảm ứng mật độ, vi khuẩn sẽ đạt đến mật độ quần thể lớn trước khi chúng giải phóng enzyme và kết quả là hàm lượng enzyme đủ lớn để phát huy tác dụng. Đó chính là lợi thế của vi sinh vật trong cơ thể vật chủ cũng như trong các môi trường đất, nước. Nếu vi sinh vật gây bệnh có thể đạt được đến nồng độ đủ lớn tại một điểm nào đó trên cơ thể vật chủ trước khi sản sinh các nhân tố độc lực và xâm nhập được vào các mô vật chủ, chúng sẽ có cơ hội lớn hơn trong việc làm mất tác dụng khả năng tự vệ của vật chủ và do đó có thể lan ra toàn bộ cơ thể vật chủ. Điều này giải thích một kiểu khác của cảm ứng mật độ. Dường như cảm ứng mật độ rất quan trọng đối với nhiều vi sinh vật trong việc thiết lập mối quan hệ cộng sinh hay ký sinh đối với vật chủ.

Cảm ứng mật độ được phát hiện đầu tiên và tìm hiểu rõ nhất ở vi khuẩn Gram âm. Các tín hiệu thường gặp nhất ở vi khuẩn Gram âm là acyl homoserine lactones (HSLs). Đó là các phân tử nhỏ được cấu tạo bởi chuỗi acyl từ 4 đến 14 C liên kết với homoserine lactone (hình 14.19). Chuỗi acyl này có thể có nhóm keto hay nhóm ở vị trí C thứ 3. Các phân tử Acyl HSLs khuếch tán vào các tế bào đích (target cell) (hình 14.19). Khi đạt đến hàm lượng đủ lớn, các phân tử Acyl HSLs sẽ bám vào các protein thụ thể đặc

biệt (R) và gây ra sự thay đổi cấu trúc protein. Thông thường khi phức hệ HSLs-protein được hoạt hóa, chúng có tác dụng như chất cảm ứng, chúng bám vào các điểm đích trên ADN và kích thích sự phiên mã của các gen nhạy cảm với nồng độ tế bào tới hạn. Các gen cần thiết để tổng hợp HSL cũng được tạo ra thường xuyên, do đó nhiều chất tự cảm ứng được tổng hợp và giải phóng.



Hình 14.19: Cảm ứng mật độ ở vi khuẩn Gram âm.

(Theo sách của Prescott, Harley và Klein).

(a) Cấu trúc chung của acyl homoserine lactone, chất được biết đến như là tín hiệu cảm ứng mật độ (điều chỉnh mật độ tế bào) hay còn gọi là chất tự cảm ứng.

(b) Lược đồ minh họa cách hoạt động của cảm ứng mật độ ở nhiều vi khuẩn gram âm. Các protein thụ thể hoạt động với vai trò chất cảm ứng (inducer) được ký hiệu bằng chữ R. Đường kẻ gãy nét biểu thị acyl HSL synthase không phải lúc nào cũng được tạo ra tương ứng với các chất tự cảm ứng.

Ở vi khuẩn Gram âm, rất nhiều quá trình nhạy cảm với các tín hiệu acyl HSL và cảm ứng mật độ. Một số ví dụ đã được nghiên cứu kỹ đó là (1) sự sản sinh chất phát quang sinh học (bioluminescence) bởi *Vibrio fischeri*, (2) *Pseudomonas aeruginosa* tổng hợp và giải phóng các yếu tố gây bệnh, (3) Sự chuyển các yếu tố di truyền nhờ quá trình tiếp hợp ở *Agrobacterium tumefaciens*, và (4) Sự sản xuất kháng sinh

ở *Erwinia carotovora* và *Pseudomonas aureofaciens*.

Vi khuẩn Gram dương cũng điều hòa hoạt động bằng cảm ứng mật độ, thông thường bằng tín hiệu là các oligopeptide. Các ví dụ điển hình đó là sự tiếp hợp ở *Enterococcus faecalis*, kích thích khả năng tải nạp ADN (competence induction)

ở *Streptococcus pneumoniae*, sự kích thích tạo bào tử

ở *Bacillus subtilis*, và sự sản sinh rất nhiều độc tố và các yếu tố gây bệnh ở *Staphylococcus aureus*. Cảm ứng mật độ thậm chí kích thích sự phát triển khuẩn ty khí sinh và tạo streptomycin

ở *Streptomyces griseus*. Đối với trường hợp

của *Streptomyces griseus* thì có lẽ tín hiệu là g-butyrolacton chứ không phải là oligopeptide.

Chức năng quan trọng nữa đáng quan tâm của cảm ứng mật độ đó là sự đẩy mạnh việc tạo màng sinh học (biofilm) bởi vi khuẩn gây bệnh *Pseudomonas aeruginosa*, và có thể nó đóng vai trò quan trọng trong bệnh xơ hóa u nang (cystic fibrosis). Sự tạo màng sinh học rất có ý nghĩa đối với vi sinh vật gây bệnh vì nó bảo vệ vi khuẩn khỏi sự tấn công của kháng sinh và các chất tẩy rửa. Sự điều chỉnh mật độ tế bào có thể rất hiệu quả bên trong màng sinh học do hàm lượng acyl HSL ít bị pha loãng và có thể tăng lên nhanh chóng. Trong điều kiện này, hai loại vi khuẩn khác nhau có thể kích thích nhau bằng cách sản xuất ra các tín hiệu tương tự

nhau, đó là trường hợp màng sinh học có chứa các vi khuẩn gây bệnh *P. aeruginosa* và *Burkholderiacepacia*.

Cảm ứng mật độ là một ví dụ về sự hoạt động đa tế bào trong đó các cá thể giao tiếp và hợp tác hoạt động như là một đơn vị thống nhất. Các ví dụ khác về hoạt động phức hợp như trên đó là sự hình thành các dạng khuẩn lạc và sự hình thành thể quả ở Niêm vi khuẩn (*Myxobacteria*).