

CÁCH NHUỘM GRAM

TRONG DẠY THỰC HÀNH SINH HỌC Ở TRƯỜNG THPT

■ PGS. TS Biền Văn Minh

Trường ĐHSP - Đại học Huế

Nhuộm Gram là một phương pháp thực nghiệm nhằm phân biệt các loài vi khuẩn thành 2 nhóm Gram dương (Gram positive) và Gram âm (Gram negative) dựa trên các đặc tính hoá lý của thành tế bào. Phương pháp này được đặt tên theo người phát minh ra nó, nhà khoa học người Đan Mạch Hans Christian Gram (1853 -1938). Ông phát triển kỹ thuật này vào năm 1884, về sau được Hucker và nhiều người khác cải tiến.

Trong bài viết này chúng tôi muốn giới thiệu về cách nhuộm Gram vi khuẩn trong dạy thực hành sinh học ở trường THPT.

1. Chuẩn bị

a. Dụng cụ, thiết bị: Kính hiển vi, que cấy đầu tròn, đèn cồn, diêm, phiến kính (*slide*), chậu rửa, bình xịt nước cất và các dụng cụ cần thiết.

b. Vật liệu, hoá chất:

(1) Các loài vi khuẩn và dịch huyền phù các vi khuẩn này. Vi khuẩn Gram âm: *E.coli*, *Rhizobium leguminosarum*; Gram dương: *Streptococcus lactis*, *Bacillus subtilis*; dịch cơ thể hoặc mẫu sinh thiết bị nghi ngờ nhiễm khuẩn.

(2) Dung dịch tím kết tinh (crystal violet - $C_{25}H_{30}N_3Cl \cdot 9H_2O = 570,11$): 2g tím kết tinh hoà tan trong 20 ml ethanol 95%; 0,8 g ammon oxalat hoà tan trong 80 ml nước cất. Trộn hai dịch nói trên lại với nhau, giữ 48 giờ rồi lọc. Bảo quản trong lọ tối, sử dụng trong vài tháng.

(3) Dung dịch Iod (Iodine): Hoà tan 1g Iod trong 3-5 ml nước cất, thêm 2g KI (Kali iodide), khuấy cho tan hết, thêm nước cất cho đủ 300 ml. Bảo quản trong lọ tối.

(4) Dung dịch tẩy màu: Ethanol 95% hoặc trộn hỗn hợp 70 ml ethanol 95% với 30 ml acetone.

(5) Dung dịch nhuộm bổ sung: Chuẩn bị sẵn 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).

3. Các bước tiến hành

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 dịch cơ thể 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 95°. Đốt cháy và dập tắt ngay khoảng 10 giây. Cố định vết bôi nhằm 3 mục đích: giết chết vi khuẩn, gắn chặt vi khuẩn

vào phiến kính và làm vết bôi bắt màu tốt hơn vì các tế bào chết bắt màu tốt hơn các tế bào sống.

Bước hai, nhuộm màu:

-*Thứ nhất*, Nhuộm bằng dung dịch tím kết tinh trong 30 giây đến 1 phút, rửa nước;

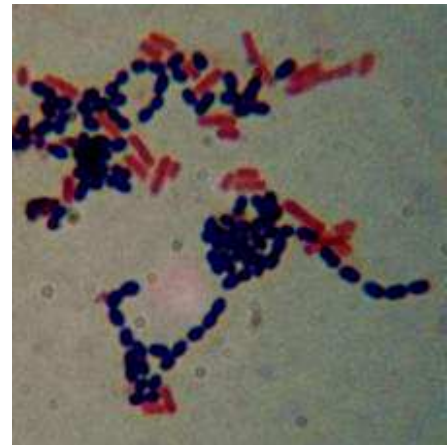
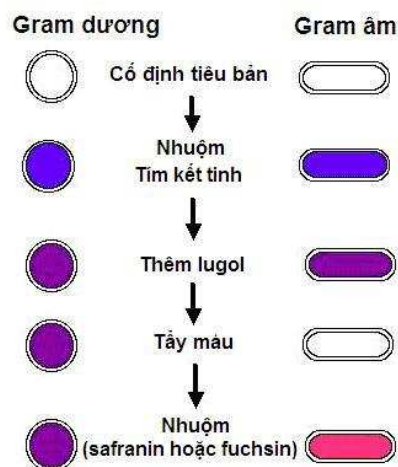
Thứ hai, nhuộm thêm dung dịch lugol và giữ trong 1 phút, rửa nước;

Thứ ba, nhỏ dịch tẩy màu, giữ khoảng 30 giây (cho đến khi vừa thấy mất màu), rửa nước;

Thứ tư, nhuộm tiếp bằng dung dịch safranin hoặc fuchsin trong 1 phút, rửa nước, để khô. Lần nhuộm này cả hai nhóm vi khuẩn đều bắt giữ thuốc nhuộm, nhưng vi khuẩn Gram dương không bị thay đổi màu nhiều, trong khi vi khuẩn Gram âm trở nên đỏ vàng (nhuộm safranin) hay đỏ tía (fuchsin).



Hans Christian Gram (1853-1938)

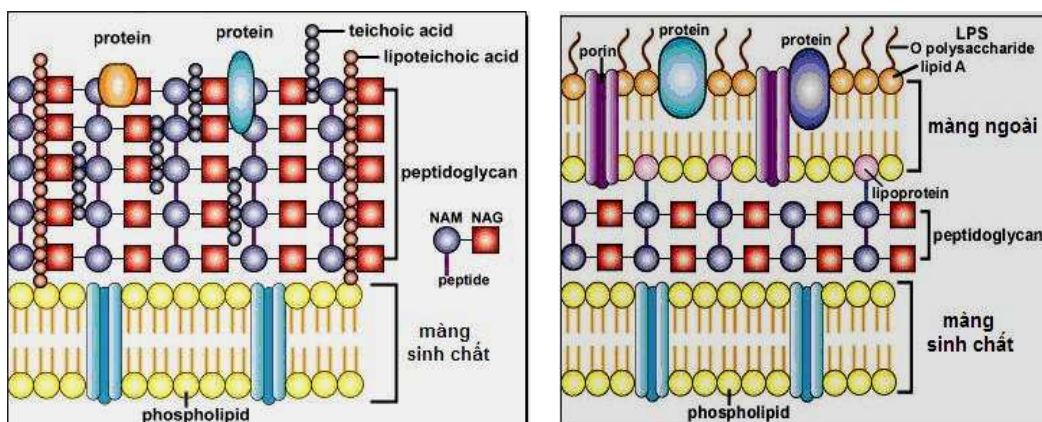


Hình 1. Các bước nhuộm Gram và ví dụ minh họa kết quả

**Kết quả*: quan sát ở vật kính dầu 100x. Nếu nhuộm đúng vi khuẩn Gram dương bắt màu xanh đen hay tím, Gram âm bắt màu đỏ vàng (nhuộm safranin) hay đỏ tía (fuchsin).

4. Giải thích tính bắt màu Gram của vi khuẩn

Nhiều ý kiến cho rằng sự bắt màu Gram khác nhau ở vi khuẩn Gram dương và Gram âm là do tính thấm thấu khác nhau đối với ethanol của hai nhóm vi khuẩn đó. Nếu dùng lysozyme biến đổi vi khuẩn Gram dương thành protoplast không có vách thì protoplast lại bắt màu Gram âm.



Hình 2. Sơ đồ minh họa thành tế bào vi khuẩn Gram dương (trái) và Gram âm (phải)

Vi khuẩn Gram dương có thành tế bào dày từ 15 đến 50 nm, dạng lưới, cấu tạo bởi peptidoglycan. Chất này có khả năng giữ phức hợp tím kết tinh - lugol. Trong khi đó, lớp thành tế bào peptidoglycan của các vi khuẩn Gram âm thì mỏng hơn và thường có thêm lớp màng lipopolysaccharide (LPS) bên ngoài.

Sau khi nhuộm với phức hợp tím kết tinh - lugol, mẫu được xử lí tiếp với hỗn hợp khử màu, làm mất nước của các lớp peptidoglycan trong thành tế bào Gram dương, từ đó làm giảm khoảng trống giữa các phân tử và khiến thành tế bào bắt giữ phức hợp tím kết tinh – lugol bên trong tế bào.

Đối với vi khuẩn Gram âm, hỗn hợp khử màu đóng vai trò là chất hoà tan lipid và làm tan màng ngoài của thành tế bào. Lớp peptidoglycan mỏng (chỉ khoảng 10 nm) không thể giữ lại phức hợp tím kết tinh – lugol và tế bào Gram âm bị khử màu và bắt màu thuốc nhuộm bổ sung.

***Câu hỏi:**

1) Sau khi nhuộm, vi khuẩn Gram dương có màu xanh đen hay tím, Gram âm có màu đỏ vàng hay đỏ tía. Giải thích nguyên nhân.

2) Nếu không nhuộm bổ sung thuốc nhuộm safranin hoặc fuchsin, vi khuẩn Gram âm có màu gì? Tại sao?

5. Những điểm cần chú ý

- Tuổi của giống: cần chuẩn bị ống giống trước khi nhuộm từ 16 đến 24 giờ nuôi ở nhiệt độ thích hợp, vì tế bào già thường thường mất khả năng giữ màu thuốc nhuộm tím kết tinh khi tẩy bằng ethanol.

- Vở nhầy của một số vi khuẩn có ảnh hưởng đến kết quả nhuộm Gram. Để nhuộm Gram cần nuôi chúng trong các môi trường chứa ít đường để hạn chế việc hình thành vở nhầy.

- Khử màu là bước quan trọng và cần kĩ năng nhất định, vì khả năng bắt màu Gram dương không phải là "tất cả hoặc không".■

Tài liệu tham khảo

1. Vũ Thị Minh Đức (2001), *Thực tập vi sinh vật học*, NXB Đại học Quốc gia Hà Nội.
2. Lansing M. Prescott, John P. Harley, Donald A. Klein (2005), *Microbiology*. Mc Graw Hill.
3. <http://images.google.com.vn/imgres?imgurl=http>
4. http://en.wikipedia.org/wiki/Gram_staining.