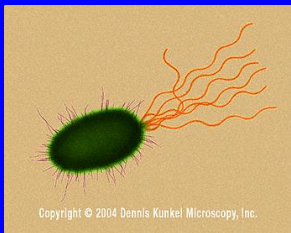


Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Εργαστήριο Μικροβιολογίας & Βιοτεχνολογίας Τροφίμων

- Χρώση Gram
- Δοκιμή καταλάσης
- Δοκιμή οξειδάσης

Όλγα Παπαδοπούλου- Πασχαλίτσα Τρυφίνοπούλου - Αναστάσιος Σταματίου



Ταξινόμηση βακτηρίων

- **Χρώση**

Η χρώση Gram ανήκει στην κατηγορία των διαφορικών (differential) χρώσεων επειδή τα κύτταρα δεν χρωματίζονται κατά τον ίδιο τρόπο.

- **Βιοχημικές δοκιμές**

Όλα τα κύτταρα χαρακτηρίζονται από τη λειτουργία της αναπνοής μέσω της οποίας διασπούν σύνθετες οργανικές ενώσεις σε απλούστερες με ταυτόχρονη παραγωγή ενέργειας.

- **Μοριακές τεχνικές**

PCR (polymerase chain reaction).

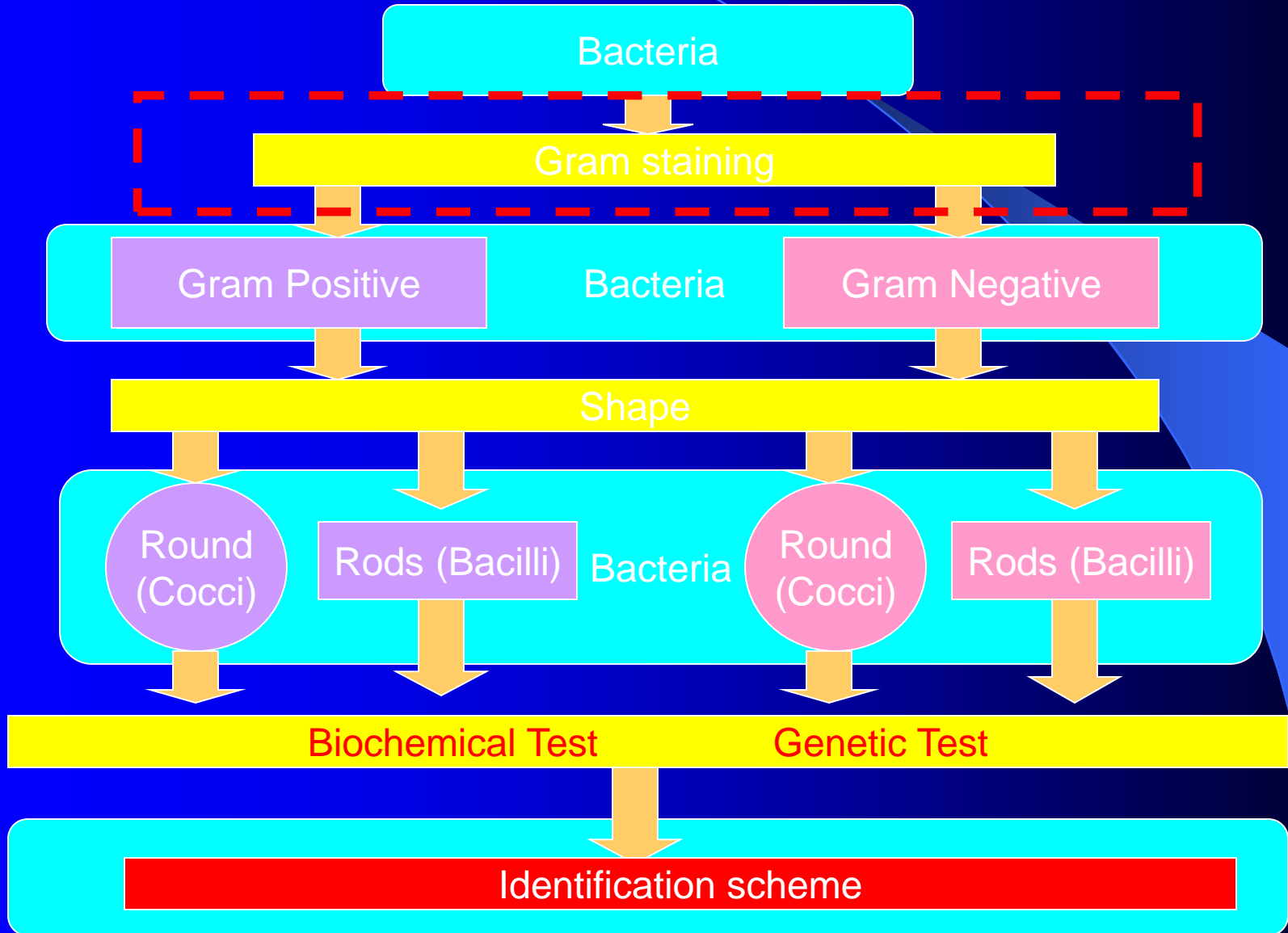
Χρωστικές

```
graph TD; A[Χρωστικές] --> B[Βασικές χρωστικές]; A --> C[Όξινες χρωστικές];
```

Βασικές χρωστικές (basic dyes), χαρακτηρίζονται από θετικό φορτίο (+) και δεσμεύονται ηλεκτροστατικά με αρνητικά φορτισμένα μόρια, όπως οι πολυσακχαρίτες, οι πρωτεΐνες και τα νουκλειικά οξέα. Στην κατηγορία αυτή ανήκουν το κρυσταλλικό ιώδες, η σαφρανίνη, το κυανούν του μεθυλενίου.

Όξινες χρωστικές (acid stains), χαρακτηρίζονται από αρνητικό φορτίο (-) και δεσμεύονται από θετικά φορτισμένα μόρια. Χρησιμοποιούνται λιγότερο συχνά και σε ειδικές περιπτώσεις. Στην κατηγορία αυτή ανήκει η carbolfuchin.

Χρώση Gram



Χρώση Gram - Αντιδραστήρια

- Κρυσταλλικό ιώδες (Crystal violet) - Βασική χρωστική
- Διάλυμα ιωδίου (Lugol) - Στερεωτικό χρώσης
- Αλκοόλη - Αντιδραστήριο αποχρωματισμού
- Σαφρανίνη ή φουξίνη - Χρωστική αντιθέσεως

Χρώση Gram - Αντιδραστήρια

- **Διάλυμα κρυσταλλικού ιώδους**

- Κρυσταλλικό ιώδες 0,5 γραμ.
- Απιονισμένο νερό 100 ml

- **Διάλυμα Lugol**

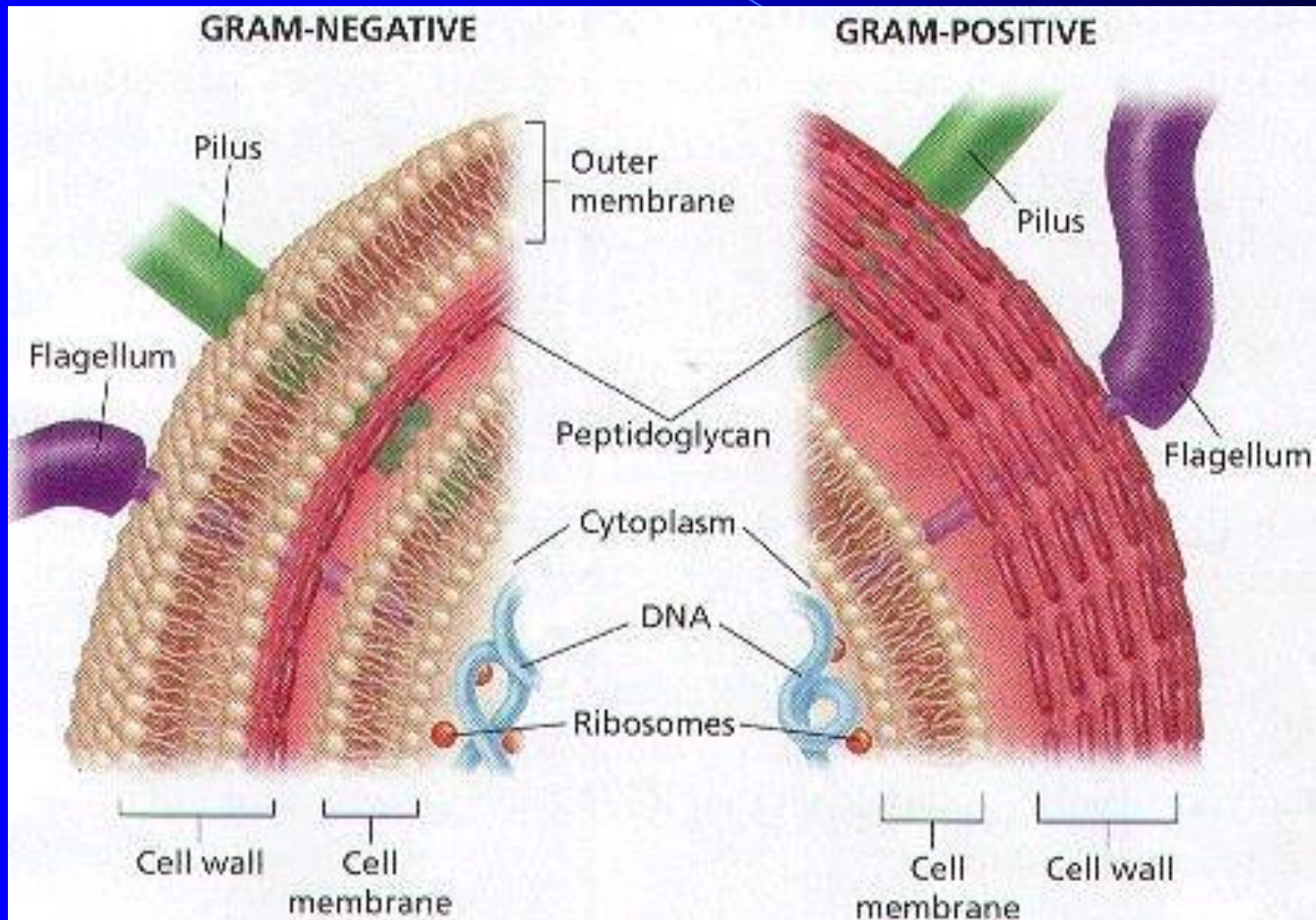
- Ιώδιο 1.0 γραμ
- Ιωδιούχο κάλι 2.0 γραμ
- Απιονισμένο νερό 300 ml

- **Αλκοόλη - 95%**

- **Διάλυμα Σαφρανίνης**

- Σαφρανίνη 0.25 γραμ
- Απιονισμένο νερό 100 ml

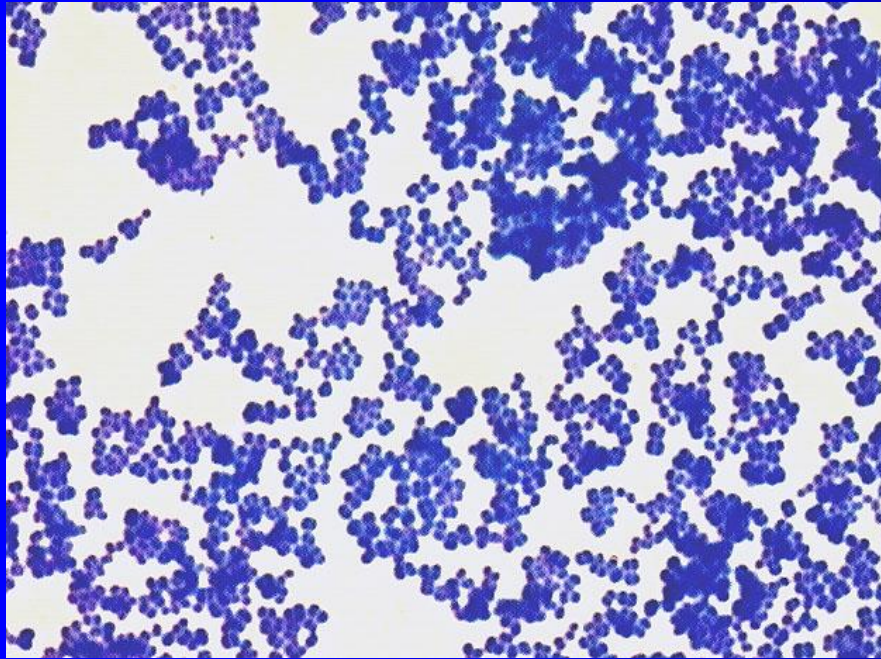
Χρώση Gram



Διαδικασία χρώσης



Διαφοροποίηση κυττάρων



Gram +

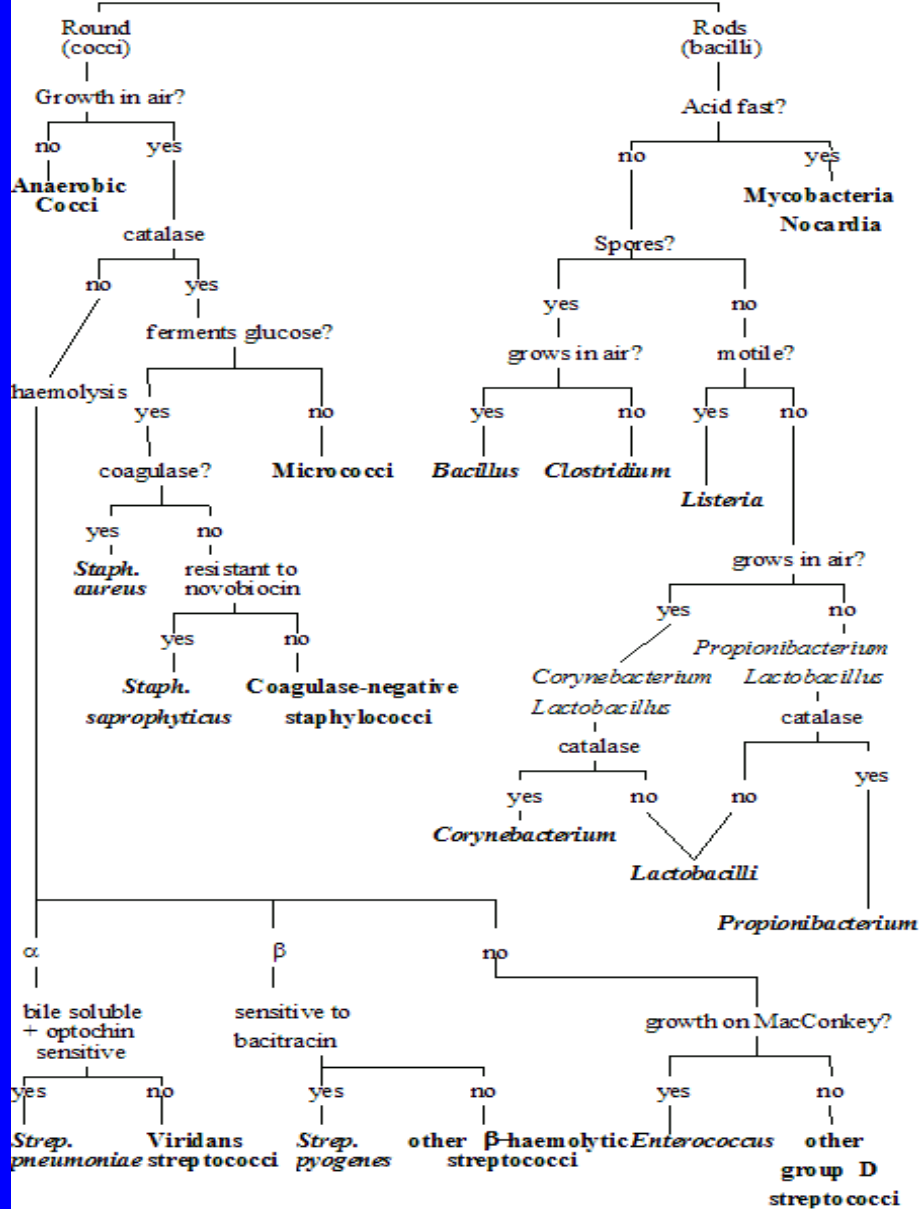


Gram -

Ταξινόμηση βακτηρίων

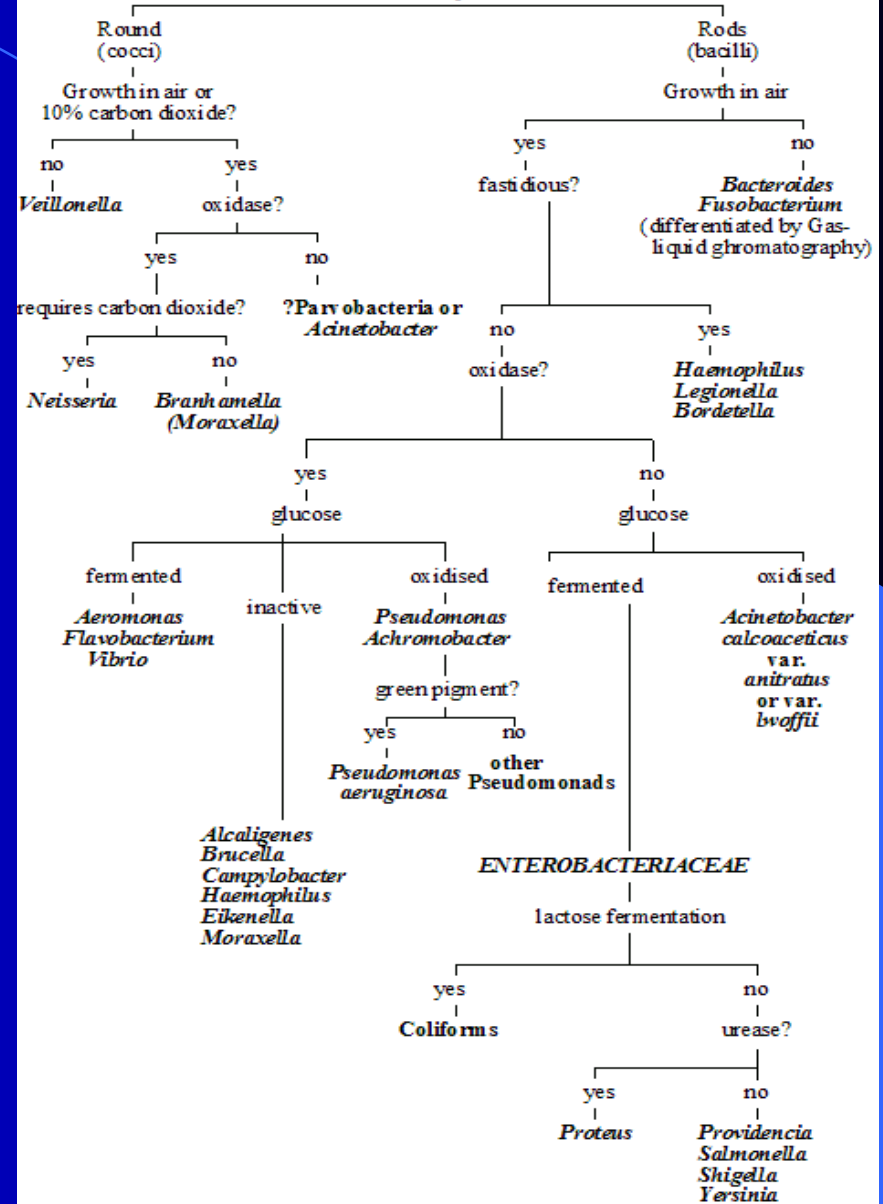
Gram Positive Bacteria

Shape



Gram Negative Bacteria

Shape



Βιοχημική ταυτοποίηση

Τα βιοχημικά τεστ αφορούν την παρουσία/απουσία συγκεκριμένων ενζύμων στο κύτταρων των μικροοργανισμών που διερευνώνται, όπως η καταλάση και η οξειδάση

Τα ένζυμα είναι απαραίτητα για τις μεταβολικές αντιδράσεις και τη λειτουργία της αναπνοής

Δοκιμή της καταλάσης

- Σκοπός είναι η ανίχνευση του ενζύμου καταλάση που καταλύει τη διάσπαση του υπεροξειδίου του υδρογόνου σε νερό και οξυγόνο.

Το υπεροξείδιο του υδρογόνου είναι τοξική μορφή οξυγόνου που παράγεται αυθόρμητα κατά την αναγωγή του O_2 προς H_2O κατά την αναπνοή.



Η παρουσία αυτού του ενζύμου βοηθάει τους μικροοργανισμούς που παράγουν καταλάση να αντιμετωπίσουν το οξειδωτικό στρες που προέρχεται από το υπεροξείδιο υδρογόνου και το οποίο μπορεί να είναι καταστροφικό για τα κύτταρα.

Δοκιμή της καταλάσης

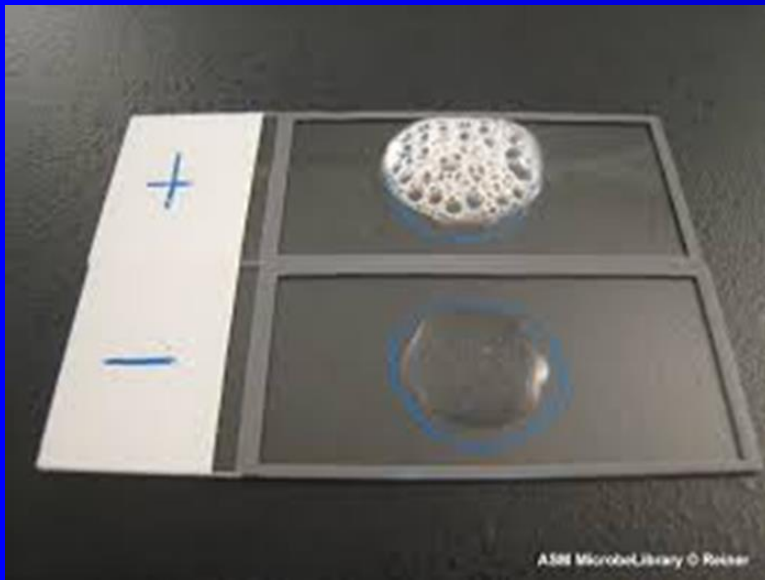
● Μέθοδος

- Σε τριβλίο ή αντικειμενοφόρο πλάκα τοποθετήστε μερικές σταγόνες H_2O_2 10%
- Κάτω από ασηπτικές συνθήκες μεταφέρετε ποσότητα κυττάρων
- Παρατηρείστε την παρουσία ή απουσία αφρισμού

Δοκιμή της καταλάσης

- **Αποτέλεσμα**

Αφρισμός: θετική αντίδραση



**Θετικοί ως προς την καταλάση είναι οι αερόβιοι
μικροοργανισμοί**

Δοκιμή της οξειδάσης

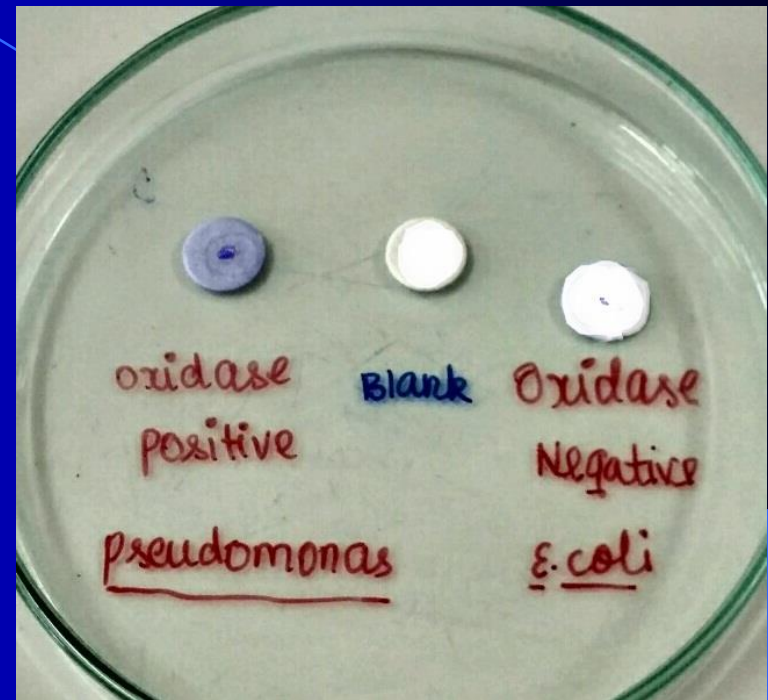
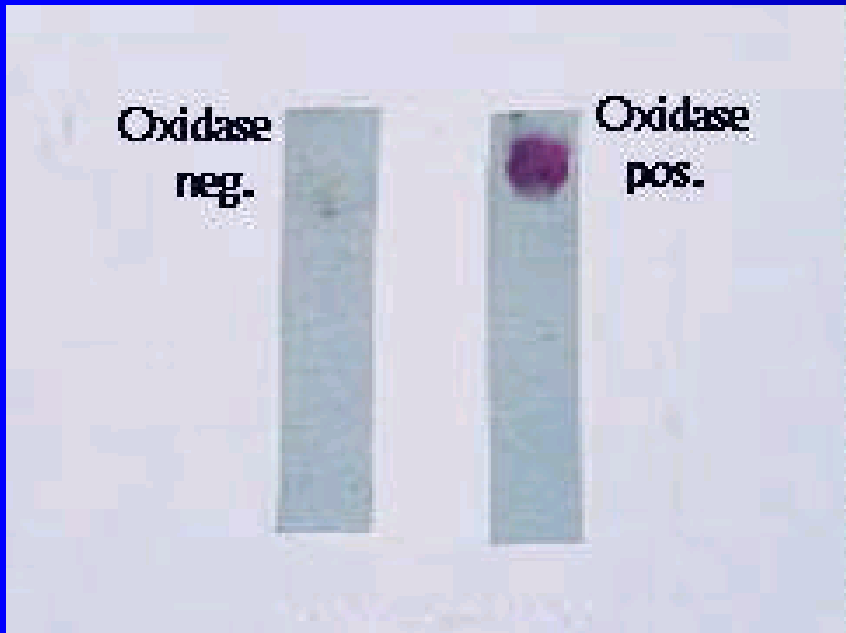
- Οι οξειδάσες είναι ένζυμα που καταλύουν τη μεταφορά ηλεκτρονίων από χημικές ουσίες στην χρωστική tetramethyl-p-phenylenediamine, που είναι δέκτης ηλεκτρονίων και του οποίου η αναγωγή συνοδεύεται με την ανάπτυξη ισχυρού ιώδους χρώματος
- Τα ένζυμα καταλύουν την αντίδραση μεταφοράς ηλεκτρονίων από δότες ηλεκτρονίων (π.χ. NADH, NADPH) σε δέκτες ηλεκτρονίων (π.χ. οξυγόνο). Γενικά, τα υποχρεωτικά αερόβια βακτήρια και συγκεκριμένα όσα βακτήρια χρησιμοποιούν το οξυγόνο ως τελικό δέκτη ηλεκτρονίων για την παραγωγή ενέργειας συνήθως παράγουν οξειδάση, ενώ τα αναερόβια ή προαιρετικά αναερόβια συνήθως δεν παράγουν οξειδάση.

Δοκιμή της οξειδάσης

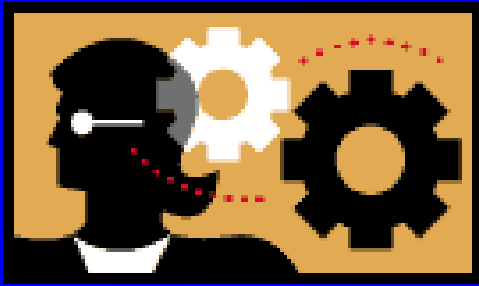
- Ο έλεγχος της οξειδάσης χρησιμοποιείται για την αναγνώριση των γενών *Aeromonas*, *Vibrio*, *Campylobacter*, *Pseudomonas* (θετική αντίδραση) και για αποκλεισμό όλων των ειδών των εντεροβακτηρίων που δίνουν αρνητική αντίδραση



Oxidase Test



1. Σε τρυβλίο τοποθετούμε διηθητικό χαρτί το οποίο έχουμε εμβαπτίσει στο αντιδραστήριο της οξειδάσης
2. Μεταφέρουμε μικρή ποσότητα κυττάρων
3. Παρατηρούμε την αλλαγή χρώματος μετά από 30 δευτ.



<i>Pseudomonas sp.</i>	<i>Gram -</i>	<i>catalase +</i>	<i>oxidase +</i>
<i>Serratia sp.</i>	<i>Gram -</i>	<i>catalase +</i>	<i>oxidase -</i>
<i>Γαλακτοβάκιλλος</i>	<i>Gram +</i>	<i>catalase -</i>	(*)
<i>Brochothrix spp.</i>	<i>Gram +</i>	<i>catalase +</i>	<i>oxidase -</i>

(*) δεν αποτελεί διαγνωστικό κριτήριο για τα γαλακτικά βακτήρια