

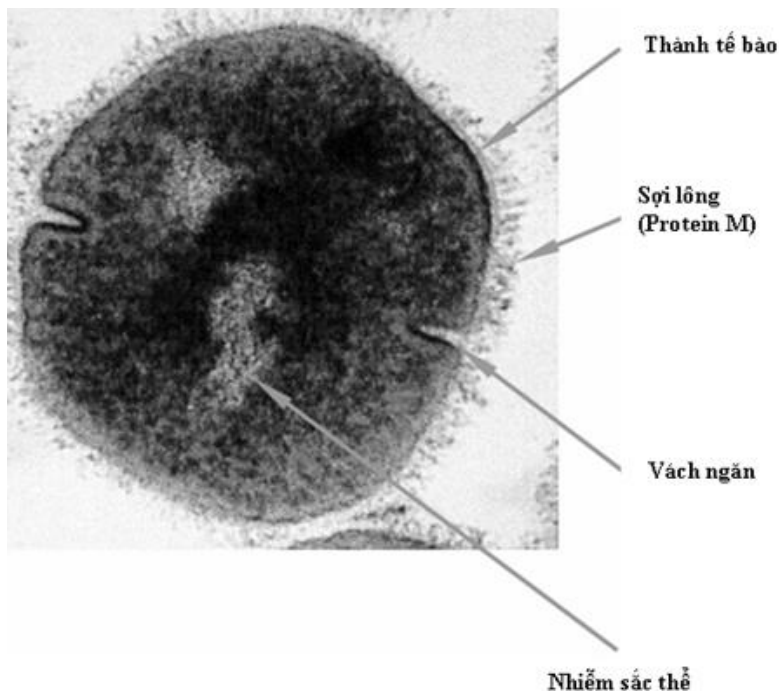
Chương 7. Tăng trưởng của quần thể vi khuẩn

Mục lục

Chương 7. Tăng trưởng của quần thể vi khuẩn	1
7.1. Giới thiệu	2
7.2. Phương pháp xác định sinh khối tế bào	3
7.2.1. Phương pháp trực tiếp:	3
7.2.2. Phương pháp gián tiếp	3
7.2.3. Phương pháp đo số lượng tế bào	3
7.3. Đường cong tăng trưởng của vi khuẩn	5
7.4. Tốc độ tăng trưởng và thời gian thế hệ	8
7.4.1. Tốc độ tăng trưởng	8
7.4.2. Thời gian thế hệ	8
7.5. Nuôi cấy liên tục	9
7.6. Sự tăng trưởng đồng bộ của vi khuẩn	10

7.1. Giới thiệu

Tăng trưởng là quá trình gia tăng có trật tự về số lượng các thành phần cấu trúc của tế bào. Tiến trình này phụ thuộc vào khả năng của tế bào hình thành nên một nguyên sinh chất mới từ các chất dinh dưỡng sẵn có trong môi trường. Ở hầu hết vi khuẩn, quá trình tăng trưởng liên quan đến các hoạt động làm gia tăng khối lượng tế bào và số lượng ribosome, nhân đôi nhiễm sắc thể, tổng hợp vách tế bào và màng nguyên sinh chất mới, phân chia hai nhiễm sắc thể, hình thành vách ngăn và cuối cùng là chia đôi tế bào. Quá trình sinh sản vô tính này được gọi là sự sinh sản theo hình thức trực phân (binary fission).



Hình 7.1. Vi ảnh *Streptococcus pyogenes* đang phân đôi dưới kính hiển vi điện tử (Maria Fazio và Vincent A. Fischetti). Hầu hết vi khuẩn sinh sản bằng một tiến trình vô tính tương đối đơn giản được gọi là sinh sản nhân đôi: từng tế bào gia tăng kích thước và chia đôi thành hai tế bào con. Trong suốt tiến trình này là sự gia tăng

có trật tự về cấu trúc và thành phần nội bào, sao chép và phân tách DNA và hình thành vách ngăn để phân đôi tế bào thành hai tế bào con. Tiến trình này cũng có sự phối hợp của màng vi khuẩn qua công cụ mesosome. Phân tử DNA được cho là dính lên một điểm trên màng, tại đó bắt đầu tiến trình sao chép. Hai phân tử DNA vẫn còn dính trên hai điểm cạnh kề nhau trên màng trong của tế bào mẹ trong khi vật liệu màng mới được tổng hợp giữa hai điểm này. Điều này giúp các phân tử DNA nằm theo hướng đối diện nhau trong lúc thành và màng tế bào mới bắt đầu ngăn cách giữa hai phần nhiễm sắc thể giống hệt nhau. Khi vách ngăn hoàn thành, tế bào chia đôi thành hai tế bào con. Khoảng thời gian cần thiết cho tế bào phân đôi hoặc

để cho quần thể vi khuẩn tăng gấp đôi được gọi là thời gian thế hệ. Thời gian thế hệ đối với nhiều loài vi khuẩn đang tăng trưởng trong tự nhiên có thể ngắn khoảng 15 phút hoặc có thể dài trong vài ngày.

Đối với các sinh vật đơn bào như vi khuẩn, sự tăng trưởng có thể đo được bằng nhiều cách thông qua hai tiêu chí khác nhau đó là sự thay đổi về sinh khối tế bào và sự thay đổi về số lượng tế bào.

7.2. Phương pháp xác định sinh khối tế bào

Có thể sử dụng phương pháp (1). Trực tiếp và (2). Gián tiếp để xác định sinh khối tế bào.

7.2.1. Phương pháp trực tiếp:

Trong nhóm phương pháp trực tiếp gồm:

(a). Phương pháp vật lý: thông qua xác định khối lượng khô, khối lượng ướt hoặc thể tích tế bào sau ly tâm và

(b). Phương pháp hóa học: bằng cách xác định một số thành phần hóa học của tế bào như hàm lượng nitơ (N) tổng, protein tổng hoặc tổng hàm lượng DNA.

7.2.2. Phương pháp gián tiếp

Nhóm phương pháp này được xác định qua:

(a). Hoạt tính hóa học: xác định hoạt tính hóa học như tỷ lệ hàm lượng O_2 sinh ra hoặc được tiêu thụ, tỷ lệ hàm lượng CO_2 sinh ra hoặc được tiêu thụ,hoặc

(b). Đo độ đục: được tiến hành trên nhiều loại thiết bị để xác định số lượng ánh sáng bị phân tán do sự lơ lửng của tế bào có trong dung dịch. Đo độ đục hoặc mật độ quang học của dịch huyền phù tế bào là phương pháp đo gián tiếp liên quan đến sinh khối tế bào hay số lượng tế bào. Khi sử dụng phương pháp này cần phải xây dựng và hiệu chuẩn đường chuẩn. Phương pháp này rất đơn giản nhưng độ nhạy bị giới hạn trong khoảng 10^7 tế bào/ ml.

7.2.3. Phương pháp đo số lượng tế bào

Bao gồm các kỹ thuật như (a). Đếm trực tiếp bằng mắt hoặc bằng thiết bị và (b). Đếm gián tiếp tế bào sống.

(a). Đếm trực tiếp dưới kính hiển vi: bằng cách sử dụng các buồng đếm. Tuy nhiên phương pháp này không phân biệt được tế bào chết hay tế bào còn sống. Khi áp dụng

phương pháp đếm này thì dịch huyền phù phải có mật độ $>10^7$ tế bào/ ml. Tuy nhiên cũng có thể cô đặc mẫu bằng cách ly tâm hoặc lọc để tăng độ nhạy. Phương pháp đếm trực tiếp dưới kính hiển vi có thể được sử dụng để quan sát và xác định sự tăng trưởng của vi khuẩn.

(b). Sử dụng buồng đếm điện tử: dùng để đếm số lượng và đo kích cỡ phân bố của các tế bào. Khi đo kích cỡ tế bào, thì dịch huyền phù phải rất sạch. Các thiết bị điện tử thường được áp dụng để đếm các tế bào eukaryote như tế bào máu chẳng hạn.

Bảng 7.1. Một số phương pháp dùng để xác định sự tăng trưởng của vi khuẩn.

Phương pháp	Áp dụng	Diễn giải
Đếm trực tiếp dưới kính hiển vi	Số lượng vi khuẩn trong sữa hoặc vaccin tế bào	Không thể phân biệt giữa tế bào sống và tế bào chết
Đếm vi khuẩn sống qua khuẩn lạc	Số lượng vi khuẩn trong sữa, thực phẩm, đất, nước, nuôi cấy ở phòng thí nghiệm, ...	Rất nhạy nếu các điều kiện môi trường tối thích
Đo độ đục	Ước lượng một lượng lớn vi khuẩn trong môi trường lỏng và dung dịch	nhạy và không phá hủy nhưng không thể phát hiện mật độ tế bào nhỏ 10^7 tế bào/ ml
Xác định N tổng hoặc protein tổng	Đo tổng tế bào sinh ra từ chủng nuôi cấy	Chỉ áp dụng trong phòng thí nghiệm nghiên cứu
Xác định hoạt tính sinh hóa ví dụ hấp thu O_2 , sinh CO_2 , ATP, ...	Phương pháp vi sinh	Đòi hỏi có tiêu chuẩn cố định liên quan đến hoạt tính hóa học tương ứng với khối lượng tế bào và/hoặc số lượng tế bào
Xác định khối lượng chất khô hoặc ướt của tế bào hoặc thể tích sau khi ly tâm	Đo tổng tế bào sinh ra từ chủng nuôi cấy	Có lẽ nhạy hơn các phép đo tổng số N hoặc protein tổng

(c). Đếm gián tiếp tế bào sống: kỹ thuật này còn gọi là đếm đĩa, liên quan đến cấy đĩa trên môi trường thạch dinh dưỡng. Trước khi cấy, mẫu có thể được pha loãng trong

dung dịch nước muối sinh lý hoặc dung dịch muối có peptone. Nếu cấy trên môi trường phù hợp thì mỗi tế bào sống sẽ tăng trưởng và hình thành nên một khuẩn lạc. Mỗi khuẩn lạc đếm được gọi là đơn vị hình thành khuẩn lạc (CFU), số lượng cfu liên quan đến số tế bào vi khuẩn còn sống trong mẫu.

Thuận lợi của kỹ thuật này đó là độ nhạy. Về mặt lý thuyết, có thể phát hiện được một tế bào riêng lẻ và phương pháp này cho phép kiểm tra và xác định vi sinh vật cần đếm.

Điểm bất lợi của phương pháp này như sau: (i) chỉ có tế bào sống phát triển thành khuẩn lạc; (ii) các tế bào kết cụm hay kết thành chuỗi phát triển thành khuẩn lạc riêng lẻ; (iii) các khuẩn lạc chỉ phát triển từ những môi trường và điều kiện phù hợp cho sự tăng trưởng của chúng.

Hiện nay nhiều kỹ thuật sinh học phân tử đã được triển khai chẳng hạn như Real-time PCR và mẫu dò gen chẳng hạn. Trong đó Real-time PCR có thể được sử dụng để định lượng tế bào có trong mẫu thử. Mẫu dò gen có thể được sử dụng để chứng minh sự đa dạng và phong phú về mặt di truyền của prokaryote trong môi trường, kỹ thuật này được ứng dụng để xác định những loài vi sinh vật không thể nuôi cấy được.

7.3. Đường cong tăng trưởng của vi khuẩn

Trong phòng thí nghiệm, dưới những điều kiện thích hợp, quần thể vi khuẩn tăng trưởng tăng gấp đôi ở những thời gian bằng nhau. Sự tăng trưởng là tiến trình cấp số mũ: 1, 2, 4, 8, ... hay $2^0, 2^1, 2^2, 2^3, \dots, 2^n$, trong đó n = số thế hệ. Tiến trình này được gọi là tăng trưởng theo số mũ. Trong thực tế, tăng trưởng lũy thừa chỉ là một phần của chu trình sống của vi khuẩn và không mang tính đại diện cho kiểu tăng trưởng bình thường của vi khuẩn trong tự nhiên.

Khi cấy một lượng tế bào lên môi trường và sự tăng trưởng của quần thể được giám sát theo thời gian, dữ liệu thu được sẽ tạo ra đường cong tăng trưởng điển hình (Hình 7.2).

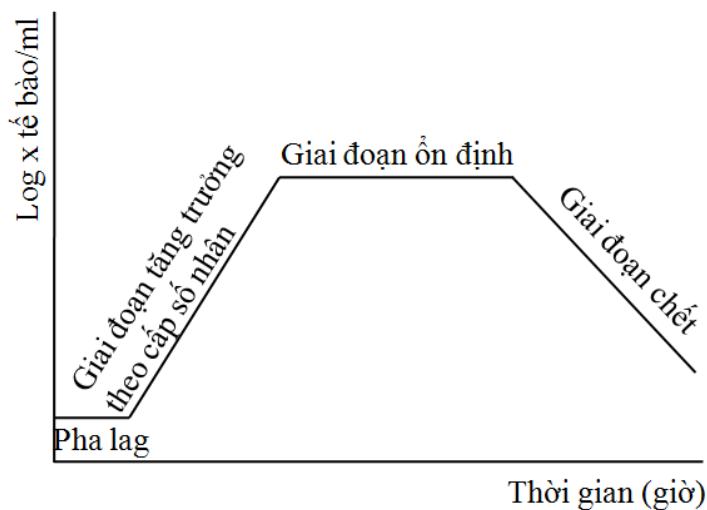
Có bốn giai đoạn trong chu kỳ sinh trưởng của vi sinh vật đó là (1). Giai đoạn Lag (Lag phase). (2). Giai đoạn tăng trưởng theo cấp số mũ (Log phase). (3). Giai đoạn ổn định (Stationary phase) và (4). Pha chết

(1). Giai đoạn Lag: ngay sau khi cấy tế bào vi khuẩn vào môi trường, quần thể vi

khẩn tạm thời chưa thay đổi. Mặc dù chưa xuất hiện sự phân đôi rõ ràng, nhưng tế bào có thể tăng trưởng về thể tích hay khối lượng, tổng hợp enzyme, protein, RNA, ... và gia tăng hoạt động biến dưỡng.

Thời gian của giai đoạn này rõ ràng phụ thuộc vào mức độ đa dạng của các yếu tố như lượng vi khuẩn cấy vào, thời gian cần thiết để phục hồi do tác động vật lý và gây sốc khi chuyển chủng, thời gian cần thiết để sinh tổng hợp các coenzyme thiết yếu hoặc các yếu tố phân đôi và thời gian đòi hỏi để tổng hợp các enzyme mới cần thiết để biến dưỡng cơ chất hiện diện trong môi trường.

(2). Giai đoạn tăng trưởng theo cấp số mũ: giai đoạn tăng trưởng theo cấp số mũ là một kiểu mẫu tăng trưởng cân bằng vì tất cả các tế bào đang phân đôi và đang tăng trưởng nhờ quá trình hình học. Tế bào phân đôi ở vận tốc ổn định phụ thuộc vào thành phần của môi trường tăng trưởng và điều kiện nuôi cấy. Tốc độ tăng trưởng theo cấp số mũ của chủng vi khuẩn nuôi cấy được biểu hiện như là thời gian thế hệ, còn gọi là thời gian tăng đôi của quần thể vi khuẩn. Thời gian thế hệ (G) được xác định như thời gian (t) cho mỗi thế hệ ($n = \text{số thế hệ}$). Do đó $G=t/n$ là biểu thức xuất phát từ sự tính toán thời gian thế hệ.



Hình 7.2. Minh họa về đường cong tăng trưởng điển hình của vi khuẩn. Khi vi khuẩn tăng trưởng trong một hệ thống đóng còn gọi là mẻ nuôi cấy, giống như trong ống nghiệm, quần thể tế bào luôn luôn biểu hiện trạng thái động học tăng trưởng: tế bào bắt đầu điều chỉnh trong môi trường mới (lag phase)

cho đến khi chúng có thể bắt đầu phân chia bằng quá trình phân đôi (giai đoạn phân chia cấp số mũ). Khi sự tăng trưởng trở nên bị giới hạn, tế bào sẽ dừng phân đôi đi vào giai đoạn ổn định, cuối cùng chúng đi vào pha chết. Biến động tăng trưởng của quần thể vi khuẩn được biểu diễn qua các thông số giám sát của trục x và y. Sự tăng trưởng được biểu hiện bằng sự thay đổi số tế bào sống theo thời gian. Thời gian thế

hệ được tính toán trong giai đoạn tăng trưởng theo cấp số mũ.

(3). Giai đoạn ổn định: sự tăng trưởng cấp số mũ có thể chấp dứt trong mẻ nuôi cấy, ví dụ trong hệ thống đóng như trong ống nghiệm hay bình erlen, bồn lên men, Sự tăng trưởng của quần thể bị giới hạn bởi một trong ba yếu tố sau. (a). Sự cạn kiệt về các chất dinh dưỡng sẵn có, (b). Sự tích lũy các chất biến dưỡng gây ức chế hoặc những sản phẩm cuối, (c). Sự cạn kiệt về không gian trong trường hợp này gọi là thiếu không gian sinh học.

Trong giai đoạn ổn định, thì có thể không xác định được, hoặc một số tế bào đang chết và một lượng tế bào tương tự đang phân đôi hoặc quần thể vi khuẩn ngừng tăng trưởng hoặc phân đôi. Giai đoạn ổn định này giống như giai đoạn lag, không phải là giai đoạn im lìm. Vi khuẩn sản sinh ra các chất biến dưỡng thứ cấp như kháng sinh được tạo ra trong giai đoạn ổn định của chu kỳ tăng trưởng. Trong giai đoạn ổn định này vi khuẩn hình thành bào tử có thể bị cảm ứng hoạt động để tạo ra hàng tá gen liên quan đến quá trình hình thành bào tử.

(4). Pha chết: sau khi quần thể vào giai đoạn ổn định nếu tiếp tục ủ thì quần thể vi khuẩn sẽ đi vào pha chết. Điều này biểu hiện qua sự suy giảm về số lượng tế bào sống, được quan sát bằng cá kỹ thuật như đo độ đục hoặc đếm trực tiếp dưới kính hiển vi. Trong giai đoạn này số lượng tế bào sống giảm theo cấp số mũ, đối ngược với sự tăng trưởng của giai đoạn tăng trưởng theo cấp số mũ.

Bảng 7.2. Thời gian thế hệ của một số vi khuẩn trong điều kiện tăng trưởng tối thích.

Vi khuẩn	Môi trường	Thời gian thế hệ (phút)
<i>Escherichia coli</i>	Glucose - muối	17
<i>Bacillus megaterium</i>	Sucrose - muối	25
<i>Streptococcus lactis</i>	Sữa	26
<i>Streptococcus lactis</i>	Dung dịch lactose	48
<i>Staphylococcus aureus</i>	Dịch chiết từ tim động vật	27 - 30
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Sữa	66 - 87
<i>Rhizobium japonicum</i>	Môi trường gồm có mannitol, muối, cao nấm men	344 - 461

<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Môi trường tổng hợp	792 - 932
<i>Treponema pallidum</i>	Thử nghiệm trên thỏ	1980

7.4. Tốc độ tăng trưởng và thời gian thế hệ

7.4.1. Tốc độ tăng trưởng

Như đã đề cập ở trên, sự tăng trưởng của vi khuẩn trong giai đoạn tăng trưởng cấp số mũ, dưới những điều kiện dinh dưỡng tiêu chuẩn như môi trường nuôi cấy, nhiệt độ, pH, Thời gian thế hệ của vi khuẩn thì dao động trong khoảng từ 12 phút đến 24 giờ hoặc dài hơn. Thời gian thế hệ đối với *E. coli* trong phòng thí nghiệm nằm trong khoảng 15 - 20 phút nhưng trong đường ruột, thời gian thế hệ của coliform ước khoảng 12 - 24 giờ. Đối với hầu hết vi khuẩn đã biết và có thể nuôi cấy được thì thời gian thế hệ trong khoảng 15 phút đến 60 phút. Các vi khuẩn cộng sinh như *Rhizobium* có thời gian thế hệ dài hơn. Nhiều vi khuẩn vô cơ dưỡng như vi khuẩn nitrate hóa cũng có thời gian thế hệ dài. Một số vi khuẩn gây bệnh như *Mycobacterium tuberculosis* và *Treponema pallidum*, có thời gian thế hệ đặc biệt dài và điều này được cho là thuận lợi cho sự gây bệnh của chúng. Thời gian thế hệ đối với một số vi khuẩn được trình bày ở Bảng 7.2.

7.4.2. Thời gian thế hệ

Khi phát triển đến cấp số nhân bằng sinh sản vô tính thì mức gia tăng trong quần thể vi khuẩn là một tiến trình hình cấp số mũ. Nếu chúng ta bắt đầu với một tế bào, khi nó chia đôi thì thế hệ đầu tiên gồm 2 tế bào, thế hệ thứ hai có 4 tế bào, thế hệ thứ ba gồm 8 tế bào và cứ tiếp tục như vậy. Thời gian thế hệ (generation time) là thời gian cần thiết để tế bào phân đôi.

$$G \text{ (thời gian thế hệ)} = (\text{thời gian, phút hoặc giờ})/n(\text{số thế hệ})$$

$$G = \frac{t}{n};$$

Trong đó: t = thời gian tính giờ hay phút; B = số tế bào vi khuẩn tại thời điểm bắt đầu; b = số tế bào vi khuẩn tại thời điểm kết thúc; n = số thế hệ (số lần quần thể tế bào tăng gấp đôi trong khoảng thời gian); $b = B \times 2^n$ (đây là phương trình biểu thị cho sự tăng trưởng bằng cách sinh đôi)

Để tìm n:

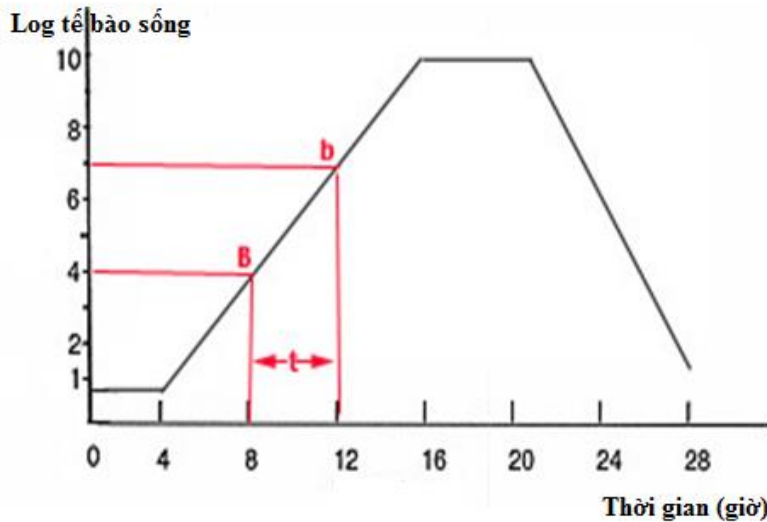
$$\log b = \log B + n \log 2$$

$$G = \frac{t}{n}$$

Tìm G:

$$n = \frac{\log b - \log B}{\log 2} \rightarrow n = \frac{\log b - \log B}{0,301} \rightarrow n = 3,3 \log \frac{b}{B} \quad G = \frac{t}{3,3 \log \frac{b}{B}}$$

Ví dụ: hãy tính thời gian thế hệ của quần thể vi khuẩn tăng từ 10.000 tế bào lên 10.000.000 tế bào trong 4 giờ tăng trưởng.



$$G = \frac{t}{3,3 \log \frac{b}{B}}$$

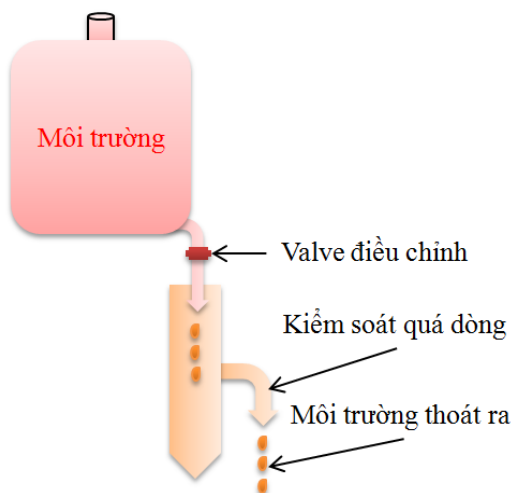
$$G = \frac{240'}{3,3 \log \frac{10^7}{10^4}}$$

$$G = \frac{240'}{3,3 \times 3}$$

$$G = 24'$$

7.5. Nuôi cấy liên tục

Các vấn đề thảo luận về sự tăng trưởng của quần thể vi khuẩn ở trên được gọi là nuôi cấy mẻ. Do các chất dinh dưỡng không được bổ sung nên sự tăng trưởng theo cấp số mũ sẽ bị giới hạn chỉ sau một vài thế hệ. Tuy nhiên chủng vi khuẩn có thể duy trì trạng thái tăng trưởng theo cấp số nhân trong thời gian dài nếu sử dụng hệ thống nuôi cấy liên tục (Hình 7.3). Hệ thống này được thiết kế nhằm cắt giảm đáng kể các điều kiện làm kết thúc sự tăng trưởng theo cấp số mũ trong nuôi cấy mẻ. Nuôi cấy liên tục được tiến hành



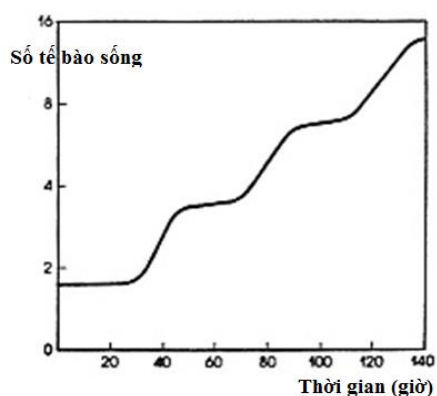
trong thiết bị lên men liên tục gọi là chemostat, có thể được sử dụng để duy trì quần thể vi khuẩn ở mật độ không đổi.

Hình 7.3. Sơ đồ thiết bị lên men liên tục (chemostat). Thiết bị này được thiết kế để loại bỏ đáng kể các điều kiện môi trường làm hạn chế sự tăng trưởng bằng cách cung cấp liên tục chất dinh dưỡng cho tế bào và loại bỏ chất thải và tế bào qua sử dụng từ môi trường nuôi cấy.

Ở thiết bị lên men liên tục, khoang tăng trưởng được nối với nguồn cung cấp môi trường vô trùng. Một khi sự tăng trưởng bắt đầu, môi trường tươi từ nguồn cung cấp được bổ sung liên tục. Thể tích dịch nuôi cấy trong bình tăng trưởng được duy trì ở mức không đổi nhờ kiểm soát dòng tràn (quá dòng). Môi trường tươi bổ sung vào bình tăng trưởng ở tốc độ giới hạn sự tăng trưởng của vi khuẩn. Tốc độ tăng trưởng của vi khuẩn có cùng với vi khuẩn được loại bỏ qua dòng tràn. Tốc độ môi trường thêm vào xác định tốc độ tăng trưởng vì môi trường bổ sung luôn chứa một lượng giới hạn các chất dinh dưỡng thiết yếu. Vì vậy thiết bị lên men liên tục làm giảm đáng kể các chất dinh dưỡng không hiệu quả, sự tích lũy các chất độc và sự tích lũy quá mức các tế bào nuôi cấy. Đây là các thông số làm chúng nuôi cấy đi vào giai đoạn ổn định của chu kỳ tăng trưởng. Chúng vi khuẩn có thể tăng trưởng và được duy trì ở điều kiện tương đối không đổi, phụ thuộc vào tốc độ dòng của chất dinh dưỡng.

7.6. Sự tăng trưởng đồng bộ của vi khuẩn

Khi nghiên cứu quần thể vi khuẩn trong nuôi cấy mẻ và nuôi cấy liên tục không cho phép đưa ra bất kỳ kết luận nào về đặc tính tăng trưởng của từng cá thể tế bào, bởi vì sự phân bố về kích cỡ tế bào trong trong số các thành viên của quần thể thì hoàn toàn ngẫu nhiên. Tuy nhiên thông tin về đặc điểm tăng trưởng của của từng cá thể vi khuẩn có thể thu được nhờ nghiên cứu về nuôi cấy đồng bộ (synchronous culture). Sự nuôi cấy đồng bộ phải bao gồm các tế bào có cùng giai đoạn tăng trưởng. Các phép đo tiến hành trên nuôi cấy đồng bộ phải tương đương với phép đo trên các cá thể tế bào.



Hình 7.4. Đồ thị minh họa sự tăng trưởng đồng bộ của quần thể vi khuẩn. Bằng cách chọn lọc cẩn thận các tế bào vừa mới phân đôi, có thể chọn được quần thể vi khuẩn đồng bộ xuất phát từ một vòng phân đôi tế bào. Sự đồng bộ này có thể được duy trì chỉ trong vài thế hệ.

Một số kỹ thuật hiện đại thu nhận quần thể vi khuẩn tại cùng thời điểm trong chu trình tế bào. Một số kỹ thuật liên quan đến việc vận hành các thông số môi trường nhằm cảm ứng quần thể bắt đầu hoặc kết thúc tăng trưởng tại cùng một điểm trong chu trình tế bào, trong khi đó các thông số khác là các phương

pháp hóa học nhằm lựa chọn các tế bào vừa mới kết thúc quá trình phân đôi. Về mặt lý thuyết, các tế bào nhỏ nhất trong quần thể vi khuẩn là những tế bào vừa mới kết thúc quá trình phân đôi. Sự tăng trưởng đồng bộ của các tế bào vi khuẩn được minh họa tại Hình 7.4. Các chủng đồng bộ thì mau chóng mất đi sự đồng bộ là do không phải tất cả các tế bào trong quần thể được phân chia một cách chính xác cùng kích cỡ, độ tuổi hay thời điểm.