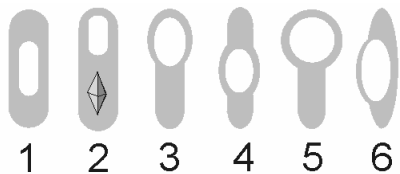


CÁCH NHUỘM NỘI BÀO TỬ CỦA VI KHUẨN

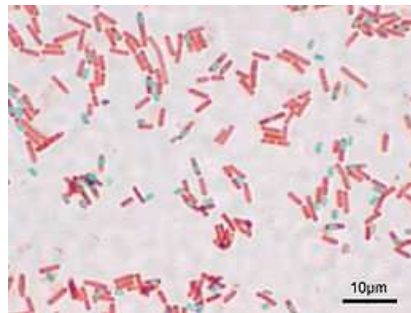
PGS.TS.Biễn Văn Minh
Trường ĐHSP – Đại học Huế

Nhiều loài vi khuẩn thuộc các giống *Bacillus*, *Clostridium*, *Desulfotomaculum*, *Sporosarcina*, *Sporolactobacillus*, *Thermoactinomyces*... có khả năng hình thành một cấu trúc nghỉ được gọi là nội bào tử hay nha bào. Mỗi tế bào vi khuẩn làm phát sinh một nội bào tử. Bào tử có thể nằm ở giữa, ở đầu nút hoặc gần đầu nút tùy theo loài (hình 1). Vì phải chịu đựng điều kiện không thuận lợi bên ngoài nên bào tử góp phần quan trọng trong khả năng lây bệnh của trực khuẩn hiếu khí tạo bào tử như trực khuẩn than hoặc trực khuẩn kỵ khí tạo bào tử như *Clostridia*, nhất là trực khuẩn uốn ván, hoại thư, sinh hơi, ngộ độc thịt.

Hiện nay có nhiều phương pháp phát hiện và quan sát bào tử. Trong bài viết này, chúng tôi muốn trao đổi cách phát hiện bào tử trong tế bào sống và phương pháp nhuộm màu để quan sát nội bào tử của vi khuẩn.



Hình 1: Vị trí và hình thái của nội bào tử (1, 2: Bào tử không làm biến dạng tế bào nằm chính tâm hay lệch tâm; 3-6: Bào tử làm biến dạng tế bào ở một đầu, ở chính tâm, nằm lệch tâm hay một bên).



Hình 2: *Bacillus subtilis* nhìn dưới kính hiển vi quang học (x100) bào tử bắt màu xanh, tế bào chất bắt màu đỏ hồng.

1. Chuẩn bị

a. Dụng cụ, thiết bị

- Phiến kính (*slide*), kính hiển vi quang học nền sáng, dầu soi kính.
- Đèn cồn, nước cất, que cấy đầu vòng, giấy lọc, cốc bese 500ml, giá đỡ, chậu rửa, bếp điện.

b. Vật liệu, hoá chất

- *Mẫu giống*: Các loài vi khuẩn: *Bacillus subtilis*; *Clostridium pasteurianum* đã nuôi cấy 2 tuần tuổi trên ống thạch nghiêng; hoặc mẫu sinh thiết bị nghi ngờ nhiễm vi khuẩn có nội bào tử.

- *Thuốc nhuộm*:

+ Dung dịch lục malachite ($C_{23}H_{25}N_2Cl$) 5%. Hòa tan malachite vào cồn 95⁰, khuấy cho tan, sau đó đổ thuốc nhuộm vào lọ thủy tinh màu tối có nút mài.

+ Dung dịch safranin O ($C_{20}H_{19}N_4Cl = 350,80$) 2,5%, trước khi dùng pha với nước cất theo tỷ lệ 1:5 (vol/vol) để có dung dịch 0,5%. Hoặc chuẩn bị sẵn dung dịch Fuchsin ziehl: fuchsin kiềm ($C_{19}H_{18}N_3Cl = 323,82$) 1g, phenol 5g, ethanol, 90% 10 ml, nước cất 200 ml (hòa tan fuchsin với ethanol; hòa tan phenol với nước cất sau đó trộn lại).

2. Nguyên tắc nhuộm

Khi dùng thuốc nhuộm có hoạt tính mạnh lục malachite với tiêu bản có đun nóng, thuốc nhuộm xâm nhập vào nội bào tử và làm chúng nhuộm màu lục. Khi rửa vết bôi bằng nước cất

các tế bào dinh dưỡng sẽ bị mất màu còn bào tử vẫn giữ lại màu lục. Khi nhuộm bổ sung bằng đỏ safranin hay fuchsin sẽ làm phần bao quanh bào tử bắt màu phân biệt (màu đỏ hồng).

3. Phương pháp phát hiện và quan sát bào tử

a. Phát hiện bào tử trong tế bào sống

- Làm tiêu bản giọt ép với vi khuẩn *Bacillus subtilis* hay *Clostridium pasteurianum*.
- Quan sát: Bào tử có độ chiết quang cao, vì vậy khi nhìn dưới kính hiển vi nội bào tử có hình cầu hay hình trái xoan, sáng hơn các phần xung quanh.

b. Quan sát bào tử bằng phương pháp nhuộm kép

Hiện nay có nhiều phương pháp nhuộm bào tử như phương pháp của Schaefera và Fulton, M.A. Peskov hoặc phương pháp Ziehl do Muller cải tiến...

Theo chúng tôi có thể sử dụng phương pháp Schaefera và Fulton cải tiến theo các bước sau:

Bước một: Làm vết bôi và cố định tiêu bản

- Dùng que cấy vô trùng lấy một ít vi khuẩn từ ống giống thạch nghiêng (hoặc mẫu sinh thiết bị nghi ngờ nhiễm khuẩn) hoà vào 1 giọt nước cất ở giữa phiến kính, làm khô trong không khí, hơ nhanh vết bôi trên ngọn lửa đèn cồn 2-3 lần để gắn chặt vi khuẩn vào phiến kính.
- Cố định vết bôi bằng cách nhỏ lên vết bôi 1-2 giọt cồn 95⁰. Đốt cháy và dập tắt ngay khoảng 10 giây.
- Đặt tiêu bản lên trên giá đỡ, giá đỡ đặt trên cốc bese có chứa một ít nước đang đun nóng 85-90⁰C (không để cho sôi) trên bếp.

Bước hai: Tiến hành nhuộm tiêu bản

- 1) Đặt miếng giấy lọc lên trên vết bôi.
- 2) Nhỏ 2-3 giọt dung dịch lục malachite 5% lên vết bôi và tiến hành hơ hơi nước nóng trong 5-10 phút. Nếu thấy thuốc nhuộm trên giấy bị khô thì phải bổ sung.
- 3) Rửa vết bôi bằng nước cất trong 30 giây (lúc đó các tế bào dinh dưỡng sẽ bị mất màu còn bào tử vẫn giữ lại màu).
- 4) Đặt tiêu bản lên giá đỡ, giá được đặt trên chậu rửa.
- 5) Đặt giấy lọc lên trên vết bôi.
- 6) Nhỏ 2-3 giọt dung dịch safranin hay fuchsin lên trên miếng giấy lọc, để 30 giây.
- 7) Rửa nước rồi thấm khô hay để khô tự nhiên vết bôi.

Bước ba: Quan sát tiêu bản trên kính hiển vi quang học với vật kính dầu (x100).

Kết quả: Tiêu bản nhuộm đúng thì bào tử sẽ bắt màu xanh lục, tế bào chất bắt màu đỏ hồng.

***Lưu ý:** Để dễ dàng quan sát được bào tử nên cấy các vi khuẩn trên môi trường dinh dưỡng chứa 0,005% $MnCl_2$ (5mg/l) trước 2 tuần trên môi trường thạch nghiêng. Có thể thay thế dung dịch lục malachite 5% bằng dung dịch xanh methylen 6%.

4. Sơ lược về nội bào tử của vi khuẩn

Không phải mọi vi khuẩn đều có bào tử. Nội bào tử thường gặp ở các vi khuẩn thuộc họ *Bacillaceae* được tạo ra để giúp vi khuẩn chống chịu tốt hơn trước những tác nhân bất lợi của môi trường ngoài như tia tử ngoại, tia gama, chất sát trùng, nhiệt độ môi trường quá cao, môi trường thiếu dinh dưỡng hay sự khô cạn... Bào tử được hình thành ngay trong tế bào dinh dưỡng, mỗi tế bào dinh dưỡng chỉ tạo ra một bào tử và không có chức năng sinh sản như bào tử

nấm. Khi vi khuẩn đã hình thành bào tử thì cũng là lúc nó chuyển sang trạng thái sống ẩn, đây là trạng thái gần như không hoạt động của tế bào.

Thời gian tồn tại của bào tử kéo dài: có thể là vài năm, vài chục năm và thậm chí vài trăm năm. Khi gặp điều kiện thuận lợi bào tử sẽ nảy mầm và chuyển thành tế bào dinh dưỡng. Còn nếu bào tử bị vỡ cấu trúc thì lúc đó vi khuẩn sẽ chết.

Trong cấu trúc của một nội bào tử, áo bào tử và vỏ bào tử đóng vai trò quan trọng trong việc bảo vệ lõi bào tử. Áo bào tử có cấu tạo protein sừng, không thấm nước, có khả năng chống chịu cao với các tác nhân như lysozyme, protease, chất hóa học, tia bức xạ... Vỏ bào tử chủ yếu được cấu tạo từ peptidoglycan, ít liên kết chéo, đặc biệt bên trong vỏ chứa nhiều phân tử calcium dipicolinate (DPA-Ca) và cũng chính nhờ có Ca^{2+} mà lớp vỏ trở nên chắc cứng.

Trái ngược với lớp áo bào tử, vỏ bào tử có tính thấm thấu rất cao và điều đó làm cho nước trong lõi bị rút ra bên ngoài vỏ, lượng nước của nó có thể lên đến 70% (trong khi đó tế bào dinh dưỡng chỉ chứa 80%), sự loại nước như là yếu tố quan trọng cho tính kháng nhiệt, kháng bức xạ và cao hơn hết là để ức chế hoạt động của enzyme ở bên trong lõi. Mặc dù sự hiện diện của Ca^{2+} ở vỏ không có chức năng kháng nhiệt nhưng sự có mặt của nó ở trong lõi rất quan trọng. Nó sẽ liên kết với ADN làm cho cấu trúc ADN trở nên bền hơn trước những tác động bất lợi từ bên ngoài.

5. Giải thích tính bất màu của nội bào tử

Do tính không thấm thấu của áo bào tử nên với những phương pháp nhuộm thông thường không làm cho bào tử bắt màu. Bào tử có đặc điểm là khó bắt màu hơn tế bào dinh dưỡng, song khi bắt màu rồi thì lại rất khó bị tẩy màu, trong khi đó tế bào dinh dưỡng bị tẩy màu nhanh chóng. Để bào tử có thể bắt màu thuốc nhuộm, ta cần hoạt hóa nó bằng tác nhân nhiệt độ cao hay kết hợp acid với nhiệt. Việc hoạt hóa sẽ kích thích bào tử nảy mầm và khi bào tử ở trạng thái nảy mầm thì thuốc nhuộm sẽ dễ dàng xâm nhập vào bên trong lõi dẫn đến bào tử bắt màu. Điều này được giải thích bằng cơ chế: Khi hoạt hóa bằng nhiệt thì nhiệt độ sẽ làm cho protein áo bào tử bị biến tính dẫn đến cấu trúc áo trở nên xốp hơn, tính thấm tăng và đồng thời cũng xúc tiến hoạt động thủy phân của protease tại đây. Kết quả là lượng protein giảm, cấu trúc áo trở nên lỏng lẻo tạo điều kiện cho nước và thuốc nhuộm thấm vào vỏ bào tử, làm cho vỏ bào tử trương phồng. Sự trương phồng sẽ làm cho lớp peptidoglycan bị vỡ cấu trúc tạo điều kiện cho nước và thuốc nhuộm thấm vào trong lõi. ■

Tài liệu tham khảo

1. Nguyễn Thành Đạt (2000), *Thực hành vi sinh vật học*, NXB GD Hà Nội.
2. Lansing M. Prescott, John P. Harley, Donal A. Klein (2005), *Microbiology*. Mc Graw Hill.
3. <http://www.google.com.vn/search?num=>.