



Μικροβιολογία Τροφίμων I

Εργαστήριο

Ενότητα 5:

Χρώση Gram – Δοκιμή Καταλάσης
και Οξειδάσης, 1.5ΔΩ

Τμήμα: Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής Του Ανθρώπου

Διδάσκοντες: Ευστάθιος Ζ. Πανάγου

Πασχαλίτσα Τρυφινόπουλου

Αναστάσιος Σταματίου



Ευρωπαϊκή Ένωση
Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο



ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΠΑΙΔΕΙΑΣ & ΘΡΗΣΚΕΥΜΑΤΩΝ, ΠΟΛΙΤΙΣΜΟΥ & ΑΘΛΗΤΙΣΜΟΥ
ΕΙΔΙΚΗ ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ

Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης



ΕΥΡΩΠΑΪΚΟ ΚΟΙΝΩΝΙΚΟ ΤΑΜΕΙΟ





Μαθησιακοί Στόχοι

- Η απόκτηση βασικών εργαστηριακών δεξιοτήτων για την εφαρμογή των βιοχημικών δοκιμών της καταλάσης και οξειδάσης σε μικροβιακά κύτταρα.



Λέξεις Κλειδιά

- Δοκιμή καταλάσης
- Δοκιμή οξειδάσης
- Χρώση Gram



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 1/2

- 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.

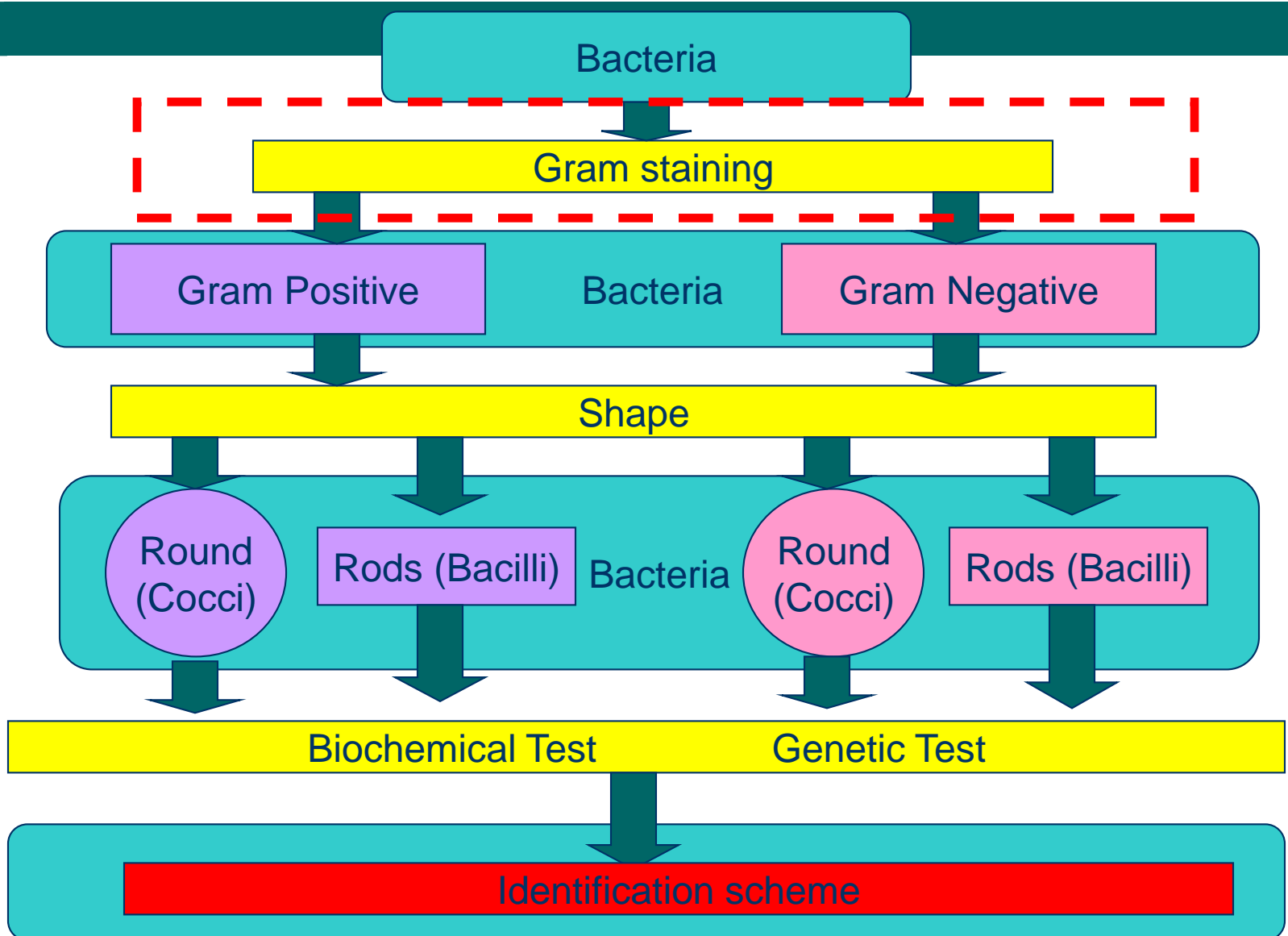


Χρωστικές 2/2

- 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 carbofuchin.



Χρώση Gram





Χρώση Gram – Αντιδραστήρια 1/2

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

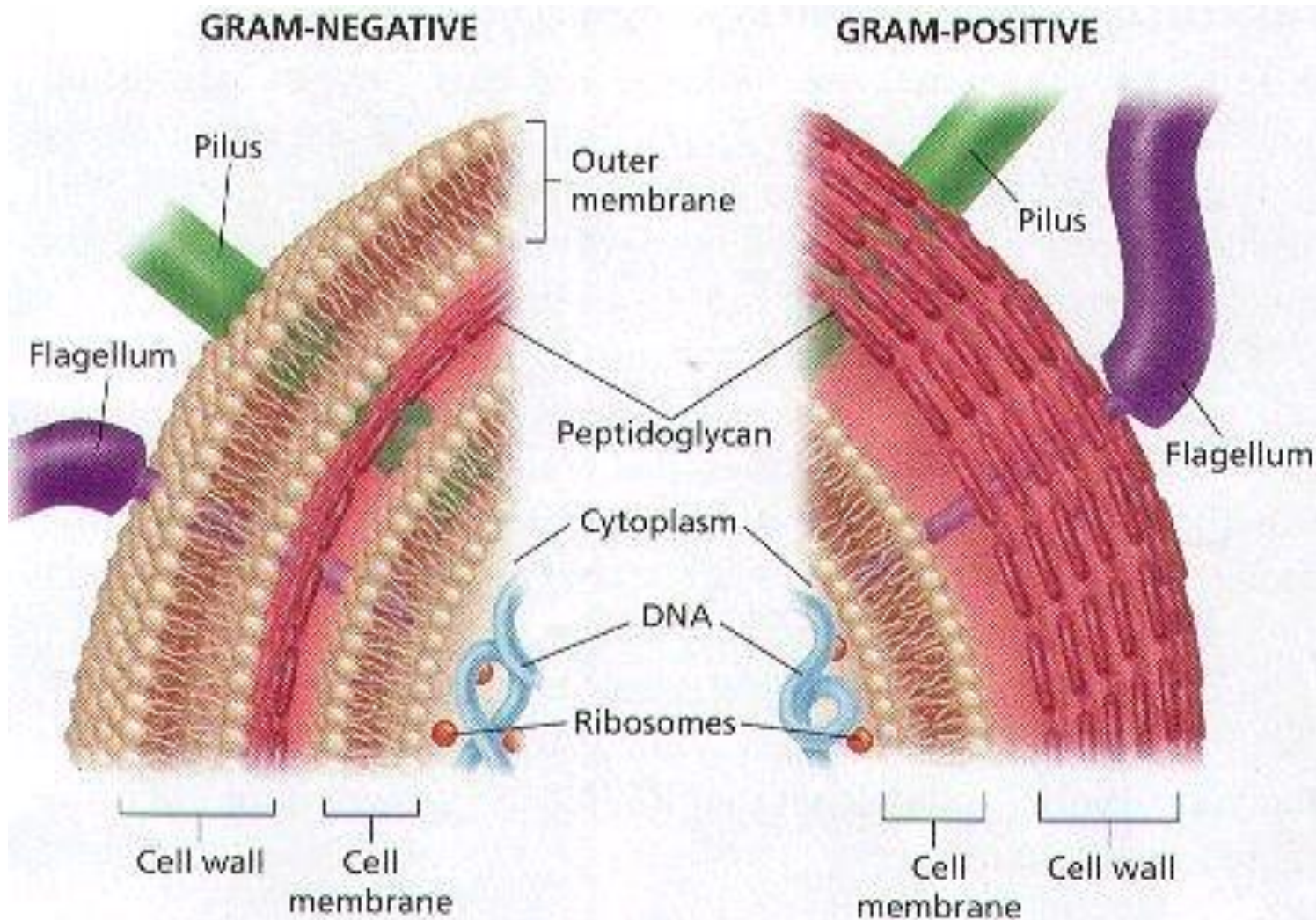


Χρώση Gram – Αντιδραστήρια 2/2

- **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 1/3





Διαδικασία Χρώσης 2/3



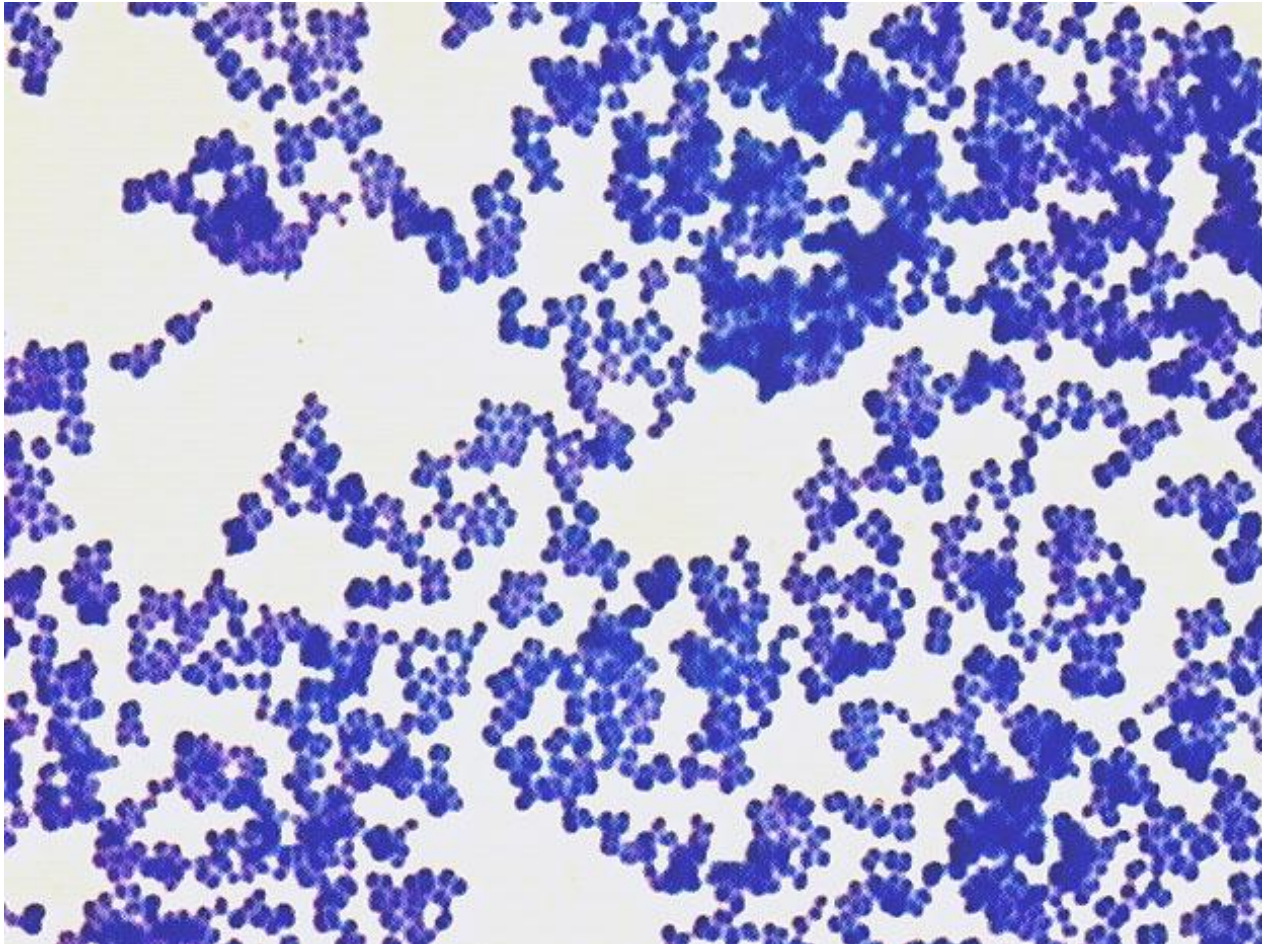


Διαδικασία Χρώσης 3/3





Διαφοροποίηση Κυττάρων 1/2



Gram +



Διαφοροποίηση Κυττάρων 2/2

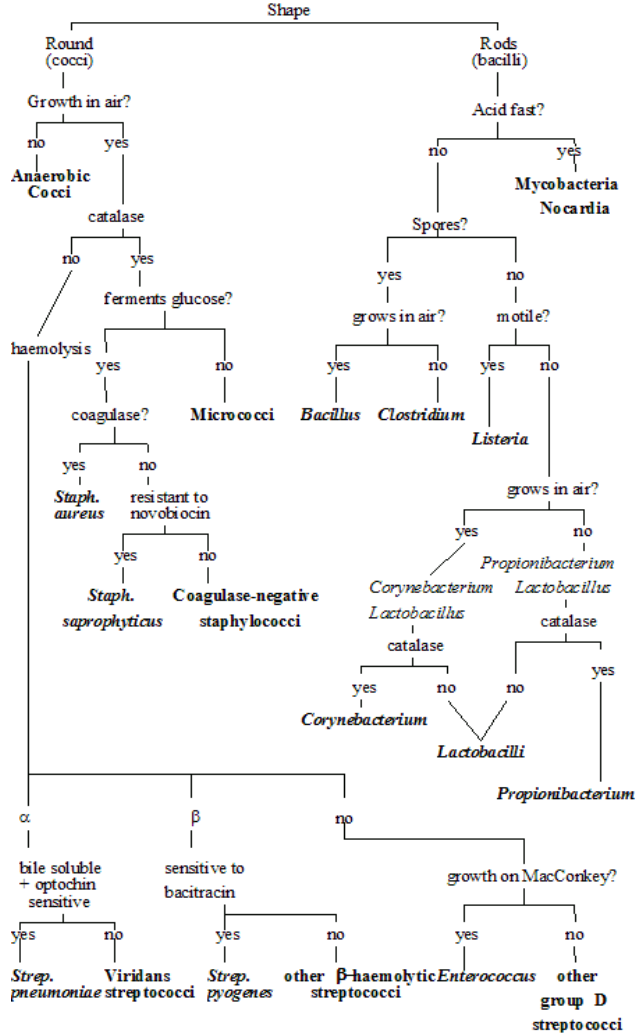


Gram -

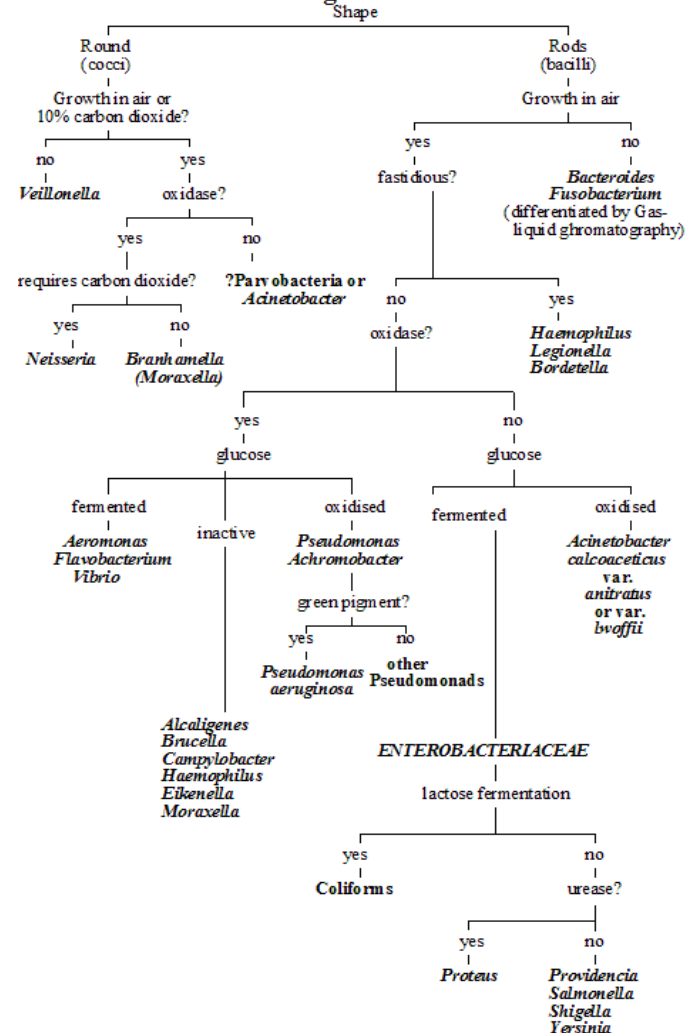


Ταξινόμηση Βακτηρίων

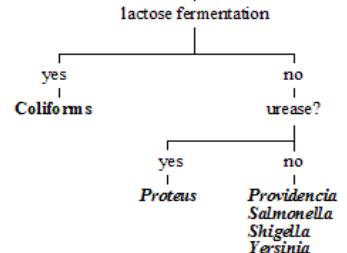
Gram Positive Bacteria



Gram Negative Bacteria



ENTEROBACTERIACEAE





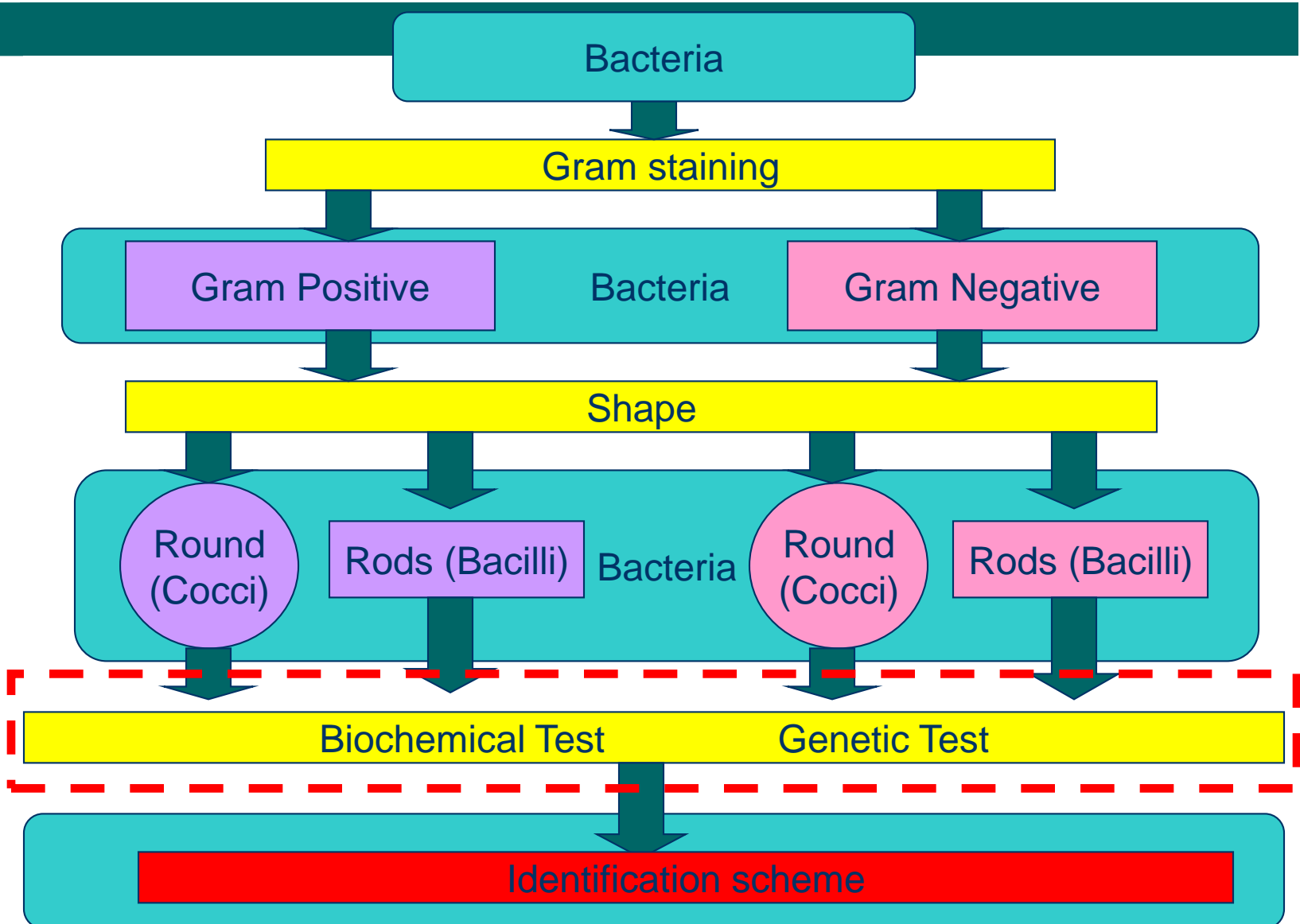
Auto Gram Stainer

- **Wescor Model 7320 Aerospray®**
 - 12 Slides
 - Operating Time 294 - 475 seconds, depending upon decolourizer setting





Biochemical Test





Δοκιμή της Καταλάσης 1/2

- 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.

● 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 2/2

- **Αποτέλεσμα**

Αφρισμός: θετική αντίδραση



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

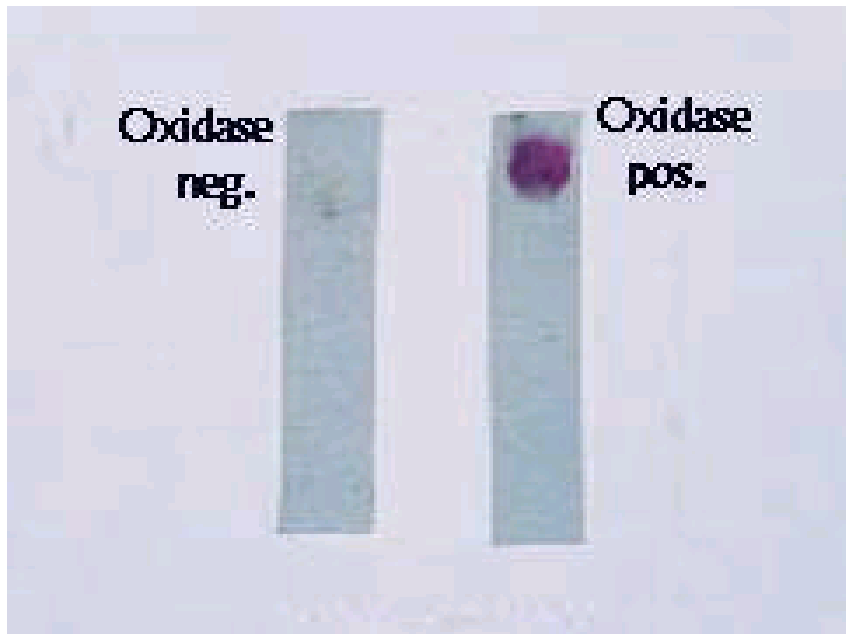


Δοκιμή της Οξειδάσης

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



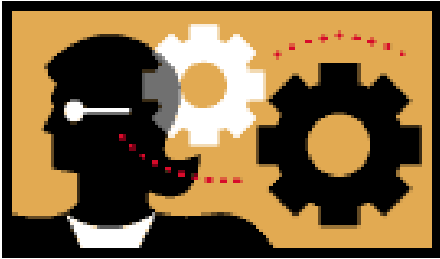
Oxidase Test



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.



Αντίδραση Μικροοργανισμών στη Δοκιμή της Καταλάσης και Οξειδάσης



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

(*) δεν αποτελεί διαγνωστικό κριτήριο για τα γαλακτικά βακτήρια



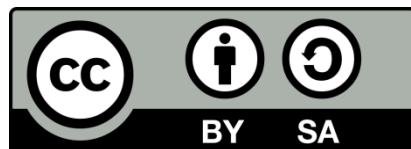
Βιβλιογραφία

- Νυχάς, Γ.Ι. Σημειώσεις στη Μικροβιολογία Τροφίμων. Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών
- Martin R. Adams and Maurice O. Moss (2008) Food Microbiology, 3rd Edition, RSC Publishing, London, UK.
- Jay, J.M. (2000) Modern Food Microbiology, 6th Edition, Aspen Publishers, Maryland, USA.



Άδειες Χρήσης

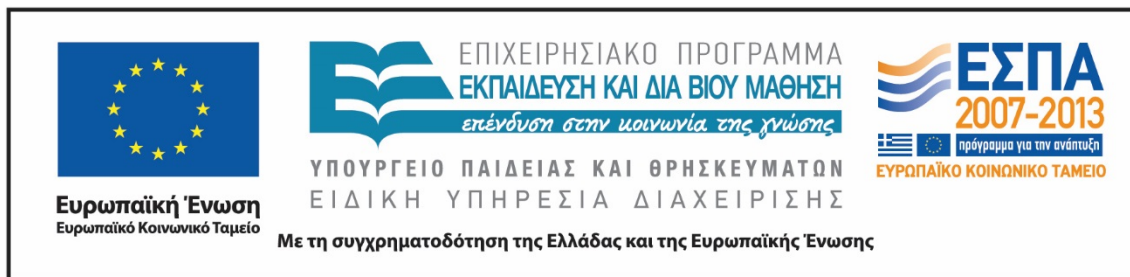
- Το παρόν εκπαιδευτικό υλικό υπόκειται σε άδειες χρήσης Creative Commons.
- Για εκπαιδευτικό υλικό, όπως εικόνες, που υπόκειται σε άλλου τύπου άδεια χρήσης, η άδεια χρήσης αναφέρεται ρητώς.





Χρηματοδότηση

- Το παρόν εκπαιδευτικό υλικό έχει αναπτυχθεί στο πλαίσιο του εκπαιδευτικού έργου του διδάσκοντα.
- Το έργο «**Ανοικτά Ακαδημαϊκά Μαθήματα Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών**» έχει χρηματοδοτήσει μόνο την αναδιαμόρφωση του εκπαιδευτικού υλικού.
- Το έργο υλοποιείται στο πλαίσιο του Επιχειρησιακού Προγράμματος «Εκπαίδευση και Δια Βίου Μάθηση» και συγχρηματοδοτείται από την Ευρωπαϊκή Ένωση (Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο) και από εθνικούς πόρους.





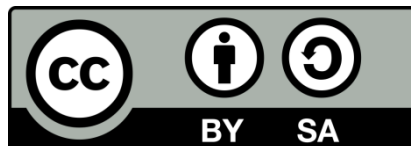
Σημείωμα Αναφοράς

- Copyright Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών 2015. Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου, Ευστάθιος Πανάγου/ Πασχαλίτσα Τρυφινόπουλου/ Αναστάσιος Σταματίου, «Μικροβιολογία Τροφίμων Ι Εργαστήριο». Έκδοση: 1.0. Αθήνα 2015. Διαθέσιμο από τη δικτυακή διεύθυνση: <https://mediasrv.aua.gr/eclass/>



Σημείωμα Αδειοδότησης

Το παρόν υλικό διατίθεται με τους όρους της άδειας χρήσης Creative Commons Αναφορά, Παρόμοια Διανομή 4.0 [1] ή μεταγενέστερη, Διεθνής Έκδοση. Εξαιρούνται τα αυτοτελή έργα τρίτων, π.χ. φωτογραφίες, διαγράμματα κ.λ.π., τα οποία εμπεριέχονται σε αυτό και τα οποία αναφέρονται μαζί με τους όρους χρήσης τους στο «Σημείωμα Χρήσης Έργων Τρίτων».



Η άδεια αυτή ανήκει στις άδειες που ακολουθούν τις προδιαγραφές του Ορισμού Ανοικτής Γνώσης [2], είναι ανοικτό πολιτιστικό έργο [3] και για το λόγο αυτό αποτελεί ανοικτό περιεχόμενο [4].

[1] <http://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/>

[2] <http://opendefinition.org/okd/ellinika/>

[3] <http://freedomdefined.org/Definition/EI>

[4] <http://opendefinition.org/buttons/>



Διατήρηση Σημειωμάτων

Οποιαδήποτε αναπαραγωγή ή διασκευή του υλικού θα πρέπει να συμπεριλαμβάνει:

- το Σημείωμα Αναφοράς
- το Σημείωμα Αδειοδότησης
- τη δήλωση Διατήρησης Σημειωμάτων
- το Σημείωμα Χρήσης Έργων Τρίτων (εφόσον υπάρχει) μαζί με τους συνοδευόμενους υπερσυνδέσμους.