

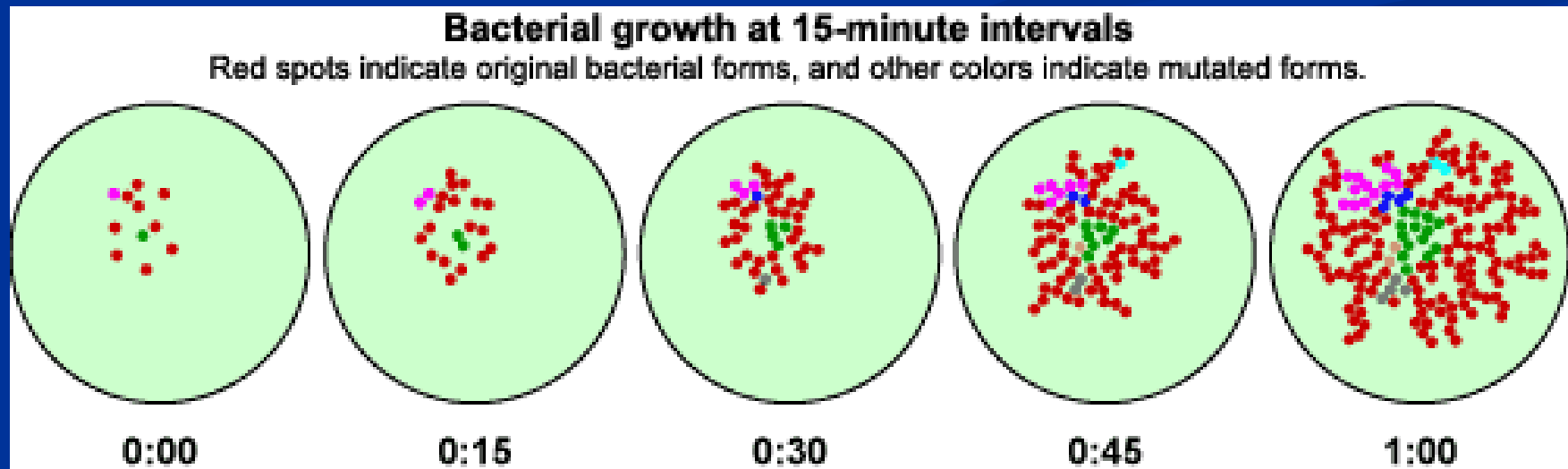
Chương 3

SINH TRƯỞNG VÀ PHÁT TRIỂN Ở VI SINH VẬT

TS. Lê Quốc Tuấn
Khoa Môi trường và Tài nguyên
Đại học Nông Lâm TP. Hồ Chí Minh

Khái niệm

- ❖ Sinh trưởng là sự tăng kích thước và khối lượng tế bào
- ❖ Phát triển (sinh sản) là sự tăng số lượng tế bào



Sinh trưởng và phát triển của VSV



Mẫu lý thuyết về sinh trưởng và phát triển của vi khuẩn

- ❖ Nếu số tế bào ban đầu là N_0 , sau n lần phân chia, thì số tế bào sẽ là:

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

n còn được gọi là số thế hệ có thể được tính bằng

$$\log N = \log N_0 + n \cdot \log 2$$



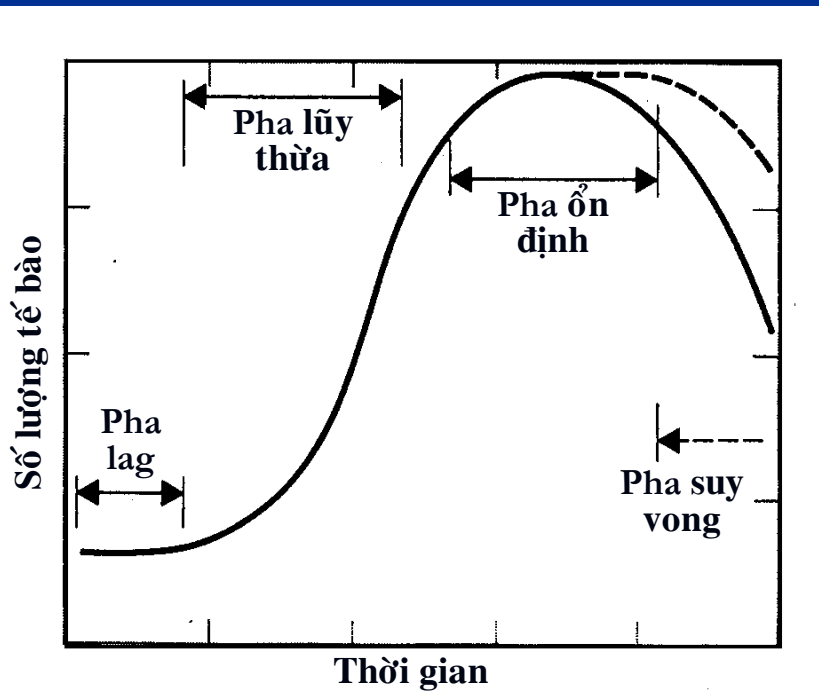
$$n = \frac{1}{\log 2} \cdot (\log N - \log N_0)$$

- ❖ Gọi t là thời gian sau n lần phân chia, thì thời gian giữa 2 thế hệ (g) sẽ được tính bằng

$$g = \frac{t}{n} = \log 2 \frac{t_2 - t_1}{\log N - \log N_0}$$

- ❖ Giá trị đảo ngược của g còn gọi là hằng số phân chia (C), hằng số phân chia phụ thuộc vào:
 - Loài vi khuẩn
 - Nhiệt độ nuôi cấy
 - Môi trường nuôi cấy

Sinh trưởng và phát triển của Vi khuẩn trong môi trường nuôi cấy tĩnh



Đường cong sinh trưởng

Pha lag

- Tính từ lúc nuôi cấy đến lúc đạt sinh trưởng cực đại
- *Trong pha lag vi khuẩn chưa phân chia nhưng thể tích và khối lượng tế bào tăng lên đáng kể*
- Enzyme dùng cho quá trình tổng hợp đều được hình thành trong pha này
- Độ dài pha lag phụ thuộc vào giống và môi trường
- Pha lag là một quá trình thích nghi của vi khuẩn với môi trường mới

$$\mu = \frac{\log_2 X_2 - \log_2 X_1}{\log_2 e(t_2 - t_1)}$$

Pha log

- Tế bào sinh trưởng và phát triển theo lũy thừa
- Sinh khối và số lượng tế bào tính theo phương trình:

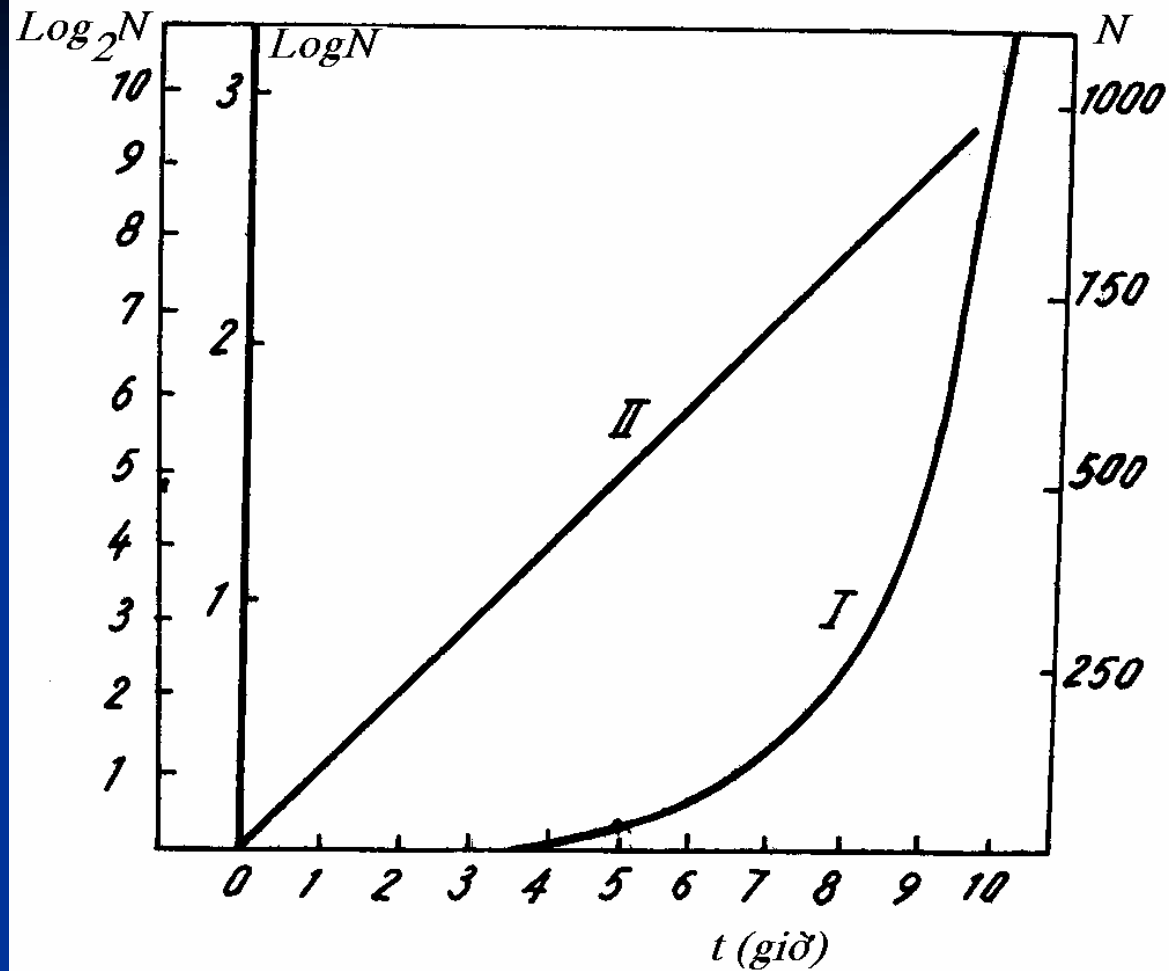
$$N = N_0 \cdot 2^{ct} \text{ hay } X = X_0 \cdot 2^{\mu t}$$

c: hằng số tốc độ phân chia; **μ** : hằng số tốc độ sinh trưởng

- Các hằng số c và μ được tính theo công thức

$$\mu = \frac{\log_2 X_2 - \log_2 X_1}{\log_2 e(t_2 - t_1)}$$

- Các hằng số này tùy thuộc vào một loạt các yếu tố môi trường, đặc biệt là chất dinh dưỡng của môi trường nuôi cấy
- Thực tế, trong quần thể vi khuẩn có một số tế bào không phân chia



Sinh trưởng theo lũy thừa của các vi sinh vật đơn bào
 I - Phương pháp thông thường biểu diễn kết quả
 II - Thang logarit
 N = Số tế bào

$$\mu = \frac{\log_2 \lambda_2 - \log_2 \lambda_1}{\log_2 e(t_2 - t_1)}$$

Pha log

- Sự sinh trưởng của VSV thường được xem xét dựa trên một số yếu tố hạn chế như nhiệt độ, pH, chất dinh dưỡng
- Vì vậy Monod đã nêu lên một cách tương tự mối quan hệ giữa các hằng số c và μ với nồng độ chất dinh dưỡng hạn chế qua các phương trình:

$$c = c_{\max} \frac{[S]}{K_s + [S]}$$

$$\mu = \mu_{\max} \frac{[S]}{K_s + [S]}$$

- Ở đây c_{\max} và μ_{\max} lần lượt là hằng số tốc độ phân chia và hằng số tốc độ sinh trưởng cực đại, K_s là hằng số bão hòa và $[S]$ là nồng độ chất dinh dưỡng hạn chế.
- Hằng số bão hòa K_s thường có giá trị rất thấp

Một số hằng số bão hòa

Vi sinh vật	Chất dinh dưỡng hạn chế	K_s
<i>E. coli</i>	glucose	4mg/l
<i>E. coli</i>	mannitol	2mg/l
<i>E. coli</i>	lactose	20mg/l
<i>E. coli</i>	glucose	7,5mg/l
<i>E. coli</i>	tryptophan	0,2 đến 1,0 $\mu\text{g/l}$
<i>E. coli</i>	tryptophan	0,4 $\mu\text{g/l}$
<i>M. tuberculosis</i>	glucose	3, 9 $\mu\text{g/l}$
<i>A. aerogenes</i>	phosphate	0,6mmol/l
<i>B. megatherium</i>	O ₂	3,1 . 10 ⁻⁸ mol/l
<i>E. coli</i>	O ₂	6,0 . 10 ⁷ mol/l
	O ₂	2,2 . 10 ⁻⁸ mol/l

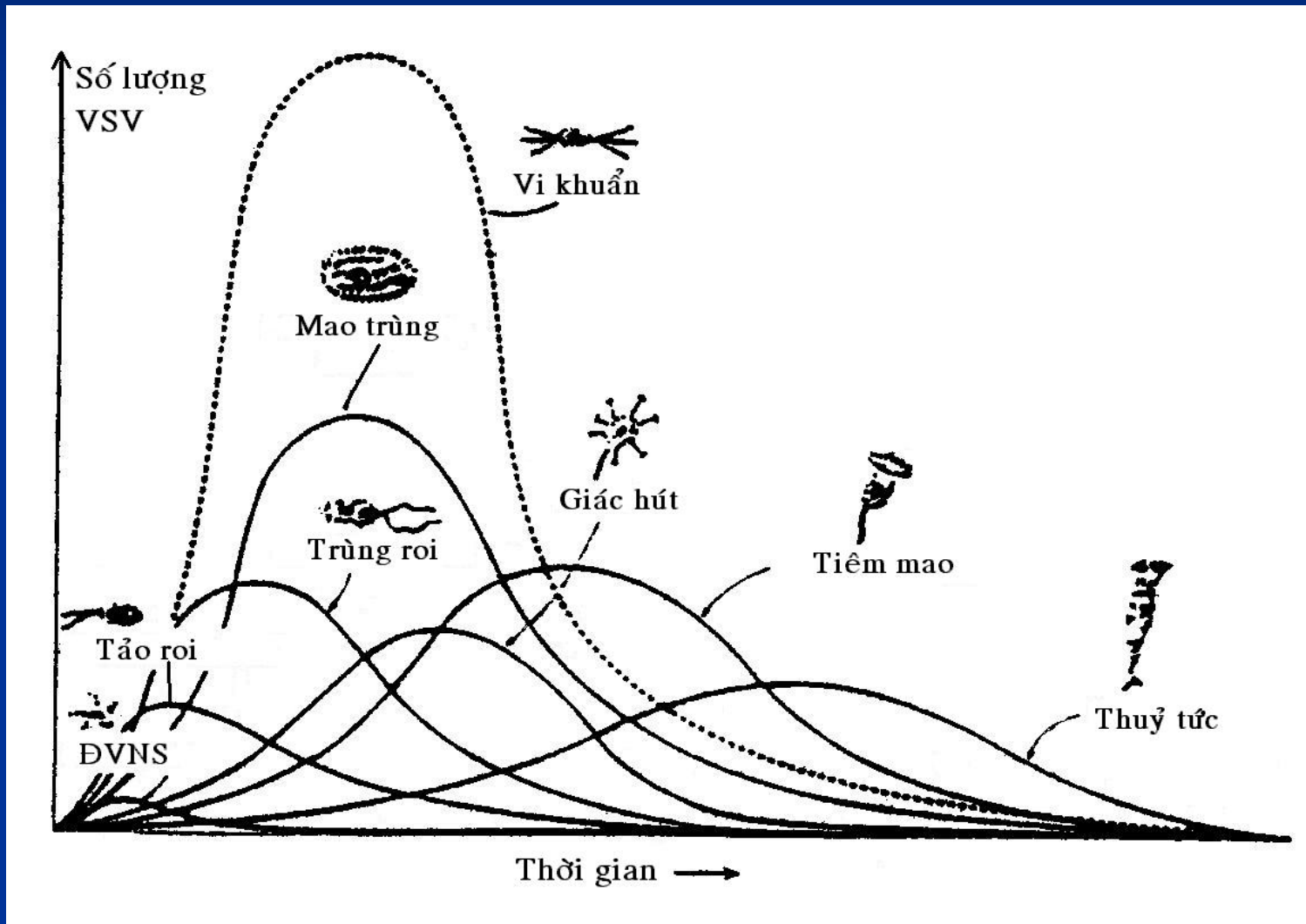
Pha ổn định

- VSV ở trạng thái cân bằng động học, tức là *số VSV sinh ra bằng số VSV chết đi*
- Số lượng tế vào và sinh khối không tăng, không giảm
- Tốc độ sinh trưởng phụ thuộc vào cơ chất
- Nguyên nhân tồn tại pha ổn định là do:
 - *Sự tích lũy các sản phẩm gây độc*
 - *Sự cạn kiệt nguồn dinh dưỡng*

Pha tử vong

- Số lượng tế bào giảm theo lũy thừa
- Nguyên nhân của pha tử vong chưa rõ ràng, nhưng có liên quan đến *điều kiện bất lợi của môi trường*
- Một số enzyme thể hiện hoạt tính cao trong pha này như *deaminase*, *decarboxylase*, các *amilase* và *proteinase* ngoại bào
- Ngoài chức năng xúc tác một số quá trình tổng hợp, các enzyme trên chủ yếu xúc tác các quá trình phân giải

Đường cong sinh trưởng của một số loài vi sinh vật



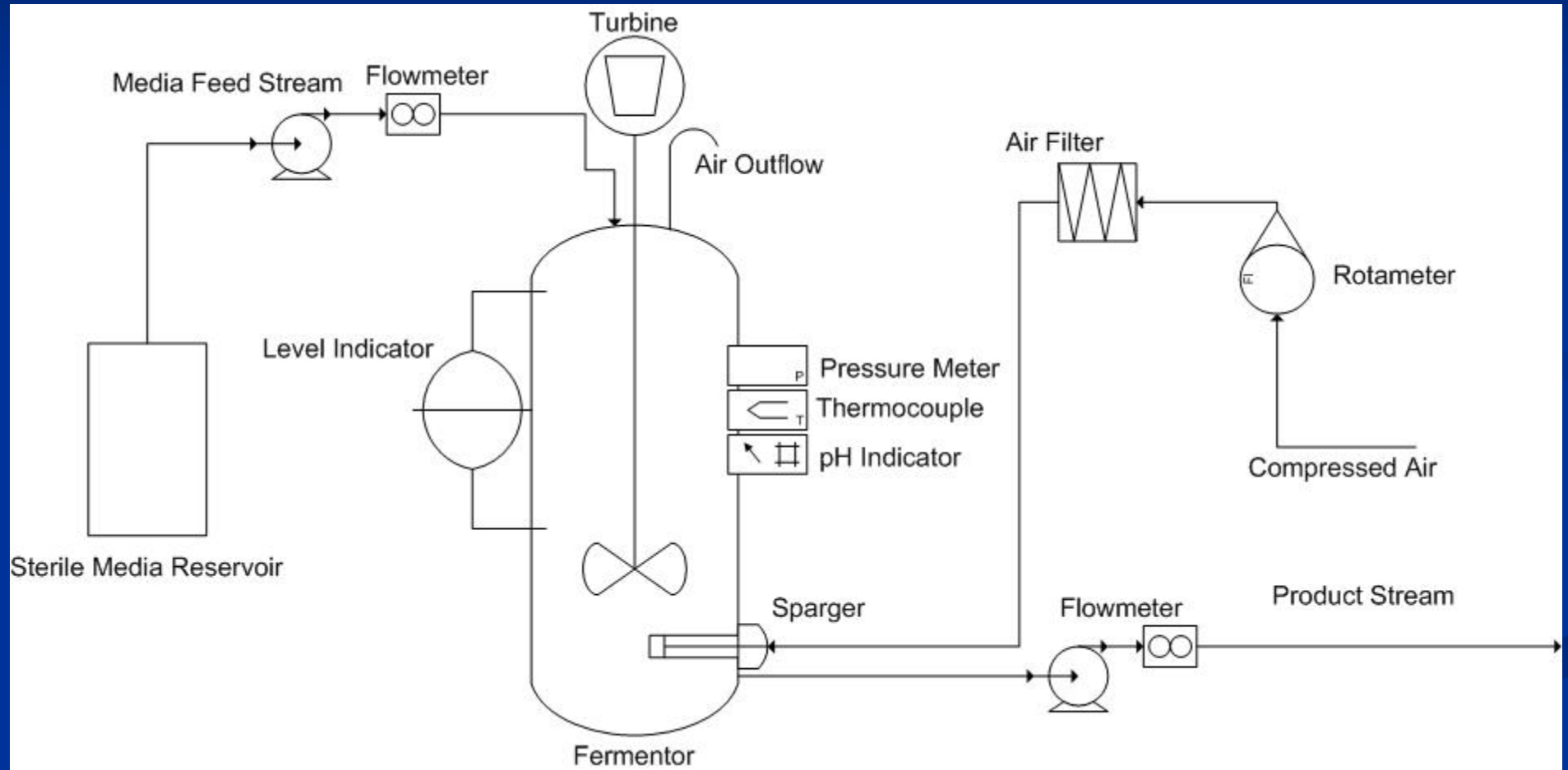
Một số phương pháp bảo quản VSV

- Cấy chuyển thường xuyên, giữ ở 4⁰C
- Bảo quản dưới dầu vô trùng
- Bảo quản trong cát hoặc sét vô trùng
- Đông khô: là PP hoàn thiện và hiệu quả, bảo quản được vài năm.
- Bảo quản trong glycerin (10%) và giữ ở nhiệt độ – 60⁰C hay – 80⁰C, PP này bảo quản lâu nhất

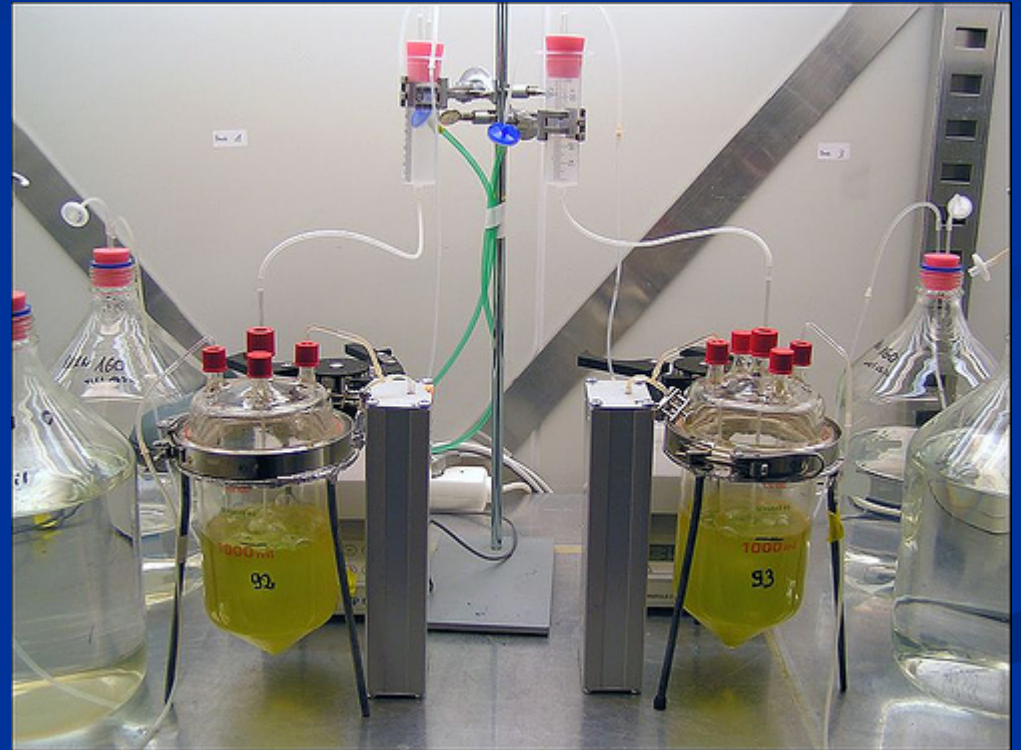
Sinh trưởng của vi khuẩn trong quá trình nuôi cấy liên tục

- Là một quá trình duy trì pha log trong những điều kiện ổn định
- Trong phòng TN thì cấy chuyền liên tục qua môi trường mới
- Trong sản xuất thì đưa dinh dưỡng vào liên tục và lấy sinh khối vi khuẩn ra với một lượng tương đương

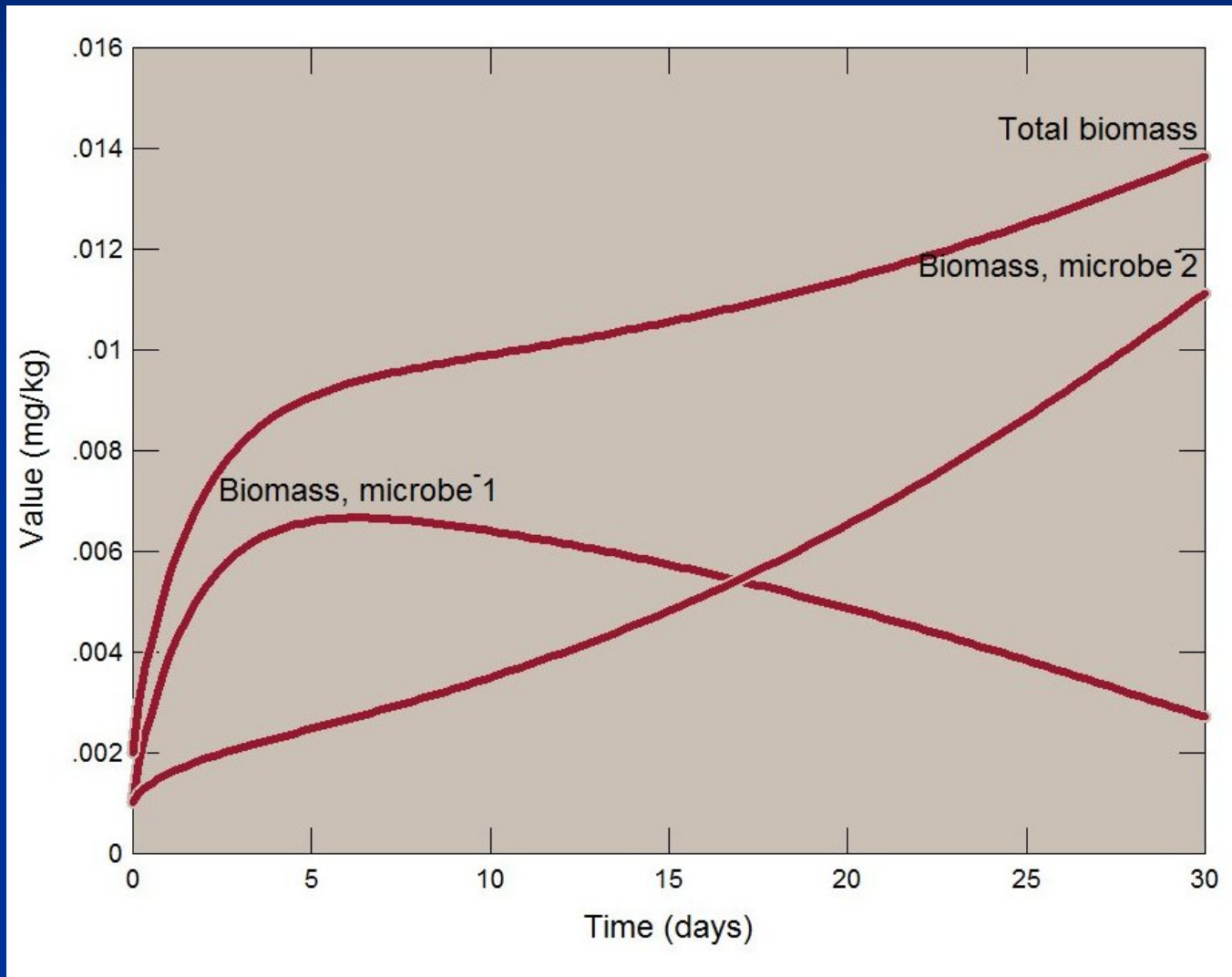
Thiết bị nuôi cấy liên tục chemostat



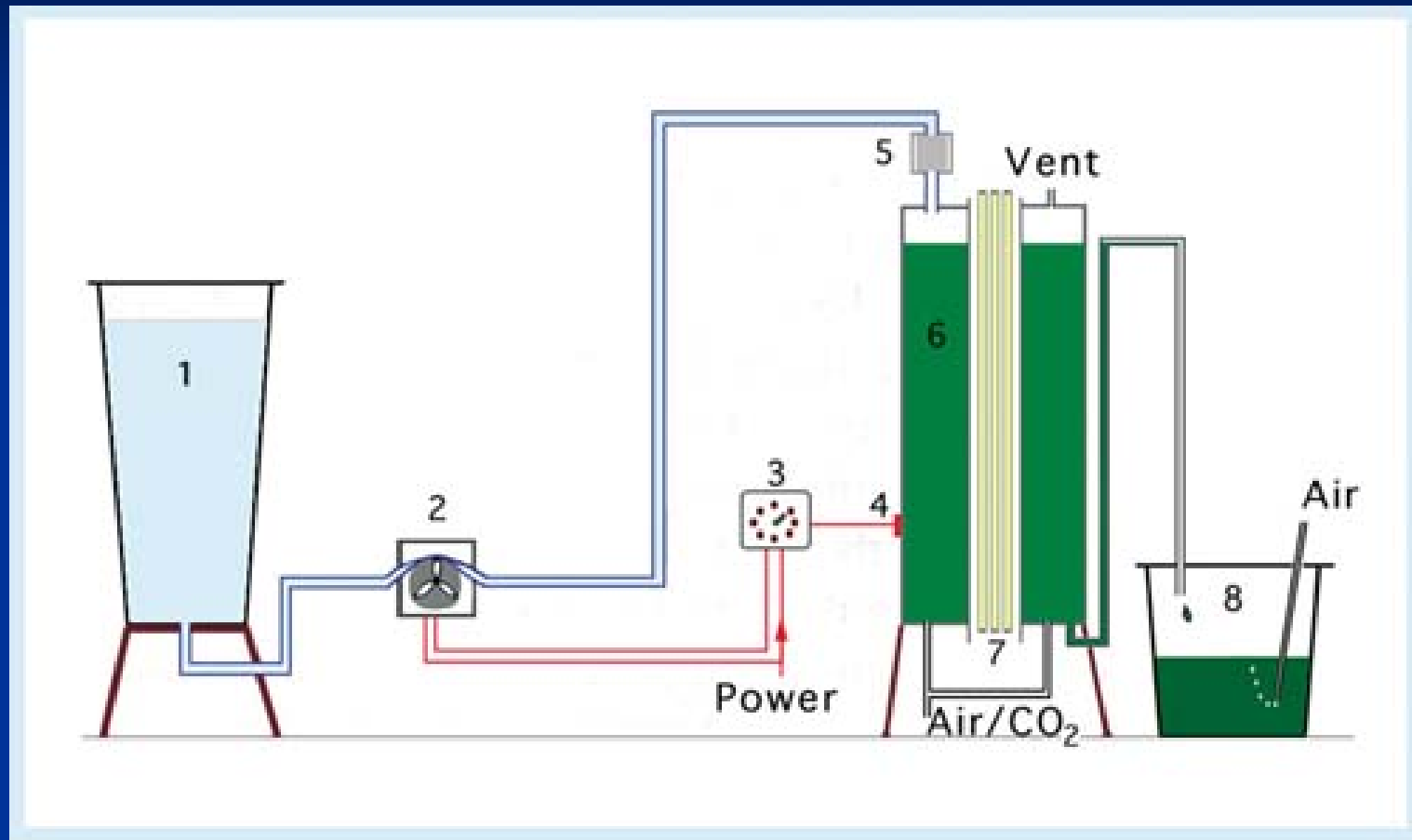
Thiết bị chemostat



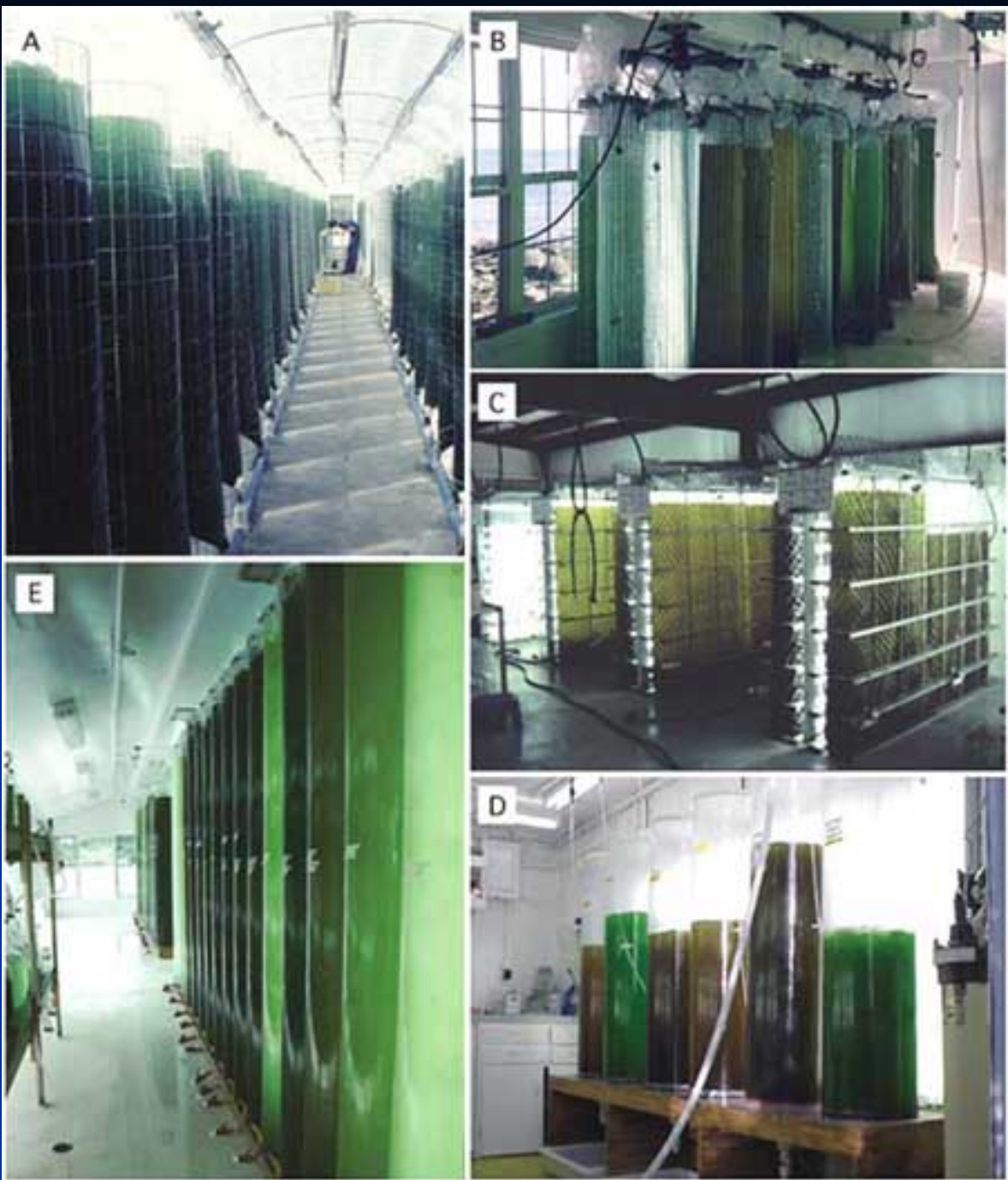
Đường con sinh trưởng trong nuôi cấy liên tục



Thiết bị nuôi cấy liên tục turbidostat

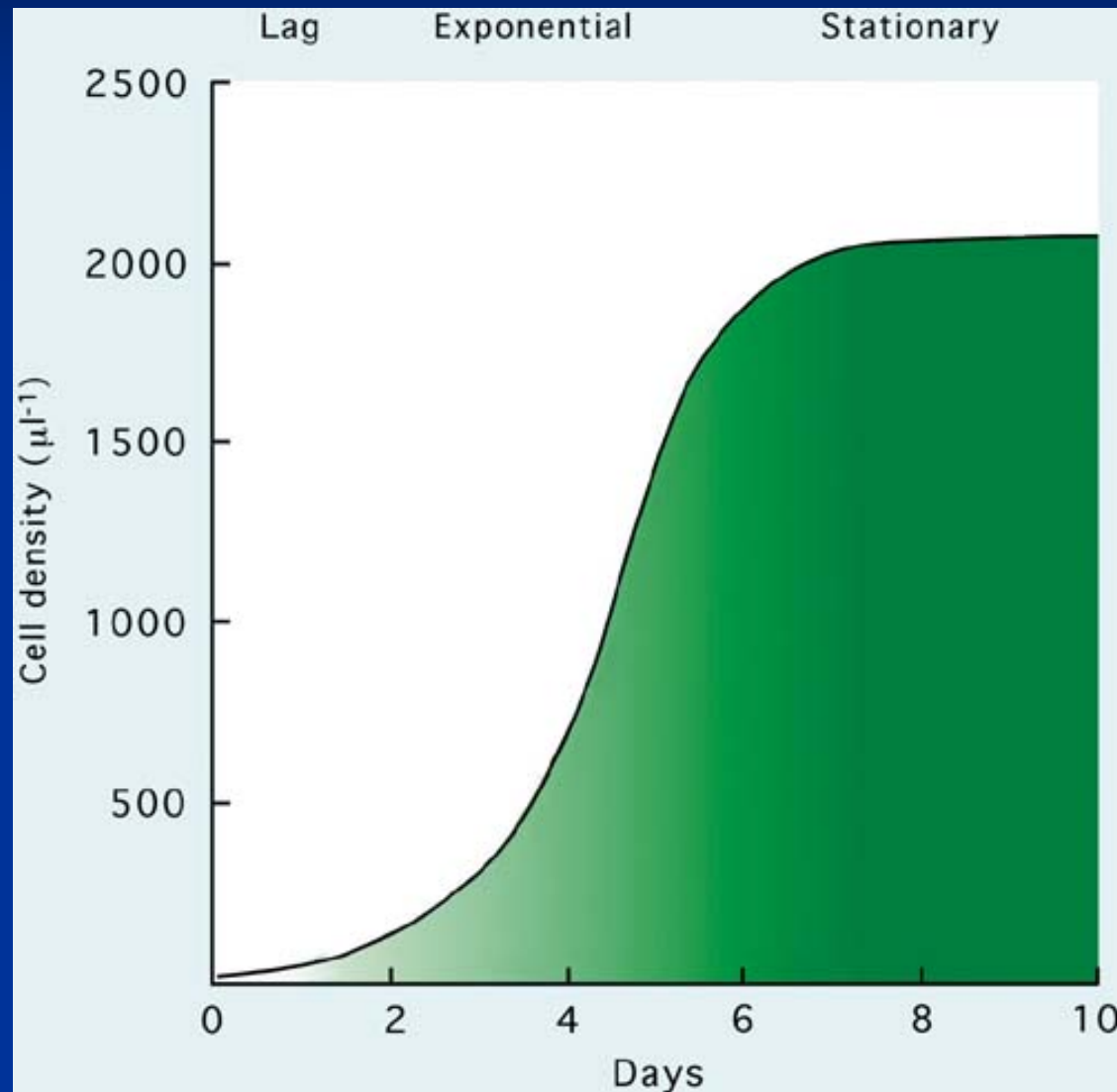


1, Dưỡng chất (200 L); 2, Bơm định lượng; 3, Bộ cảm biến (50 - 5 000 ohms); 4, Bộ bắt sáng (ORP 12); 5, Bộ lọc (0.45 μm); 6, Cột tăng sinh (80 L); 7, Đèn huỳnh quang; 8, Bể chứa tảo (125 L).



Tăng sinh tảo trong thực tế

Đường con sinh trưởng của tảo lục trong nuôi cấy liên tục



Sự khác nhau giữa nuôi cấy tĩnh và liên tục

- Hệ thống đóng
 - Tế bào trải qua các pha sinh trưởng và phát triển
 - Mỗi pha đặc trưng bởi những điều kiện nhất định
 - Khó điều khiển tự động
- Hệ thống mở
 - Thiết lập được 1 cân bằng động học, yếu tố thời gian bị loại trừ
 - Tế bào được cung cấp những điều kiện môi trường nhất định
 - Điều khiển tự động

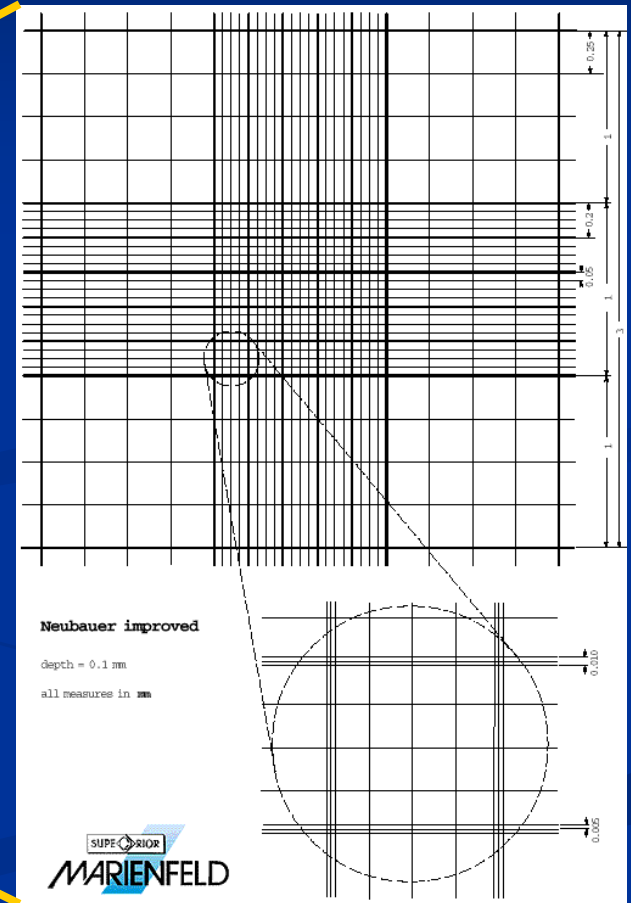
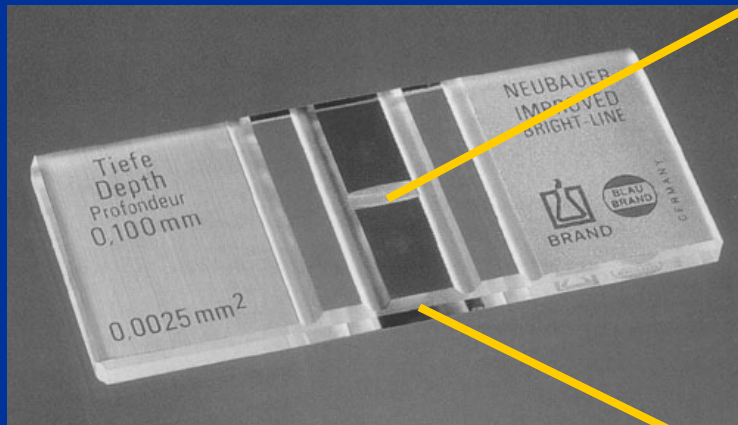
Làm đồng bộ sự phân chia tế bào

- *Gây sốc nhiệt*: hạ hoặc tăng nhiệt độ đột ngột
- *Thay đổi thành phần môi trường*: gây đó acid amin
- *Chọn lọc cơ học*: soi kính hiển vi để chọn những tế bào vừa mới sinh ra (TB nhỏ)

Các phương pháp xác định sinh trưởng của vi khuẩn

Các phương pháp xác định số lượng

➤ Đếm trực tiếp bằng buồng đếm

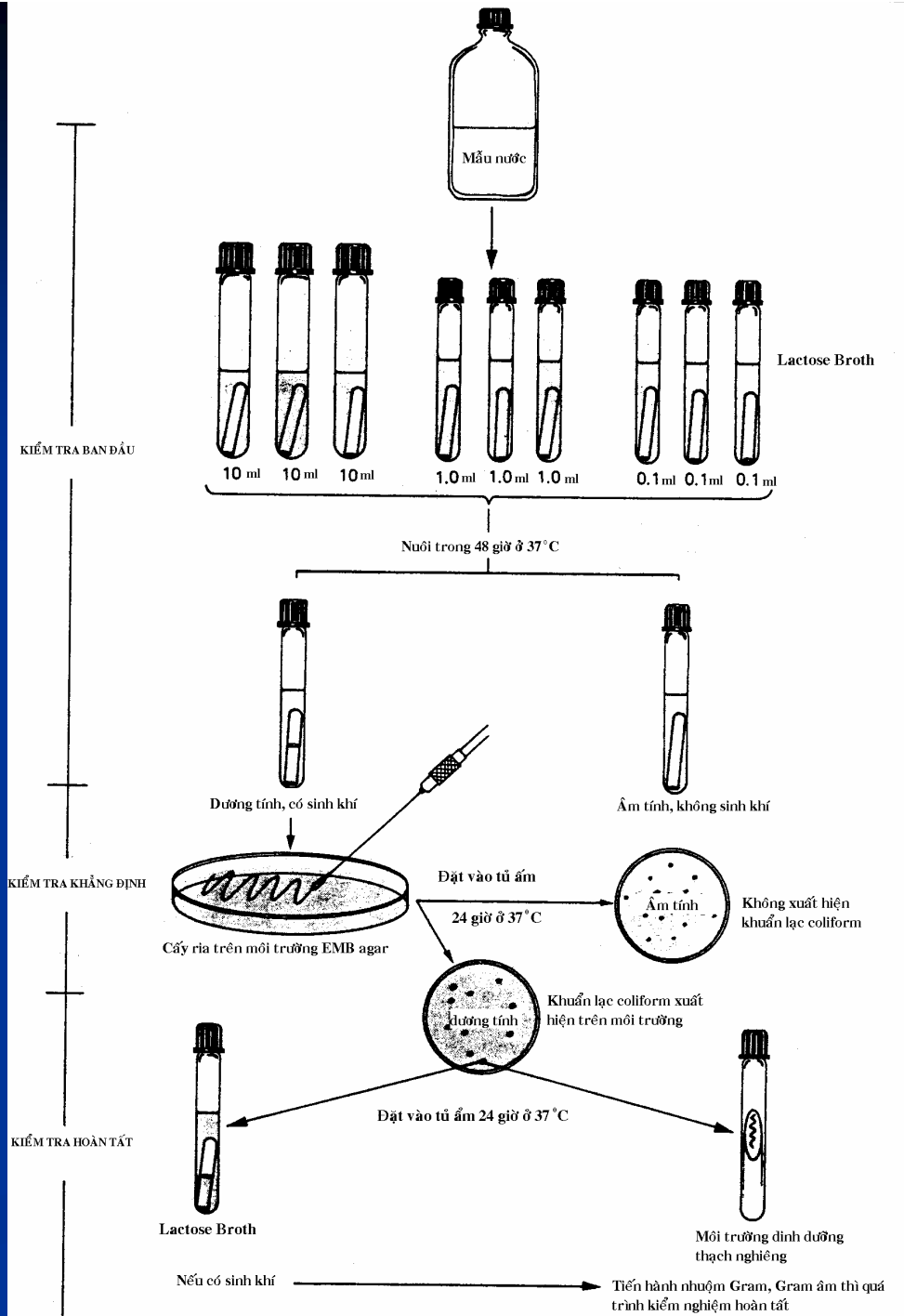


➤ Đếm tế bào tổng (sống và chết)

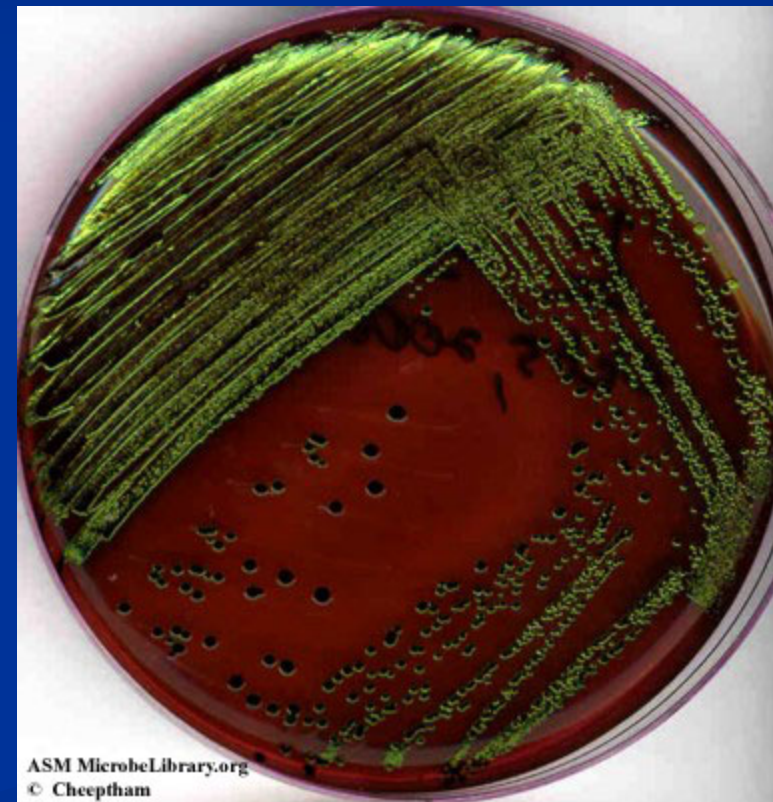
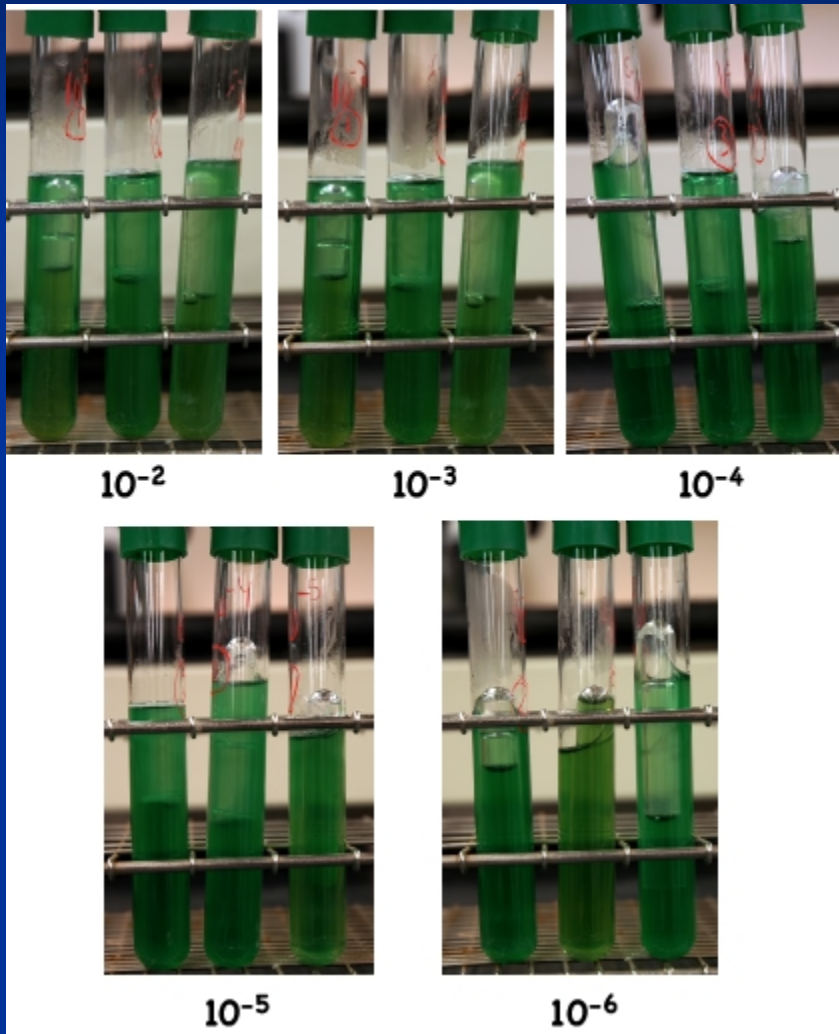
Các phương pháp xác định số lượng

- Nhuộm tế bào trước khi đếm: Sự bắt /không bắt màu của tế bào sống/chết; hoặc bắt các màu khác nhau
- Nuôi cấy và đếm khuẩn lạc tế bào sống
- Nếu vi khuẩn khó tạo khuẩn lạc thì dùng phương pháp *số lượng khả năng nhất*
- Lọc qua màng vi lọc, cho vào MT dinh dưỡng, kiểm tra khuẩn lạc

Phương pháp xác định số lượng E. coli



Phương pháp xác định số lượng E. coli



Các phương pháp xác sinh khối

Phương pháp trực tiếp

- Xác định sinh khối tươi hoặc khô (kém chính xác)
- Xác định hàm lượng nitrogen tổng, NH_3 , hay carbon tổng (có độ chính xác cao)
- Xác định hàm lượng protein của vi khuẩn

Các phương pháp xác sinh khối

Phương pháp gián tiếp

- Đo độ đục của dịch treo tế bào
 - Lập đường chuẩn
 - Giá trị OD phụ thuộc vào giai đoạn phát triển của vi khuẩn
- Đo chỉ số cường độ trao đổi chất như hấp thu O_2 , tạo thành CO_2 hay acid.

Tác dụng của các yếu tố bên ngoài lên sinh trưởng và phát triển của vi khuẩn

Ngưỡng tác dụng

- *Tối thiểu*: vi khuẩn bắt đầu sinh trưởng và mở đầu các quá trình trao đổi chất
- *Tối thích*: vi khuẩn sinh trưởng, phát triển cực đại
- *Cực đại*: ngừng sinh trưởng và thường chết

Các yếu tố tác dụng

- *Yếu tố vật lý*: nhiệt độ, độ ẩm
- *Yếu tố hóa học*: pH, thế oxy hóa khử
- *Yếu tố sinh học*: kháng sinh

Cơ chế tác dụng

- *Phá hủy tế bào*: một số chất như lizozyme có khả năng phân hủy thành tế bào; penicillin phá hủy màng tế bào
- *Thay đổi tính thấm của màng tế bào*: các chất có tính oxi hóa cao như H_2O_2 , halogen, rượu, phenol, triton...
- *Thay đổi đặc tính keo của NSC*: nhiệt độ cao làm biến tính protein

Cơ chế tác dụng

- *Kìm hãm hoạt tính*: kìm hãm hoạt tính của enzyme, gây tổn hại đến quá trình trao đổi chất
- *Hủy hoại các quá trình tổng hợp*: làm bất hoạt enzyme trao đổi chất bằng cách gắn vào các trung tâm hoạt động

Các yếu tố vật lý

- *Độ ẩm*: thiếu nước sẽ làm chậm hoặc mất quá trình trao đổi chất, gây nên sự chết của tế bào
- *Nhiệt độ*: nhiệt độ thấp làm giảm quá trình trao đổi chất, nhiệt độ cao gây biến tính protein
- *Âm thanh*: sóng siêu âm ảnh hưởng lớn đến sinh trưởng của vi khuẩn

Các yếu tố vật lý

- *Sức căng bề mặt*: sức căng bề mặt thấp làm cho NSC tách ra khỏi tế bào
- *Các tia bức xạ*: gây nên những biến đổi hóa học của các phân tử protein, DNA
- *Ánh sáng mặt trời*: tia tử ngoại gây đột biến hoặc gây chết tế bào

Các yếu tố hóa học

- *pH môi trường*: sức căng bề mặt thấp làm cho NSC tách ra khỏi tế bào
- *Thế oxi hóa khử*: thể hiện mức độ thoáng khí của môi trường, liên quan đến *Oxy* (có vai trò rất lớn đối với vi khuẩn)
- *Các chất diệt khuẩn*
- *Các chất hóa trị liệu*

Các yếu tố sinh học

- *Kháng thể*: là các phân tử *immunoglobulin*, giúp hệ miễn dịch nhận biết và vô hiệu hóa các tác nhân lạ
- *Kháng sinh*: là chất tiêu diệt hay kìm hãm sự phát triển của vi khuẩn, như *penicillin*

