ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΕΣ ΑΣΚΗΣΕΙΣ

ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

Ι. Κουρκουτάς

Αλεξανδρούπολη 2010

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΑΣΚΗΣΗ 1 3
Άσηπτες μέθοδοι εργασίας στη Μικροβιολογία 3
ΑΣΚΗΣΗ 2 6
Παρασκευή και αποστείρωση θρεπτικών μέσων με υγρή θέρμανση και διήθηση 6
ΑΣΚΗΣΗ 3 11
Μικροοργανισμοί και περιβάλλον 11
ΑΣΚΗΣΗ 4 16
Καθαρές καλλιέργειες 16
ΑΣΚΗΣΗ 5 18
Προσδιορισμός του αριθμού βακτηρίων 18
Α. Αρίθμηση ζωντανών βακτηρίων 18
Β. Φωτομετρική αρίθμηση μικροβίων 20
ΑΣΚΗΣΗ 6 22

ΑΣΚΗΣΗ 1

Άσηπτες μέθοδοι εργασίας στη Μικροβιολογία

Επειδή οι μικροοργανισμοί βρίσκονται παντού στο περιβάλλον θα πρέπει για οποιαδήποτε μικροβιολογική πειραματική εργασία, να παίρνονται μέτρα έτσι ώστε να αποκλείεται η επιμόλυνση με άλλα μικρόβια. Αυτό επιτυγχάνεται με ένα σύνολο εργαστηριακών δεξιοτήτων, που αναφέρονται ως άσηπτες τεχνικές και στοχεύουν στον αποκλεισμό όλων των μικροοργανισμών του περιβάλλοντος. Η χρήση αποστειρωμένων θρεπτικών μέσων και αντικειμένων καθώς και η εργασία σε αποστειρωμένο χώρο αποτελούν το ελάχιστο από αυτά που θα πρέπει να εφαρμόζει ο Μικροβιολόγος. Το λυχνάρι bunsen είναι απαραίτητο για τη γρήγορη αποστείρωση ορισμένων μικροαντικειμένων και για τη δημιουργία στοιχειωδώς αποστειρωμένο χώρου στον πάγκο εργασίας, αφού για την εκτέλεση των ασκήσεων δεν υπάρχουν διαθέσιμοί θάλαμοι νηματικής ροής αέρα που χρησιμοποιούνται για μικροβιολογικές εργασίες.

Οι παραδοσιακές γυάλινες πιπέττες που χρησιμοποιούνται στη Μικροβιολογία είναι βουλωμένες με βαμβάκι έτσι ώστε να αποφεύγεται η περίπτωση μόλυνσης του διαλύματος με μικρόβια του στόματός μας, της επιφάνειας των χεριών μας ή του αέρα. Επιπλέον το βαμβάκι μας προφυλάσσει από κατά λάθος κατάποση των υγρών της πιπέττας. Παρόλα αυτά, όταν υπάρχει έστω και υποψία παρουσίας παθογόνων μικροοργανισμών, δε συνίσταται το πιπεττάρισμα με το στόμα.

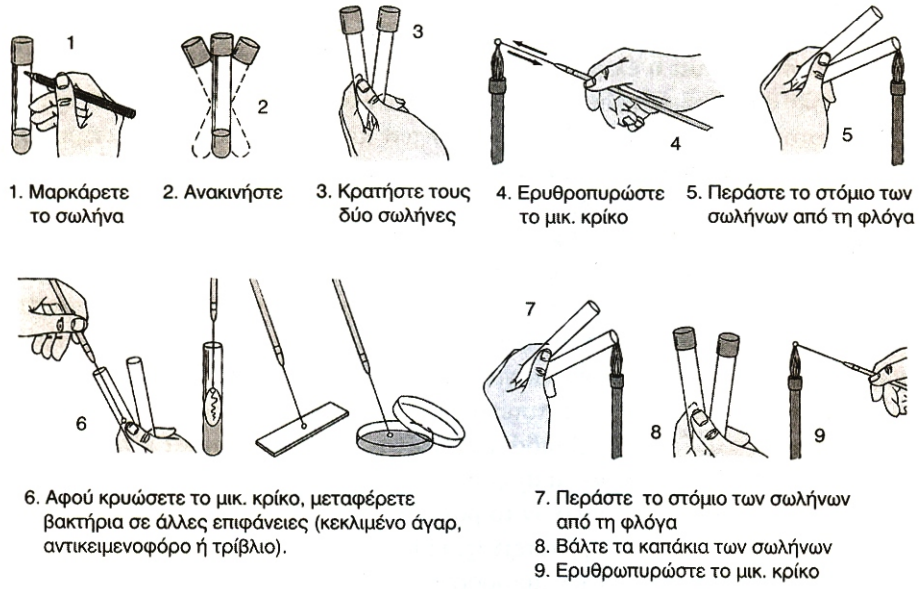
Οι πιπέττες αποστειρώνονται κλεισμένες σε μεταλλικά δοχεία ή τυλιγμένες σε αλουμινόχαρτο. Το δοχείο που τις περιέχει δεν πρέπει να ανοιχθεί πριν από τη χρήση τους. Κάθε πιπέττα χρησιμοποιείται μόνο μια φορά και αμέσως μετά τοποθετείται σε ειδικά δοχεία που περιέχουν απολυμαντικό υγρό. Με τις αυτόματα ρυθμιζόμενες πιπέττες (μικροπιπέττες) χρησιμοποιούνται πλαστικά ρύγχη τα οποία έχουν προηγουμένως αποστειρωθεί.

Ο μικροβιολογικός κρίκος (Σχήμα 1) χρησιμοποιείται για την άσηπτη μεταφορά μικροοργανισμών από ένα θρεπτικό μέσο (υγρό ή στερεό) σε άλλο. Είναι απαραίτητο πριν τη

Σχήμα 1. Μικροβιολογικός κρίκος.

χρήση ο μικροβιολογικός κρίκος να αποστειρώνεται με πυράκτωση στη φλόγα του λυχναριού bunsen. **Ποτέ μην αφήνεται τον μικροβιολογικό κρίκο στον πάγκο αν δεν έχει αποστειρωθεί προηγουμένως**.

Η μεταφορά υλικών από δοχείο σε δοχείο θα πρέπει να γίνεται με ιδιαίτερη προσοχή, ώστε να αποφευχθούν οι επιμολύνσεις. Έτσι όταν ανοίγεται ένα αποστειρωμένο δοχείο θα πρέπει πρώτα να περάσει στιγμιαία το στόμιό του από τη φλόγα του λυχναριού bunsen. Η διαδικασία αυτή περιγράφεται στο Σχήμα 2.



Σχήμα 2. Άσηπτοι χειρισμοί για τη μεταφορά βακτηρίων.

Υλικά και συσκευές

- Μικροβιολογικός κρίκος.
- Αποστειρωμένες πιπέττες.
- Ένας δοκιμαστικός σωλήνας με αποσταγμένο και αποστειρωμένο νερό.
- Δύο δοκιμαστικοί σωλήνες με θρεπτικό ζωμό.
- Ένα τριβλίο *E. coli*.
- Επωαστικός κλίβανος.

Πειραματικό μέρος

Α. Άσηπτη μεταφορά υγρών

1. Αποστειρώστε το μικροβιολογικό κρίκο.
2. Ανοίξτε ένα δοκιμαστικό σωλήνα που περιέχει αποσταγμένο και αποστειρωμένο νερό. Αφού περάσετε το στόμιό του στιγμιαία από τη φλόγα, εμβαπτίστε το μικροβιολογικό κρίκο στο νερό.

3. Εμβαπτίστε το μικροβιολογικό κρίκο σε ένα νέο σωλήνα που περιέχει θρεπτικό ζωμό, αφού προηγουμένως περάσετε το στόμιο του σωλήνα στιγμιαία από τη φλόγα.
4. Επωάστε το σωλήνα που έγινε η μεταφορά, στους 37°C, για 24 ώρες.
5. Μετά το τέλος της επώασης παρατηρήστε το σωλήνα που έγινε η μεταφορά των βακτηρίων. Τι παρατηρείτε;

Β. Υγρή καλλιέργεια βακτηρίων

1. Αποστειρώστε το μικροβιολογικό κρίκο.
2. Πάρτε με το μικροβιολογικό κρίκο μια απομακρυσμένη από τις άλλες αποικία *E. coli*.
3. Εμβαπτίστε το μικροβιολογικό κρίκο που φέρνει τα βακτήρια σε ένα νέο σωλήνα που περιέχει θρεπτικό ζωμό, αφού προηγουμένως περάσετε το στόμιο του σωλήνα στιγμιαία από τη φλόγα.
4. Επωάστε το σωλήνα που έγινε η μεταφορά, στους 37°C, για 24 ώρες.
5. Μετά το τέλος της επώασης παρατηρήστε το σωλήνα που έγινε η μεταφορά των βακτηρίων. Τι παρατηρείτε;

ΑΣΚΗΣΗ 2

Παρασκευή και αποστείρωση θρεπτικών μέσων με υγρή θέρμανση και διήθηση

Θρεπτικά μέσα

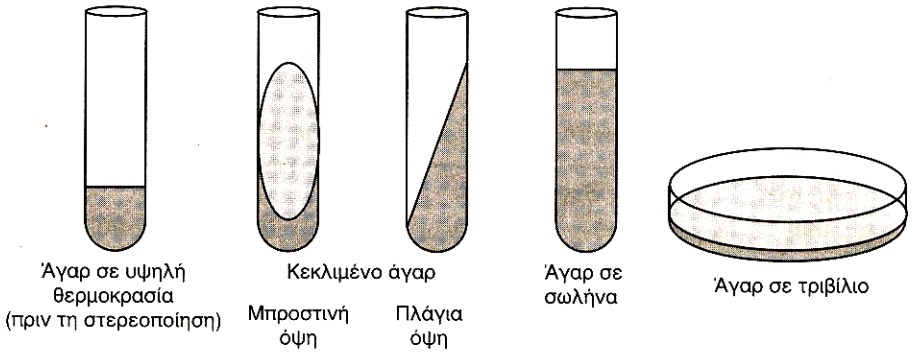
Για την καλλιέργεια βακτηρίων έχει επινοηθεί μεγάλος αριθμός θρεπτικών μέσων το καθένα από τα οποία ταιριάζει σε ειδικές ομάδες βακτηρίων. Μερικά από αυτά είναι αρκετά απλά και χρησιμοποιούνται στην ανάπτυξη πολλών κοινών βακτηρίων ενώ άλλα περιέχουν εξειδικευμένες χημικές ουσίες απαραίτητες για την ανάπτυξη συγκεκριμένων βακτηρίων με ειδικές απαιτήσεις. Γενικά ένα θρεπτικό μέσο, κατάλληλο για ετερότροφους οργανισμούς, πρέπει να περιέχει μια *πηγή ενέργειας* (συνήθως ένα σάκχαρο), μια *πηγή αζώτου*, *βιταμίνες* και διάφορα *ανόργανα άλατα* ενώ ένα θρεπτικό μέσο κατάλληλο για αυτότροφους οργανισμούς περιέχει, κύρια ή αποκλειστικά, ανόργανα άλατα. Τα αναερόβια βακτήρια καλλιεργούνται συνήθως σε αναγμένα θρεπτικά μέσα.

Τα κύρια υλικά που συνήθως περιέχονται στα θρεπτικά μέσα που χρησιμοποιούνται για την ανάπτυξη των μικροβίων είναι: **Εκχύλισμα κρέατος** που είναι συμπυκνωμένο υλικό και προέρχεται από βράσιμο, σε νερό, άπαχου κρέατος. Η συμπύκνωση επιτυγχάνεται με εξάτμιση και το υλικό που προκύπτει είναι πλούσιο σε προϊόντα διάσπασης των πρωτεϊνών, οργανικές βάσεις, βιταμίνες και ανόργανα άλατα. **Πεπτόνη** και **φυτόνη** που είναι τα ξηρά προϊόντα, πλούσια σε πεπτίδια και αμινοξέα, που παράγονται από τη δράση πρωτεολυτικών ενζύμων πάνω σε ζωικές ή φυτικές πρωτεΐνες αντίστοιχα. **Εκχύλισμα ζύμης** που προέρχεται από ζύμη, τα κύτταρα της οποίας αφού πλυθούν υδρολύονται με υδροχλωρικό οξύ και πρωτεολυτικά ένζυμα (πολύ συχνά αφήνονται σε αρκετά υψηλές θερμοκρασίες, γύρω στους 55°C, για να δράσουν τα διάφορα αυτολυτικά ένζυμα). Οι κυτταρικές μεμβράνες απομακρύνονται με φυγοκέντρηση ή φιλτράρισμα και το υπόλοιποι χρησιμοποιείται ως πλούσια πηγή κυρίως βιταμινών και αυξητικών παραγόντων.

Τα θρεπτικά μέσα είναι σε στερεή ή υγρή μορφή που διαφέρουν μόνο ως προς την παρουσία ενός στερεοποιητικού παράγοντα (συνήθως άγαρ) που είναι υπεύθυνος για τη συμπαγή μορφή που έχουν τα πρώτα (Σχήμα 3). Το πιο συνηθισμένο θρεπτικό μέσο για την ανάπτυξη βακτηρίων είναι ένα διάλυμα (θρεπτικός ζωμός) που περιέχει 0,3% εκχύλισμα κρέατος και 0,5% πεπτόνη.

Σχεδόν όλα τα θρεπτικά μέσα πρέπει, πριν χρησιμοποιηθούν, να έχει προηγηθεί αποστείρωση και συνήθως με τη βοήθεια ειδικών χρωστικών, ρύθμιση του pH όπως π.χ. με κόκκινο της φαινόλης που έχει κίτρινο χρώμα σε όξινο περιβάλλον και κόκκινο σε αλκαλικό. Το κόκκινο της φαινόλης χρησιμοποιείται για περιοχές pHμεταξύ 6,8-8,4.

Σε πολλές περιπτώσεις προσθέτονται στο θρεπτικό ζωμό και άλλα υλικά, όπως σάκχαρα ή ανόργανα άλατα ή άλλες ουσίες, ανάλογα με το είδος των βακτηρίων που πρόκειται να καλλιεργηθεί.



Σχήμα 3. Θρεπτικά μέσα.

Αποστείρωση

Οι πιο κοινές μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για την αποστείρωση των θρεπτικών μέσων στηρίζονται στην καταστροφή των μικροοργανισμών με θέρμανση ή στον αποκλεισμό τους από αυτά ύστερα από διήθηση.

Για τη δράση της θερμότητας ενάντια στους μικροοργανισμούς μεγάλη σημασία έχει η περιεκτικότητά τους σε νερό, αφού αυτή καθορίζει τη θερμοκρασία στην οποία νεκρώνεται ένας μικροοργανισμός, κυρίως εξαιτίας της μετουσίωσης των πρωτεϊνών του αλλά και εξαιτίας της αποικοδόμησης, με υδρόλυση ή οξείδωση, ουσιωδών κυτταρικών συστατικών. Η θερμότητα που εφαρμόζεται για αποστείρωση μπορεί να είναι **ξηρή** ή **υγρή**.

Με αποστείρωση ξηρής θέρμανσης στους 100°C, ακόμη και για πολλές ώρες, δεν καταστρέφονται όλα τα είδη των βακτηρίων ενώ με ξηρή θέρμανση στους 140°C για 1 ώρα καταστρέφονται όλες οι βλαστικές μορφές των βακτηρίων όχι όμως και τα σπόρια τους. Γενικά για αποστείρωση (δηλαδή

καταστροφή όλων των μορφών ζωής) με ξηρή θερμότητα χρειάζεται άνοδος της θερμοκρασίας του αντικειμένου που πρόκειται να αποστειρωθεί στους 140°C για 3 ώρες, στους 160°C για 2 ώρες ή στους 170°C για 1 ώρα. Όταν τα διάφορα αντικείμενα τοποθετούνται στον κλίβανο ξηρής αποστείρωσης πρέπει να υπάρχει καλή κυκλοφορία του αέρα μέσα στον κλίβανο, γι' αυτό εξάλλου και οι κλίβανοι ξηρής αποστείρωσης διαθέτουν ανεμιστήρα. Η πυράκτωση αποτελεί επίσης μέθοδο ξηρής αποστείρωσης μικρών αντικειμένων που αντέχουν σε υψηλές θερμοκρασίες, όπως π.χ. γίνεται με την αποστείρωση του μικροβιολογικού κρίκου.

Η αποστείρωση με υγρή θέρμανση είναι πιο αποτελεσματική από τη ξηρή αποστείρωση διότι η θανάτωση των μικροβίων είναι αποτέλεσμα κυρίως μετουσίωσης των πρωτεϊνών πράγμα που πετυχαίνεται πιο εύκολα με την παρουσία νερού. Όπως φαίνεται στον Πίνακα 1, έχουμε πλήρη αποστείρωση, με υγρή θερμότητα, ύστερα από θέρμανση στους 121°C για 15min. Η θερμοκρασία αυτή των υδρατμών αντιστοιχεί σε πίεση 151b/inch^2 ή 1,1atm. Θα πρέπει να τονισθεί ότι ο απλός βρασμός (100°C σε ατμοσφαιρική πίεση) δεν είναι ασφαλής μέθοδος αποστείρωσης αφού με αυτό δεν καταστρέφονται όλα τα βακτήρια και κύρια τα σπόρια τους.

ΠΙΝΑΚΑΣ 1

Συνθήκες που χρειάζονται για πλήρη αποστείρωση με υγρή θέρμανση

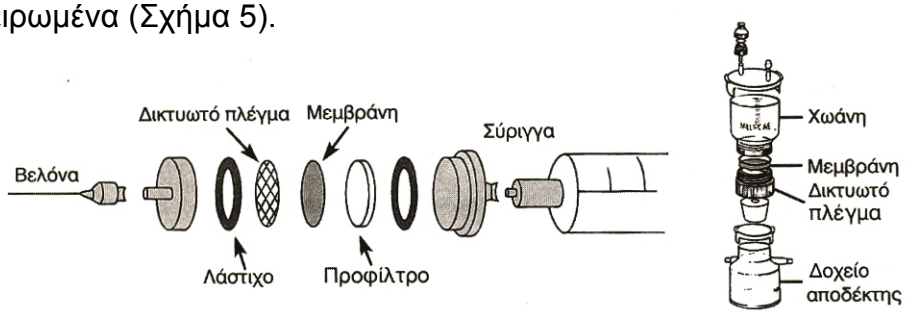
Χρόνος min	**Θερμοκρασία ^{o}C**	**Πίεση lb/inch^2**	**atm**
15	121	15	1,1
10	126	20	1,5
3	134	30	2,2

Η υγρή αποστείρωση με πίεση επιτυγχάνεται με μια συσκευή που μοιάζει με την μαγειρική χύτρα και ονομάζεται αυτόκαυστο (Σχήμα 4). Μέσα στο αυτόκαυστο οι υδρατμοί εισέρχονται με πίεση ή δημιουργούνται ύστερα από βράσιμο του νερού που περιέχεται σε αυτό. Πριν την έναρξη της αποστείρωσης και μετά την έναρξη του βρασμού πρέπει απαραίτητα να αφεθεί για λίγα λεπτά η βαλβίδα εξόδου ανοικτή για να εξέλθει ο ατμοσφαιρικός αέρας που αντικαθίσταται με τους υδρατμούς που δημιουργούνται. Όταν κλεισθεί η

Σχήμα 4. Απλό αυτόκαυστο.

βαλβίδα εξόδου η θερμοκρασία και η πίεση των υδρατμών αυξάνονται μέχρι που ανοίγει αυτόματα η ρυθμιστική βαλβίδα (βαλβίδα που ρυθμίζεται ανάλογα με την επιθυμητή θερμοκρασία αποστείρωσης). Από τη στιγμή αυτή χρονομετρείται η διάρκεια της αποστείρωσης.

Η αποστείρωση θερμοευαίσθητων υλικών, γίνεται συνήθως με διήθησή τους από αποστειρωμένα ειδικά φίλτρα. Τα φίλτρα αυτά είναι μεμβράνες συνήθως από νιτρική κυτταρίνη, που έχουν πόρους, το μέγεθος των οποίων ποικίλει. Πόροι διαμέτρου 0,22μm αποκλείουν όλα τα μικρόβια και γι' αυτό τα υγρά που περνούν, σε άσηπτες συνθήκες, από τέτοια φίλτρα θεωρούνται αποστειρωμένα (Σχήμα 5).



Σχήμα 5. Εξαρτήματα και συσκευή διήθησης.

Αποστείρωση τέλος μπορεί να επιτευχθεί με *διακοπτόμενη θέρμανση* (βλ. άσκηση 3), με *ακτινοβόληση* (υπεριώδεις, ακτίνες Χ ή γ) καθώς και με κατεργασία με διάφορες *χημικές ουσίες*. Οι τελευταίες ενεργούν ως αντιμικροβιακοί παράγοντες.

Υλικά και συσκευές

- Θρεπτικό άγαρ (σκόνη).
- Θρεπτικός ζωμός (σκόνη).
- Αποσταγμένο νερό.
- Κωνικές φιάλες 150-200ml.
- Αποστειρωμένα τριβλία (10 για κάθε τριάδα).
- Γυάλινοι δοκιμαστικοί σωλήνες.
- Υδατόλουτρο σε θερμοκρασία 55°C περίπου.
- Θάλαμος επώασης 30°C.
- Αυτόκαυστο.
- Ζυγαριά.
- Ογκομετρικοί σωλήνες 100ml (1 για κάθε τριάδα).
- Αποστειρωμένες πιπέττες.
- Αποστειρωμένοι σωλήνες με κεκλιμένο άγαρ (1 για κάθε φοιτητή).

Πειραματικό μέρος

1. Ζυγίστε την ποσότητα που απαιτείται για να παρασκευαστούν 200ml θρεπτικό άγαρ ή θρεπτικός ζωμός (Nutrient agar ή Nutrient broth) και τοποθετήστε το σε μια κωνική φιάλη.
2. Προσθέστε 200ml αποσταγμένου H_2O.
3. Καλύψτε σφιχτά το στόμιο της φιάλης με αλουμινόχαρτο (γιατί είναι απαραίτητο αυτό;).
4. Αποστειρώστε τη φιάλη και πέντε δοκιμαστικούς σωλήνες αφού καλύψετε τα στόμιά τους με πώμα ή βαμβάκι.
5. Μετά το τέλος της αποστείρωσης, μεταφέρατε με άσηπτες συνθήκες, 20ml θρεπτικό άγαρ σε κάθε ένα από τα τριβλία και 10ml στους 5 αποστειρωμένους δοκιμαστικούς σωλήνες.
6. Αφήστε τους σωλήνες σε κεκλιμένη θέση για να στερεοποιηθεί το άγαρ.
7. Αφού στερεοποιηθεί το άγαρ μεταφέρετέ το στο ψυγείο.

ΑΣΚΗΣΗ 3

Μικροοργανισμοί και περιβάλλον

Οι μικροοργανισμοί βρίσκονται παντού, σ' όλα τα οικοσυστήματα από τα οποία είναι δυνατή η απομόνωσή τους (εδάφη, θάλασσες, λίμνες, θερμές πηγές, αέρας). Όλα τα έμβια όντα, συμπεριλαμβανομένου και του ανθρώπου είναι φορείς πολλών ομάδων μικροβίων. Τα βακτήρια που απομονώνονται από το ανθρώπινο σώμα συχνότερα και τα χαρακτηριστικά τους παρουσιάζονται στον Πίνακα 2.

ΠΙΝΑΚΑΣ 2

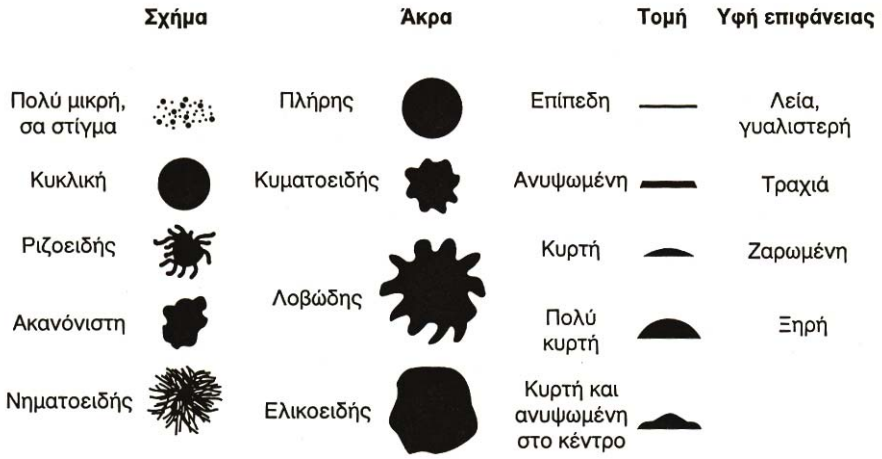
Οι πιο κοινοί μικροοργανισμοί που συναντώνται στο ανθρώπινο σώμα

Μικροοργανισμοί	**Χρώση κατά Gram, Μορφολογικά χαρακτηριστικά, Διάταξη κυττάρων**	**Μορφή αποικιών σε αιματούχο άγαρ**
Streptococcus viridans (α-αιμόλυση)	Gram(+), κόκκοι, αλυσίδες	Μικρές αποικίες σε σχήμα θόλου, περιβάλλονται από μια πρασινωπή ζώνη αποχρωματισμού.
Streptococcus pneumoniae	Gram(+), κόκκοι, ζευγάρια ή μικρές αλυσίδες	Όμοια με *S. viridans*, αλλά έχει χαμηλωμένο κέντρο.
Streptococcus pyogenes (β-αιμόλυση)	Gram(+), κόκκοι, αλυσίδες	Μικρές ανασηκωμένες αποικίες, περιβάλλονται από μια ευδιάκριτη ζώνη καθαρής αιμόλυσης.
Staphylococcus aureus	Gram(+), κόκκοι, συστάδα	Μεγάλες, στρογγυλές, καστανοκίτρινες αποικίες, περιβάλλονται από μια ευδιάκριτη ζώνη καθαρής αιμόλυσης.
Staphylococcus epidermidis	Gram(+), κόκκοι, συστάδα	Μεγάλες, στρογγυλές, άσπρες αδιαφανείς αποικίες, συνήθως χωρίς ζώνη αιμόλυσης.
Neisseria spp	Gram(+), κόκκοι, ζευγάρια	Ποικίλει ανάλογα με το είδος. Σχηματίζει συνήθως μικρές ασπροκίτρινες αποικίες κάποιες έχουν πτυχές και είναι στεγνές.
Corynebacterium spp	Gram(+), ράβδοι, μορφή μπαστουνιού, δίπολα ή ράβδοι	Ποικίλει ανάλογα με το είδος. Κάποιες έχουν πτυχές και είναι ξηρές.
Bacillus spp	Gram(+), ράβδοι, μονά κύτταρα ή σε αλυσίδες	Στρογγυλές ή ακανόνιστες, η επιφάνεια της αποικίας είναι συμπαγής, θαμπή και αδιαφανής.
Ζύμη (μύκητας)	Gram(+), μεγάλα κύτταρα με εκβλαστήσεις	Μεγάλες στρογγυλές, υδαρείς αποικίες.

Οι μικροοργανισμοί είναι γνωστοί στην κοινωνία κυρίως εξαιτίας των προβλημάτων (ασθένειες) που προκαλούν στους ανώτερους οργανισμούς και βεβαίως στον άνθρωπο. Δεν είναι όμως όλοι οι μικροοργανισμοί υπεύθυνοι για ασθένειες, αντίθετα μάλιστα, πολλοί από αυτούς, έχουν ευεργετική συμβολή για την ισορροπία που υπάρχει στον πλανήτη (ανακύκλωση των κύριων χημικών στοιχείων στη φύση) και σε πολλούς σημαντικούς τομείς της καθημερινής ζωής του ανθρώπου (παραγωγή τροφίμων, φαρμακευτικών και χημικών προϊόντων).

Για τον ένα ή τον άλλο λόγο (ασθένειες ή ευεργετήματα) πολλές φορές είναι απαραίτητη η ανίχνευση, απομόνωση και καλλιέργεια των μικροοργανισμών. Με την άσκηση αυτή θα διαπιστώσουμε την παρουσία και την ποικιλία μιας ομάδας μικροοργανισμών, των βακτηρίων, στο άμεσο περιβάλλον μας.

Τα βακτήρια που τυχόν υπάρχουν σε ένα δείγμα, στις κατάλληλες συνθήκες, πολλαπλασιάζονται και σχηματίζουν αποικίες σε στερεό θρεπτικό μέσο. Μια αποικία είναι διακριτή με γυμνό μάτι ως μια οντότητα και σχηματίζεται από ένα μόνο αρχικό κύτταρο αφού πολλαπλασιαστεί πολλές φορές. Τα διάφορα είδη βακτηρίων δημιουργούν αποικίες με διαφορετική μορφολογία (Σχήμα 6). Έτσι η παρουσία βακτηρίων σε ένα δείγμα θα διαπιστωθεί από τις αποικίες που θα εμφανιστούν, ενώ η ποικιλότητα των βακτηρίων θα διαπιστωθεί από τη διαφορετική μορφολογία των αποικιών. Η αναγνώριση (ταυτοποίηση) των βακτηρίων μιας αποικίας είναι διαδικασία πολύπλοκη και περιλαμβάνει συγκεκριμένες χρώσεις και βιοχημικούς ελέγχους, ορισμένοι από τους οποίους παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.



Σχήμα 6. Μορφολογικά χαρακτηριστικά αποικιών βακτηρίων.

ΠΙΝΑΚΑΣ 3

Ιδιότητες που βοηθούν στην αναγνώριση των Gram θετικών κόκκων

Ιδιότητες	***Staphylococcus aureus***	***Micrococcus***	***Streptococcus***
Καταβολισμός γλυκόζης	+	-	+
Ανάπτυξη σε Mannitol salt agar	+	-	+/-
Αναγωγή νιτρικών	+	ποικίλει	-
Παραγωγή καταλάσης	+	+	-
Αντίδραση οξειδάσης	+	+/-	-

Υλικά και συσκευές

- Ένας αποστειρωμένος δοκιμαστικός σωλήνας.
- Μια κωνική φιάλη με 1L αποσταγμένο νερό.
- Τέσσερα τριβλία με θρεπτικό άγαρ.
- Παστεριωμένο γάλα.
- Χώμα.
- Ένας δοκιμαστικός σωλήνας που περιέχει 2ml PBS και ένα βαμβακοφόρο στυλεό.
- Ένα μπουκάλι με 15ml αποστειρωμένο νερό.
- Ρύγχη για μικροπιπέττες.
- Πιπέττες, μικροπιπέττες, πιπέττες παστέρ.
- Σωλήνες eppendorf.
- Μικροβιολογικός κρίκος.
- Ποτήρια ζέσεως με οινόπνευμα.
- Επωαστικοί κλίβανοι στους 30°C και 37°C και υδατόλουτρο στους 70°C.
- Ζυγός.
- Αναδευτήρας.

Πειραματικό μέρος

Α. Απομόνωση βακτηρίων από το ανθρώπινο σώμα

1. Εμβαπτίστε ένα βαμβακοφόρο στυλεό σε PBS με τον οποίο στη συνέχεια τρίβετε καλά μια επιφάνεια του σώματός σας.
2. Ακουμπήστε το βαμβακοφόρο στυλεό σε ένα τριβλίο με TSA άγαρ και γυρνώντας τον απαλά καλύψτε όλη την επιφάνεια του τριβλίου.
3. Επωάστε το τριβλίο για 24-72 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου.
4. Μετά το τέλος της επώασης, μετρήστε τον αριθμό των αποικιών, και παρατηρήστε τα μορφολογικά χαρακτηριστικά τους.

Β. Απομόνωση βακτηρίων από τον αέρα

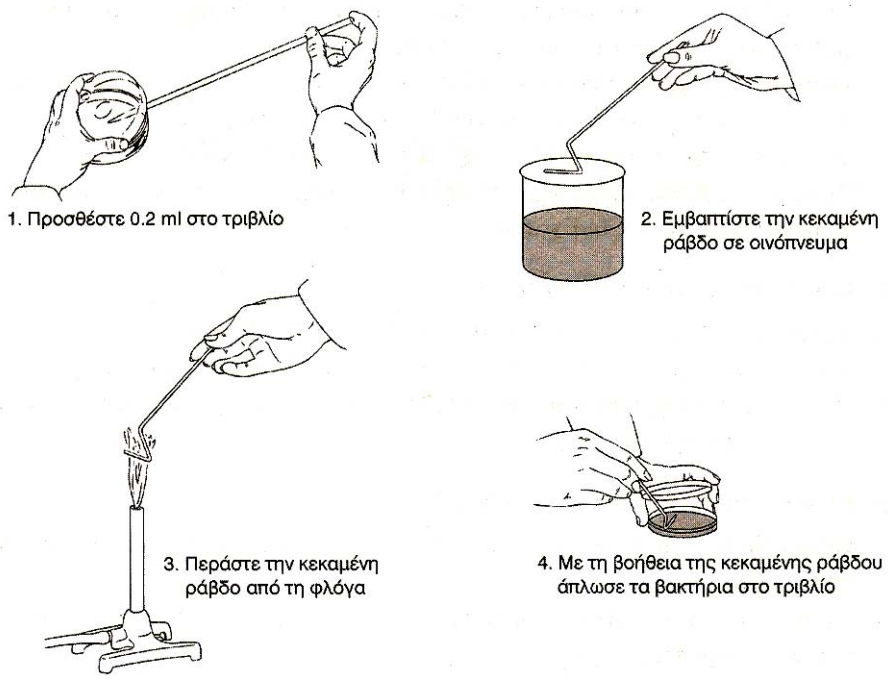
1. Αφήστε ανοιχτό ένα τριβλίο με θρεπτικό άγαρ για 30min.
2. Επωάστε το τριβλίο αυτό σε θερμοκρασία δωματίου για 10-15 ημέρες.
3. Μετά το τέλος της επώασης, παρατηρήστε τη μορφολογία των αποικιών και μετρήστε τον αριθμό τους.

Γ. Απομόνωση βακτηρίων από τροφές (γάλα)

1. Μεταφέρετε 1ml παστεριωμένου γάλακτος σε 9ml αποσταγμένου και αποστειρωμένου νερού.
2. Αφού ανακινήσετε καλά τη φιάλη, πάρτε 0.2ml και επιστρώστε τα σε ένα τριβλίο με θρεπτικό άγαρ.
3. Επωάστε το τριβλίο αυτό σε αναποδογυρισμένη θέση στους 37°C για 24 ώρες.
4. Μετά το τέλος της επώασης, παρατηρήστε τη μορφολογία των αποικιών και μετρήστε τον αριθμό τους.

Δ. Απομόνωση βακτηρίων από το έδαφος

1. Ζυγίστε 0.1gr χώματος και εναιωρήστε το σε 1L αποσταγμένου νερού.
2. Πάρτε με πιπέττα 0.2ml από το εναιώρημα αυτό και επιστρώστε το σε ένα τριβλίο με θρεπτικό άγαρ (η επίστρωση γίνεται όπως περιγράφεται στο Σχήμα 7).
3. Επωάστε το τριβλίο αυτό σε αναποδογυρισμένη θέση (έτσι ώστε το καπάκι του τριβλίου να ακουμπά στον κλίβανο) στους 30°C για 24 ώρες.
4. Επαναλάβετε τα στάδια (2) και (3) με τη μόνη διαφορά ότι θα χρησιμοποιήσετε τριβλίο με Sabouraud άγαρ, το οποίο ευνοεί την ανάπτυξη μυκήτων.
5. Πάρτε με πιπέττα 0.5ml από το εναιώρημα χώματος και τοποθετήστε το σε ένα σωλήνα eppendorf.
6. Επωάστε το σωλήνα αυτό σε υδατόλουτρο στους 70°C για 25min.
7. Μετά το τέλος της επώασης, πάρτε με πιπέττα 0.2ml από το σωλήνα και επιστρώστε το σε ένα τριβλίο με θρεπτικό άγαρ (Σχήμα 7).
8. Επωάστε το νέο τριβλίο σε αναποδογυρισμένη θέση στους 30°C για 24 ώρες.
9. Μετά το τέλος της επώασης παρατηρήστε τις αποικίες βακτηρίων που θα αναπτυχθούν στα δύο τριβλία. Σε ποιο από τα δύο τριβλία αναπτύχθηκαν περισσότερα μικρόβια;

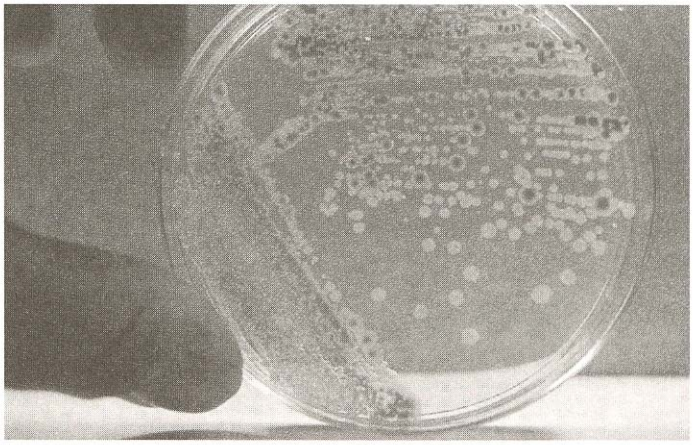


Σχήμα 7. Επίστρωση καλλιέργειας σε τριβλίο.

ΑΣΚΗΣΗ 4

Καθαρές καλλιέργειες

Στη φύση τα βακτήρια αναπτύσσονται σε ετερογενείς πληθυσμούς. Για τη μελέτη ενός βακτηρίου απαιτείται η ανάπτυξή του σε καθαρή καλλιέργεια, δηλαδή καλλιέργεια που περιέχει ένα μόνο είδος βακτηρίου. Η απομόνωση ενός βακτηρίου από ένα μικτό πληθυσμό στηρίζεται στη δημιουργία, σ' ένα στερεό θρεπτικό μέσο, απομακρυσμένων μονών αποικιών με ευκρινή όρια. Έτσι από ένα τριβλίο που περιέχει ένα μικτό πληθυσμό βακτηρίων (Σχήμα 8), συλλέγεται με μικροβιολογικό κρίκο μια απομακρυσμένη από τις άλλες αποικία και μεταφέρεται σε ένα θρεπτικό υπόστρωμα (υγρό ή στερεό). Μετά από επώαση τα βακτήρια που θα προκύψουν προέρχονται όλα από το ίδιο αρχικό κύτταρο και επομένως είναι όλα ίδια μεταξύ τους και αποτελούν μια καθαρή καλλιέργεια.



Σχήμα 8. Παρατηρήστε τη μορφολογία των αποικιών: μεγάλες σκουρόχρωμες (*S. marcescens*), μεγάλες ανοιχτόχρωμες (*M. leteus*) και μικρές ανοιχτόχρωμες (*E. coli*).

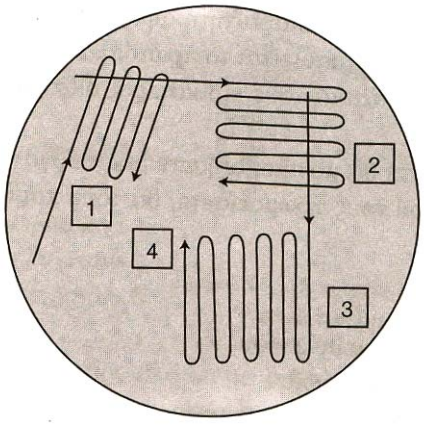
Υλικά και συσκευές

- Μικροβιολογικός κρίκος.
- Επωαστικός κλίβανος.
- Ένα τριβλίο με θρεπτικό άγαρ.
- Τα τριβλία της άσκησης 3.

Πειραματικό μέρος

Διαλέξτε μια καλά απομακρυσμένη από τις άλλες αποικία από οποιοδήποτε τριβλίο της άσκησης 3 (Μικροοργανισμοί και περιβάλλον).

1. Αφού αποστειρώσετε το μικροβιολογικό κρίκο πάρτε ένα μέρος από την αποικία που διαλέξατε.
2. Απλώστε τα βακτήρια που βρίσκονται στον κρίκο πάνω στην επιφάνεια του θρεπτικού μέσου ενός τριβλίου, με τον τρόπο που περιγράφεται στο Σχήμα 9.
3. Επωάστε το τριβλίο στην κατάλληλη θερμοκρασία για 24 ώρες.
4. Μετά το τέλος της επώασης, ελέγξτε τη μορφολογία των αποικιών



Σχήμα 9. Άπλωμα βακτηρίων σε τριβλίο, με τέτοιο τρόπο ώστε να σχηματιστούν απομονωμένες αποικίες. Τα τόξα δείχνουν την κίνηση του μικροβιολογικού κρίκου. Οι αριθμοί δείχνουν τα στάδια στα οποία πρέπει να αποστειρώνεται με πυράκτωση στη φλόγα ο μικροβιολογικός κρίκος.

ΑΣΚΗΣΗ 5

Προσδιορισμός του αριθμού βακτηρίων

Υπάρχουν πολλές μέθοδοι για τον ποσοτικό προσδιορισμό των βακτηρίων μιας καλλιέργειας: Με Μικροσκοπία π.χ. είναι δυνατόν να μετρηθεί ο αριθμός των μικροοργανισμών σ' ένα δείγμα γνωστού όγκου. Με Φωτομετρία μπορεί να υπολογισθεί η συγκέντρωση των βακτηρίων σε μία καλλιέργεια αφού όσο μεγαλύτερος ο αριθμός των βακτηρίων που περιέχεται σ' ένα θρεπτικό μέσο τόσο μεγαλύτερη η θολότητα της καλλιέργειας και μικρότερη η ποσότητα του φωτός που φτάνει στο φωτοευαίσθητο κύτταρο του φωτόμετρου. Η μάζα των κυττάρων, όπως εκφράζεται από το ξηρό βάρος των βακτηρίων, αποτελεί μια άλλη μέθοδο για τη μέτρηση της βακτηριακής ανάπτυξης. Στο ίδιο συμπέρασμα καταλήγουμε με μέτρηση ορισμένων προϊόντων των βακτηρίων όπως π.χ. συσσώρευση οξέος ή αλκάλεως. Οι μέθοδοι αυτές ποικίλουν και η ακρίβειά τους εξαρτάται από τους μικροοργανισμούς στους οποίους εφαρμόζονται.

Ακολουθεί περιγραφή των δύο συνηθέστερων μεθόδων που βρίσκουν εφαρμογή στα πιο πολλά βακτήρια.

Α. Αρίθμηση ζωντανών βακτηρίων

Επειδή κάθε ζωντανό κύτταρο σε κατάλληλες συνθήκες ανάπτυξης δίνει μια αποικία θυγατρικών κυττάρων, που είναι ορατή με γυμνό μάτι, είναι δυνατό να χρησιμοποιηθεί η ιδιότητα αυτή για τον ποσοτικό προσδιορισμό των βακτηρίων που βρίσκονται σ' ένα δείγμα. Για να εφαρμοσθεί η μέθοδος αυτή με επιτυχία θα πρέπει να ληφθεί πρόνοια έτσι ώστε ο αριθμός των αποικιών που αναπτύσσονται σ' ένα τριβλίο να είναι προσιτός σε αρίθμηση. Αυτό πετυχαίνεται με διαδοχικές αραιώσεις του αρχικού δείγματος πριν την επίστρωσή του σε τριβλία με άγαρ. Ο υπολογισμός του αριθμού των βακτηρίων στο αρχικό δείγμα γίνεται αν πολλαπλασιασθεί ο αριθμός των αποικιών που μετριέται σε μια συγκεκριμένη αραίωση του δείγματος επί το συντελεστή της αραίωσης επειδή τα αποτελέσματα εκφράζονται συνήθως ανά κ.εκ. (ml) της αρχικής καλλιέργειας, θα πρέπει το γινόμενο αυτό να διαιρεθεί δια του όγκου που χρησιμοποιήθηκε στην επίστρωση, όπως δείχνει ο τύπος:

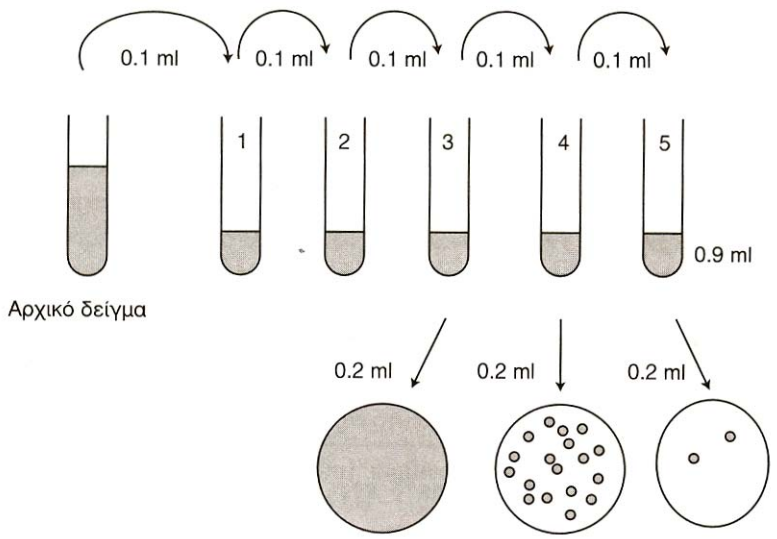
$$\frac{\text{αριθμός αποικιών X συντελεστή αραίωσης}}{\text{ποσότητα που επιστρώθηκε (ml)}} = \text{cfu*/ml}$$

Υλικά και συσκευές

- Ένας δοκιμαστικός σωλήνας με 20ml θρεπτικού ζωμού (NB) (5ml για τις αραιώσεις του μέρους (α), 10ml για τις αραιώσεις του μέρους (β) και 5ml για να χρησιμοποιηθεί ως τυφλό κατά τη φωτομέτρηση).
- Ένας δοκιμαστικός σωλήνας με 2ml καλλιέργειας *E. coli* (OD_{600} 0.2).
- Ένας δοκιμαστικός σωλήνας με 10ml καλλιέργειας *E. coli* (OD_{600} 0.9).
- Πέντε σωλήνες eppendorf για τις αραιώσεις.
- Δυο κυψελίδες για φωτομέτρηση.
- Τρία τριβλία με θρεπτικό άγαρ.
- Τρεις δοκιμαστικοί σωλήνες.
- Κεκαμένη πιπέττα παστέρ.
- Μικροπιπέττες, πιπέττες 1 και 5 ml.
- Ρύγχη των 200μl και 1000μl για μικροπιπέττες.
- Φωτόμετρο.
- Επωαστικός κλίβανος στους 37°C.

Πειραματικό μέρος

1. Σε πέντε δοκιμαστικούς σωλήνες προσθέστε 0.9ml NB, όπως δείχνει το Σχήμα 10.



Σχήμα 10. Μέτρηση του αριθμού ζωντανών βακτηρίων με διαδοχικές αραιώσεις και επίστρωση σε τριβλία.

* cfu = colony forming units,
δηλαδή βακτήρια που σχηματίζουν αποικίες.

2. Πάρτε 0.1ml από το αρχικό εναιώρημα των βακτηρίων (OD_{600} 0.2) και τοποθετήστε το στον πρώτο σωλήνα. Ποιος ο συντελεστής αραίωσης ως προς το αρχικό εναιώρημα;
3. Ανακινήστε καλά τον πρώτο σωλήνα και μεταφέρετε 0.1ml στο δεύτερο σωλήνα. Ποιος ο συντελεστής αραίωσης ως προς το αρχικό εναιώρημα;
4. Επαναλάβετε την ίδια διαδικασία μέχρι να φτάσετε στον πέμπτο σωλήνα.
5. Ποιος ο συντελεστής αραίωσης κάθε σωλήνα ως προς το αρχικό εναιώρημα;
6. Ανακινήστε καλά τον τελευταίο σωλήνα και μεταφέρετε 0.2ml σε ένα τριβλίο που περιέχει θρεπτικό άγαρ.
7. Χρησιμοποιώντας κεκαμένη πιπέττα paster, επιστρώστε τα 0.2ml σε όλη την επιφάνεια του τριβλίου.
8. Επαναλάβετε την ίδια διαδικασία για τους σωλήνες 4 και 3.
9. Επωάστε τα τριβλία για 24 ώρες στους 37°C.
10. Μετρήστε τον αριθμό των αποικιών από τα κατάλληλα τριβλία και υπολογίστε τον αριθμό βακτηρίων ανά ml του αρχικού εναιωρήματος. Γιατί επιστρώνετε σε τριβλία πρώτα με το περιεχόμενο του σωλήνα 5, μετά του σωλήνα 4 και τελευταία του 3;

Β. Φωτομετρική αρίθμηση μικροβίων

Μια βακτηριακή καλλιέργεια μπορεί να θεωρηθεί ως κολλοειδές διάλυμα. Έτσι όταν μια πηγή μονοχρωματικού φωτός προσπέσει σε μια βακτηριακή καλλιέργεια ένα μέρος του φωτός θα διαπεράσει την καλλιέργεια (transmitted light), ενώ ένα άλλο μέρος του θα απορροφηθεί, λόγω πρόσπτωσής του στα κύτταρα. Συνεπώς, όσο αυξάνεται η συγκέντρωση των κυττάρων μιας καλλιέργειας τόσο ελαττώνεται η ποσότητα του φωτός που τη διαπερνά. Οι μεταβολές αυτές μπορούν να μετρηθούν με ένα φωτόμετρο (Σχήμα 11) το οποίο μετατρέπει την ένταση του φωτός σε ηλεκτρική ενέργεια που στη συνέχεια καταγράφεται και εμφανίζεται στην οθόνη ως οπτική απορρόφηση. Η οπτική απορρόφηση είναι ευθέως ανάλογη της συγκέντρωσης των κυττάρων όπως φαίνεται από την ακόλουθη εξίσωση:

$$A = \log T_0 - \log T_1 \qquad (1)$$

Όπου: A = οπτική απορρόφηση

T_0 = το ποσοστό του φωτός που διαπερνά το θρεπτικό μέσο της καλλιέργειας (χωρίς μικροοργανισμούς)

T_1 = το ποσοστό του φωτός που διαπερνά την προς μέτρηση καλλιέργεια

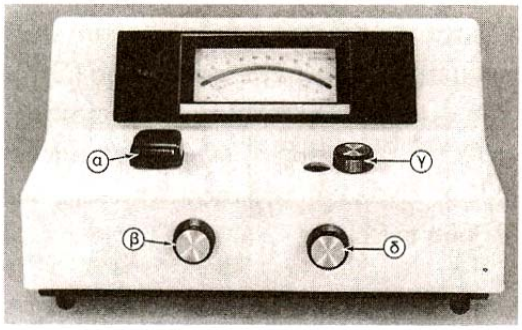
Για να είναι οι μετρήσεις μικροοργανισμών που αναπτύσσονται στο ίδιο ή σε διαφορετικά θρεπτικά μέσα συγκρίσιμες μεταξύ τους, θα πρέπει το

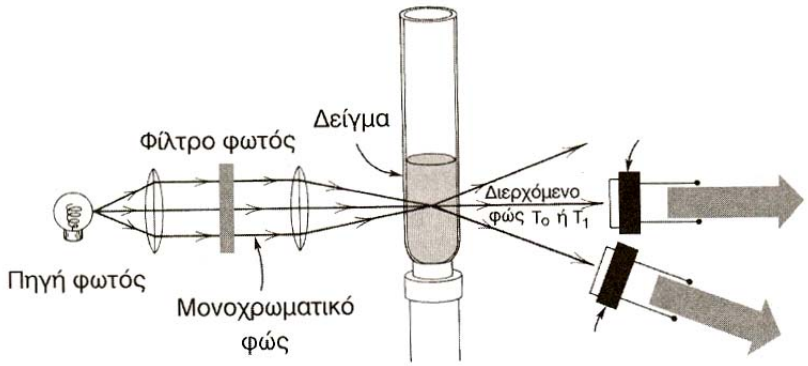
φωτόμετρο να ρυθμίζεται έτσι ώστε η μεταφορά του φωτός δια του θρεπτικού μέσου να αντιστοιχεί στο 100%.

Έτσι η εξίσωση (1) γίνεται $A = \log 100 - \log T_1 = 2 - \log T_1$,

Πειραματικό μέρος

1. Αριθμήστε 3 δοκιμαστικούς σωλήνες (1, 2, 3) και στους δύο από αυτούς (2, 3) προσθέστε 4ml θρεπτικό ζωμό.
2. Προσθέστε 4ml από την καλλιέργεια *E. coli* (OD_{600} 0.9) στους δοκιμαστικούς σωλήνες 1 και 2.
3. Ανακινήστε καλά το δοκιμαστικό σωλήνα 2 και μεταφέρετε 4ml στο δοκιμαστικό σωλήνα 3. Ποια είναι η αραίωση της αρχικής καλλιέργειας στους δοκιμαστικούς σωλήνες 2 και 3;
4. Ανοίξτε το φωτόμετρο (κουμπί β, Σχήμα 11).
5. Ρυθμίστε το μήκος κύματος στα 600nm (κουμπί δ, Σχήμα 11).
6. Χρησιμοποιώντας το κουμπί β ρυθμίστε το φωτόμετρο έτσι ώστε η ένδειξη για το διερχόμενο φως (transmittance) να είναι 0 και για το απορροφούμενο άπειρο.
7. Τοποθετήστε την κυψελίδα με το τυφλό (μόνο θρεπτικό μέσο). Ρυθμίστε με το κουμπί γ έτσι ώστε η ένδειξη για απορρόφηση (absorbance) να είναι 0 που για το διερχόμενο φως αντιστοιχεί στο άπειρο.
8. Τοποθετήστε διαδοχικά στην κυψελίδα το περιεχόμενο των σωλήνων 1, 2 και 3 και μετρήστε την οπτική απορρόφησή τους.





Σχήμα 11. Σύνηθες φωτόμετρο.

ΑΣΚΗΣΗ 6

Χρώση Gram

Είναι μια σύνθετη, θετική χρώση, από τις πιο σημαντικές στη βακτηριολογία η χρώση κατά Gram από το όνομα του Δανού επιστήμονα Christian Gram που την ανακάλυψε το 1880. Η χρώση Gram ανήκει στις λεγόμενες διαφορικές χρώσεις και χρησιμοποιήθηκε ευρύτατα στην ταξινόμηση και μελέτη των βακτηρίων.

Ανάλογα με την αντίδραση που παρουσιάζουν τα βακτήρια στη χρώση Gram διακρίνονται σε δυο μεγάλες κατηγορίες στα Gram θετικά [Gram (+)] και στα Gram αρνητικά [Gram (-)].

Με τη χρώση αυτή επιτυγχάνεται η προκαταρκτική ταυτοποίηση των βακτηρίων.

Μηχανισμός της κατά Gram χρώσης

Προηγείται της χρώσης η μονιμοποίηση - προσήλωση των κυττάρων με θέρμανση (πήξη των πρωτεϊνών του πρωτοπλάσματος και σταθεροποίηση της κυτταρικής δομής). Κατά την πρώτη φάση της μεθόδου τα κύτταρα χρωματίζονται με κρυσταλλικό ιώδες που δίνει σ'όλα τα βακτήρια σκούρο μπλε χρώμα. Η περίσσεια της χρωστικής ξεπλένεται με νερό και ακολουθεί προσθήκη διαλύματος ιωδιούχου καλίου (Lugol- πρόστυμμα), που σχηματίζει μέσα στο κύτταρο σύμπλοκο με το κρυσταλλικό ιώδες. Το σύμπλοκο αυτό είναι διαλυτό στους οργανικούς διαλύτες (αλκοόλη - ακετόνη) με την εφαρμογή των οποίων επιχειρείται αποχρωματισμός των κυττάρων. Τα κύτταρα των βακτηρίων που χαρακτηρίζονται ως Gram (+) δεν αποχρωματίζονται και παραμένουν σκούρα μπλε. Σε μια δεύτερη φάση μόνο τα κύτταρα που αποχρωματίστηκαν επαναχρωματίζονται με μια δεύτερη χρωστική, τη σαφρανίνη. Τα βακτήρια αυτά χρωματίζονται κόκκινα και χαρακτηρίζονται ως Gram (-). Τα κύτταρα των Gram (+) μετά τη χρώση εξακολουθούν να είναι μπλε.

Η συμπεριφορά των βακτηρίων στη χρώση Gram συνδέεται με συγκεκριμένες διαφορές δομής των κυτταρικών τοιχωμάτων στις δυο κατηγορίες των Gram (+) και Gram (-) βακτηρίων.

Κύριο συστατικό του κυτταρικού τοιχώματος των βακτηρίων αποτελεί η μουρεϊνη μια πεπτιδογλυκάνη.

Στα Gram (+) βακτήρια το κυτταρικό τοίχωμα αποτελείται από μια παχιά στοιβάδα μουρεϊνης με την οποία είναι ενωμένα τειχοϊκά οξέα (ποσοστό μέχρι 50%του ξηρού βάρους των τοιχωμάτων) και πολυσακχαρίτες (σε μικρότερα ποσοστά). Στα Gram (-) βακτήρια το τοίχωμα έχει δύο βασικές στοιβάδες εξωτερικά μια παχιά στοιβάδα (μέχρι το 80% του τοιχώματος) από λιποπρωτεϊνες και λιποπολυσακχαρίτες και εσωτερικά μια λεπτή στοιβάδα από μουρεϊνη.

Στις παραπάνω διαφορές οφείλεται η διαφορική χρώση βακτηρίων σε Gram (+) και Gram (-). Στα Gram (-) ο οργανικός διαλύτης διαλύει τη στοιβάδα των λιποπολυσακχαριτών και η λεπτή στοιβάδα της μουρεϊνης γίνεται περατή και δεν συγκρατεί το σύμπλοκο κρυσταλλικού ιώδους - ιωδιούχου καλίου που διαλύεται στο διάλυμα αλκοόλης - ακετόνης και απομακρύνεται. Έτσι το κύτταρο αποχρωματίζεται. Αντίθετα, στα Gram (+) ο οργανικός διαλύτης απλά αφυδατώνει την παχιά στοιβάδα της μουρεϊνης μειώνοντας την περατότητά της για το λόγο αυτό όχι μόνο δεν είναι δυνατή η έξοδος του συμπλόκου αλλά εμποδίζεται και η είσοδος της σαφρανίνης και τα κύτταρα παραμένουν μπλε. Όμως στα Gram (-), η σαφρανίνη εισέρχεται εύκολα και τα χρωματίζει κόκκινα.

Υλικά και συσκευές

1. Διάλυμα κρυσταλλικού ιώδους (crystal violet ή violet de genthiane)

A. Κρυσταλλικό ιώδες (crystal violet)	2.0g
Αιθανόλη 95 (Ethyl alcohol)	20ml
B. Οξαλικό αμμώνιο (Ammonium oxalate)	0.8g
D.W	80ml

Αναμιγνύεται το Α με το Β διάλυμα. Αφήνεται επί 24 ώρες να συμπληρωθεί η διάλυση της χρωστικής. Διηθείται και φυλάγεται σε σκοτεινόχρωμη φιάλη.

2. Διάλυμα Lugol

Ιώδιο κρυσταλλικό (iodine crystals)	1.0g
Ιωδιούχο κάλιο (potassium iodine)	2.0g
D.W	200ml

Το ιώδιο και το ιωδιούχο κάλιο λειοτριβούνται, διαλύονται σε μικρή ποσότητα νερού και συμπληρώνεται μέχρι τα 200ml. Το διάλυμα φυλάγεται σε σκοτεινόχρωμη φιάλη.

3. Διάλυμα αποχρωματισμού.

Για κανονικό αποχρωματισμό χρησιμοποιείται διάλυμα ίσων όγκων αιθανόλης 95% (Ethyl alcohol) και ακετόνης (Acetone). Η αιθανόλη επιφέρει βραδύ αποχρωματισμό ενώ η ακετόνη ταχύτατο.

4. Διάλυμα σαφρανίνης

Μητρικό διάλυμα

Σαφρανίνη (safranin)	2.5g
Αιθανόλη 95% (Ethyl alcohol)	100ml

Το διάλυμα που χρησιμοποιείται προκύπτει από την αραίωση του μητρικού διαλύματος σε απεσταγμένο νερό και σε αναλογία 1: 10

Αντίστοιχα μπορεί να χρησιμοποιηθεί 1: 10 διάλυμα πυκνής φαινικούχου φουξίνης ή χρωστικής Ziehl – Neelsen.

5. Πλακάκια, επικαλυπτρίδες, λαβίδες.
6. Μικροσκόπιο.

Πειραματικό μέρος

1. Παρασκευή επιχρίσματος, ξήρανση, μονιμοποίηση.
2. Κάλυψη του παρασκευάσματος με διάλυμα κρυσταλλικού ιώδους για 60 sec.
3. Απόρριψη του διαλύματος, ξέπλυμα με νερό βρύσης και κάλυψη με διάλυμα Lugol για 1-2 min.
4. Απόρριψη του διαλύματος, ξέπλυμα με νερό.
5. Αποχρωματισμός του παρασκευάσματος με διάλυμα αλκοόλης - ακετόνης για 15sec.
6. Ξέπλυμα με νερό βρύσης.
7. Κάλυψη (μετάχρωση) του παρασκευάσματος με αραιωμένο διάλυμα σαφρανίνης ή αραιωμένο διάλυμα πυκνής φαινικούχου φουξίνης για 30-60 sec.
8. Ξέπλυμα με νερό βρύσης.
9. Ξήρανση.
10. Παρατήρηση στο μικροσκόπιο.

Η μικροσκόπηση γίνεται με τη βοήθεια καταδυτικού φακού .Τα Gram (+) μικρόβια έχουν χρώμα βαθύ κυανό (ιώδες) και τα Gram (-) έχουν χρώμα κόκκινο.

Η ηλικία των κυττάρων επηρεάζει την αντίδραση στη χρώση Gram, καθώς και το μέσο στο οποίο καλλιεργήθηκε ο μικροοργανισμός.