



Sự sinh trưởng của vi sinh vật trong môi trường tự nhiên

Bởi:

Nguyễn Lâm Dũng

buivietha

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 oxygene, 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 gene liên quan đến trao đổi chất, trừ việc duy trì “gene 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 sulfur 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.

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 signe)

Từ đó, nhiều nhà nghiên cứu phát triển các phương pháp hiển vi miễn 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.

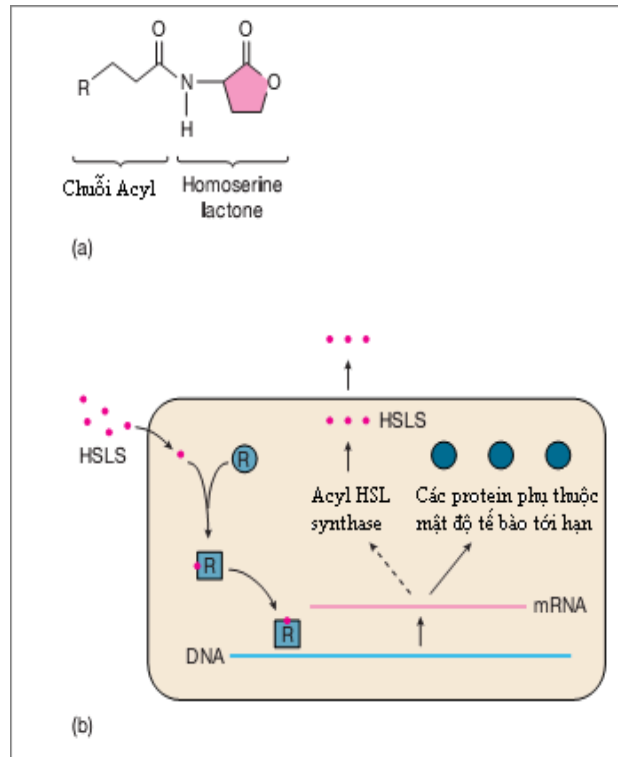
Tình trạng một quần thể hỗn hợp trong môi trường thiên nhiên là rất phức tạp. Thông thường chỉ có khoảng 1-10% các tế bào là có thể hình thành khuẩn lạc. Trong tương lai có thể phải tìm ra các môi trường nuôi cấy thích hợp hơn đối với các vi sinh vật còn chưa được biết đến. Hiện nay người ta đã sử dụng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

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 gọi 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 gene 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 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.

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 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 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 DNA

và kích thích sự phiên mã của các gene nhạy cảm với nồng độ tế bào tới hạn. Các gene 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.

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 DNA (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 γ -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 *Burkholderia cepacia*.

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 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*).