



9

Πολυτεχνείο Κρήτης- Τμήμα Μηχανικών Περιβάλλοντος
Εργαστήριο Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας , 2^ο Εξάμηνο

Ομάδα 15

1^η Εργαστηριακή Άσκηση

ΤΕΧΝΙΚΗ ΧΡΩΣΗΣ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ GRAM

Ημερομηνία : 27 Φεβρουαρίου 2018

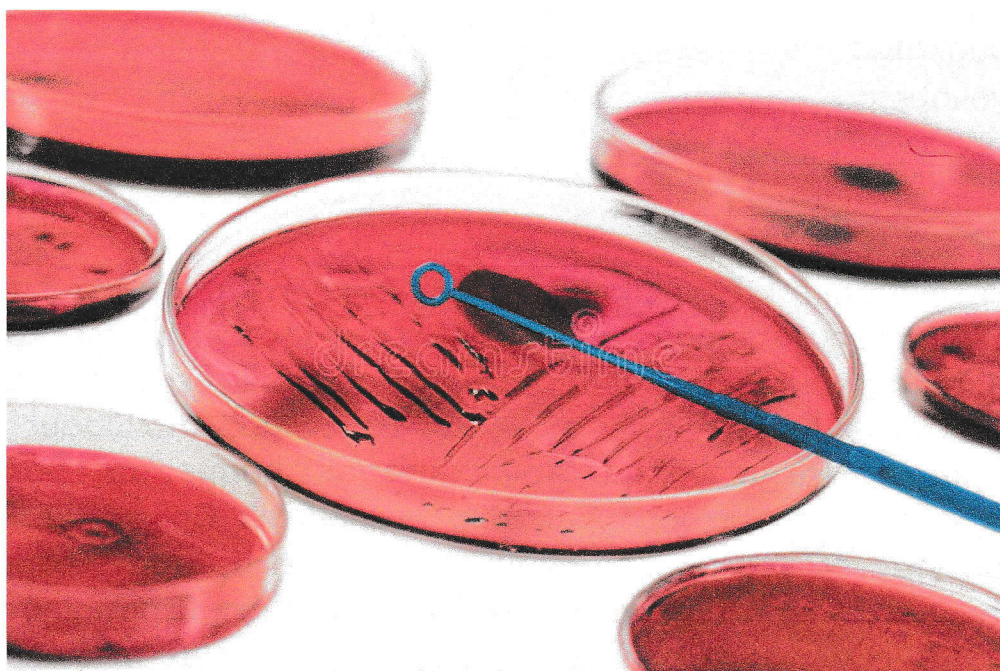
Μέλη: Ευαγγέλου Παναγιώτης

Αυξεντίου Λουκής

Ολύμπιος Πέτρος

Χατζηαθανασίου Χρύσω

Κανναβιάς Χρύσανθος



(Crystal Violet Solution) και το αφήσαμε να δράσει για 8 λεπτά. Ακολούθως, ξεπλύναμε προσεχτικά τις πλάκες με αποϊονισμένο νερό. Στην συνέχεια, καλύψαμε πλήρως τις αντικειμενοφόρες πλάκες με το διάλυμα Β (Διάλυμα LUGOL ή Iodine) αφήνοντας το να δράσει επίσης για 8 λεπτά ενώ στη συνέχεια ξεβγάλαμε και πάλι με αποϊονισμένο νερό. Μετά εμβαπτίσαμε τις δύο πλάκες με το διάλυμα C (διάλυμα αποχρωματισμού, ακετόνη), για περίπου ένα λεπτό. Ακολούθως, ξεπλύναμε τις πλάκες με αποϊονισμένο νερό και προχωρήσαμε στο στάδιο της βαφής, καλύπτοντας πλήρως τις πλάκες με διάλυμα D (Διάλυμα Safranin Solution) το οποίο αφήσαμε να δράσει για 5 λεπτά. Τέλος ξεβγάλαμε το διάλυμα και αφήσαμε τις πλάκες να στεγνώσουν ώστε να τις παρατηρήσουμε στο μικροσκόπιο.(1)

Αποτελέσματα

Με τη βοήθεια του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου παρατηρήσαμε ότι η αντικειμενοφόρος πλάκα που περιείχε δείγματα αποικίας Εντερόκοκκου παρέμεινε μπλε-βιολετί γιατί είναι Gram θετικό, ενώ η αντικειμενοφόρος πλάκα που περιείχε δείγματα Escherichia Coli βάφεται κόκκινη γιατί είναι Gram αρνητικό.

Συζήτηση

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται για την κατηγοριοποίηση των βακτηρίων ως Gram θετικά και Gram αρνητικά. Με το πέρας της πειραματικής διαδικασίας, παρατηρήσαμε ότι τα Gram θετικά παραμένουν μπλέ-βιολετί, ενώ τα Gram αρνητικά βάφονται ροζ-κόκκινα. Αυτό οφείλεται στην διαφορά της σύστασης του κυτταρικού τοιχώματος των προκαρυωτικών κυττάρων των βακτηρίων Gram(+) και Gram(-).

Το κυτταρικό τοίχωμα των βακτηρίων Gram(+) αποτελείται από περισσότερα από δύο στρώματα πεπτιδογλυκάνης και τειχοϊκά οξέα ενώ το κυτταρικό τοίχωμα των βακτηρίων Gram(-) αποτελείται από μόνο ένα έως δύο στρώματα πεπτιδογλυκάνης χωρίς τειχωϊκά οξέα (2). Το παχύ τοίχωμα των βακτηρίων Gram(+) αποτρέπει την εισχώρηση του διαλύματος στο περιβάλλον του κυττάρου, ενώ το λεπτό τοίχωμα των βακτηρίων Gram (-) αδυνατεί να προστατέψει το κύτταρο, εξαιτίας της

Εισαγωγή

Σκοπός του πειράματος είναι η μελέτη και η καταγραφή της αντίδρασης των δειγμάτων κατά την τεχνική χρώση σύμφωνα με τη μέθοδο του χρωματισμού κατά Gram. Κατά τη μέθοδο αυτή γίνεται διαχωρισμός των κυττάρων ως Gram θετικά και Gram αρνητικά. Τα Gram θετικά παραμένουν μπλέ-βιολετί, ενώ τα Gram αρνητικά βάφονται ροζ-κόκκινα.

Υλικά

- Διάλυμα Α. Crystal Violet Solution
- Διάλυμα Β. Διάλυμα LUGOL (LUGOL's solution stabilized) ή Iodine
- Διάλυμα Γ. Διάλυμα αποχρωματισμού, 1 acetone: 3 isopropyl alcohol
- Διάλυμα Δ. Διάλυμα Safranin
- Αντικειμενοφόρες πλάκες
- Βακτήρια
- Μικροβιολογικός κρίκος
- Γκαζάκι
- Μικροσκόπιο
- Σταγονόμετρο

Μέθοδος

Η πειραματική διαδικασία άρχισε χύνοντας μια σταγόνα αποϊονισμένου νερού στις δύο καθαρές αντικειμενοφόρες πλάκες. Έπειτα, με τη χρήση του μικροβιολογικού κρίκου μεταφέραμε δείγματα από τις αποικίες βακτηρίων πάνω στις σταγόνες τις οποίες απλώσαμε στην επιφάνεια των πλακών. Στην πρώτη τοποθετήσαμε τα βακτήρια εντερόκοκκου ενώ στη δεύτερη βακτήρια *Escherichia Coli*. Ακολούθως, χρησιμοποιώντας το γκαζάκι ζεστάναμε τις πλάκες με αποτέλεσμα την εξάτμιση του νερού που υπήρχε πάνω τους και τη σταθεροποίηση των δειγμάτων. Στη συνέχεια καλύψαμε πλήρως τις πλάκες με το διάλυμα Α

μικρής τους περιεκτικότητας σε πεπτιδογλυκάνη (3). Για το λόγο αυτό, το διάλυμα εισχώρησε στο περιβάλλον του κυττάρου του βακτηρίου Gram(-), χρωματίζοντας το κόκκινο.

Βιβλιογραφία

1. Σημειώσεις εργαστηρίου μικροβιολογίας, κ. Ιωσηφίνας Γουνάκη
2. Σημειώσεις θεωρίας μικροβιολογίας, κ. Δανάης Βενιέρη
3. Περιβαλλοντική Μικροβιολογία, Σπυρίδων Τούγιας, Αλέξανδρος Αϊβαζίδης, Παράσχος Μελίδης, Δημοκρίτειο Πανεπιστήμιο Θράκης, Τμήμα ΜΗΠΕΡ, Εκδόσεις: Έμβρυο.