دانشگاه اصفهان
دانشکده علوم و فناوری های زیستی، گروه زیست شناسی سلولی و مولکولی و میکروبیولوژی، آزمایشگاه میکروبیولوژی

بسم الله الرحمن الرحیم

آزمایشگاه میکروب

تست های بیوشیمیایی

قند– اوره –سیترات– هیدرولیز ژلاتین– MR-VP -SIM

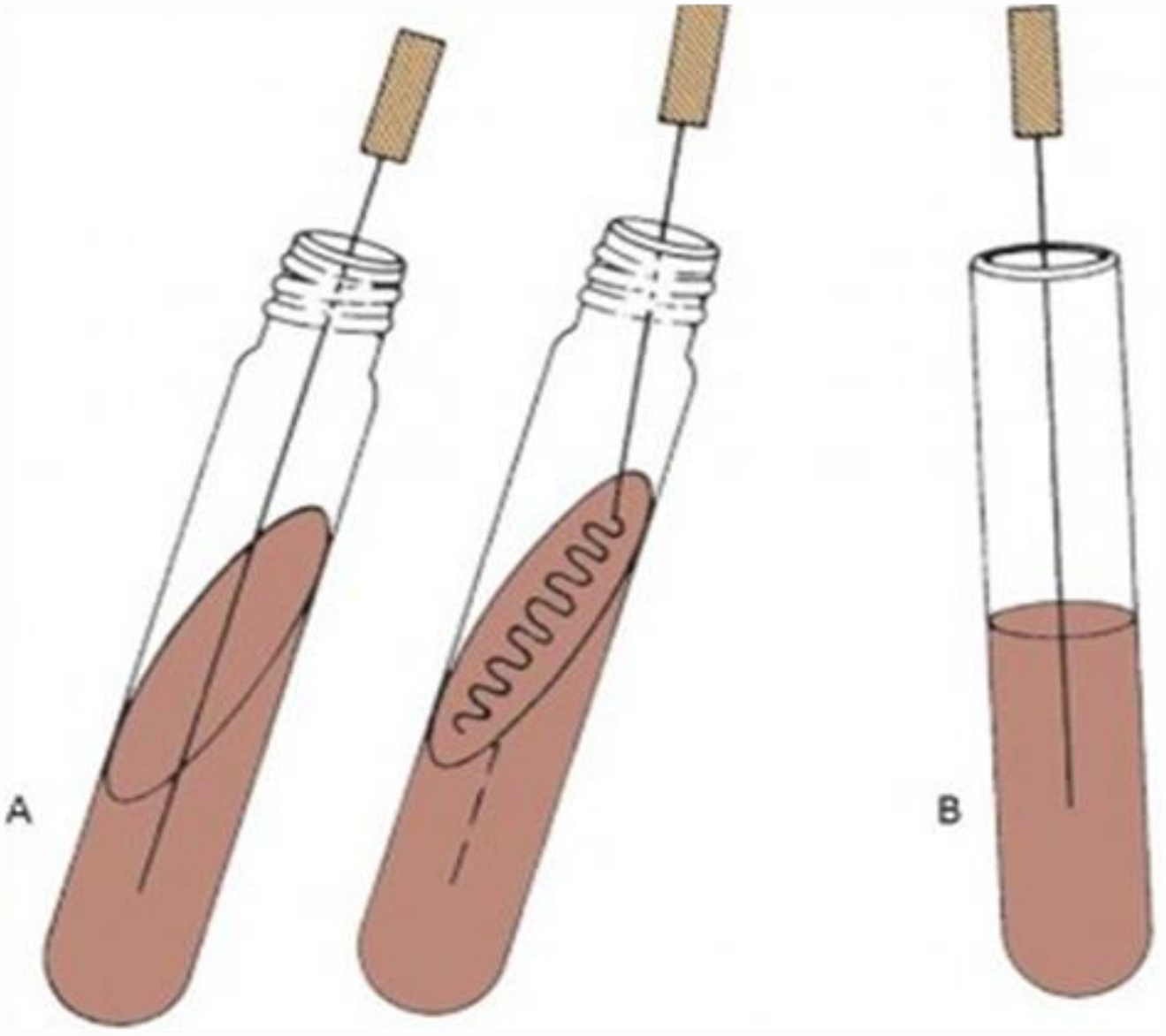
تهیه کننده : سهیلا عباسی

زمینه ی نظری

- تست های بیوشیمیایی برای تشخیص باکتری جنس وگونه آن استفاده می شود. پایه و اساس این تست آنزیم های متابولیکی باکتری ها هستند. این آنزیم ها می تواند با اثر بر سوبسترای خود pH، یا رنگ محیط را تغییر دهند و یا موجب تغییر در معرف شوند.

تهیه کننده : سهیلا عباسی

روش کشت در محیط اسلنت



3

تهیه کننده : سهیلا عباسی

تست تخمیر کربوهیدرات

برای این آزمایش از محیط PHENOL RED BROTH استفاده می شود که حاوی معرفpH فنل رد، پپتیدو یک نوع کربوهیدرات است. باکتری هایی که قند فوق را تخمیر می کنند مواد اسیدی تولید کرده و رنگ محیط از قرمز به زرد تغییر می کند. تولید گاز نیز معیاری از تخمیر هیدرات کربن است. اگر باکتری قادر به تخمیر قند نباشد پپتیدها را تجزیه کرده و آمونیوم تولید می شود که رنگ محیط همچنان قرمز باقی می ماند.

تهیه کننده : سهیلا عباسی

5

تهیه کننده : سهیلا عباسی

Penol Red broths

A B C D E

A (acid with gas).....B (acid)……C (uninoculated control)……D (no recation)… …E (alkaline reaction)

تهیه کننده : سهیلا عباسی

- **تست سیترات**

- تست سیترات برای شناسایی باکتری های دارای سیتراتاز است. سیتراتاز، سیترات را به اگزالواستات و پیروات می شکند، که پیروات با CO_2واکنش داده و محیط را قلیایی می کند. برای این آزمایش محیط کشت فقط باید دارای سیترات باشد. همچنین آگار آن شیب دار (Slant) است.

تهیه کننده : سهیلا عباسی

آزمون مصرف سیترات

سدیم سیترات، نمک اسید سیتریک و یک ترکیب آلی است که در سیکل کربن متابولیزه شده و می‌تواند منبع کربن محسوب شود. برخی از ارگانیسم‌ها می‌توانند انرژی موردنیاز خود را با استفاده از سدیم سیترات به‌عنوان تنها منبع کربن و از نمک‌های آمونیوم غیر ارگانیک به‌عنوان تنها منبع نیتروژن بدست آورند. باکتری‌هایی که قادرند سیترات را به‌عنوان تنها منبع کربن و انرژی و نمک آمونیوم را به‌عنوان تنها منبع ازت جهت رشد خود به کار برند قادرند محیط سیمون سیترات (سبز رنگ) که حاوی معرف بروموتیمول بلو است را به رنگ آبی تبدیل کنند.

محیط سیمون سیترات آگار حاوی نمک‌ها، کاتیون‌ها، بافرهای سیترات و بروم‌تیمول آبی به‌عنوان اندیکاتور است و می‌تواند در pH قلیایی (بالاتر از ۷/۶) و در جریان تولید ترکیبات قلیایی (ترکیبات آمونیوم) حاصل از مصرف سیترات تولید رنگ آبی در محیط نماید. باید توجه کرد که هر محیطی که برای تعیین استفاده از سیترات بکار می‌رود، باید فاقد پروتئین و کربوهیدرات به‌عنوان منابع دیگر کربن باشد.

تهیه کننده : سهیلا عباسی

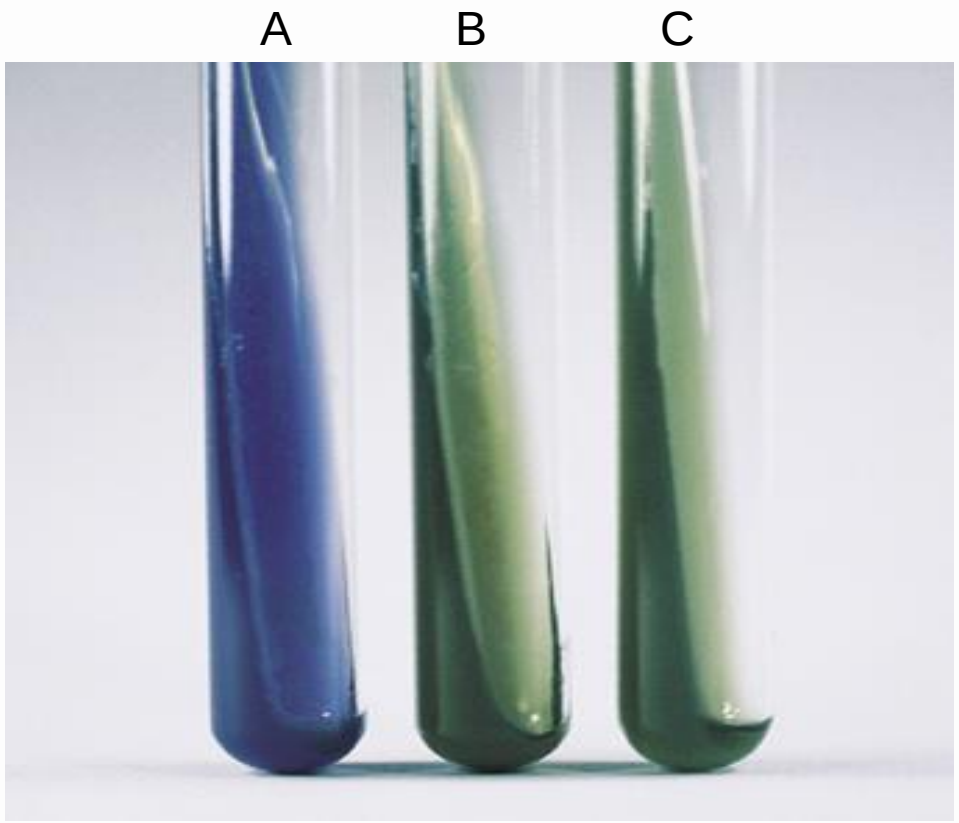
مراحل انجام کار:

مقدار خیلي کم از ارگانیسم موردنظر (۱-۲ کلنی ایزوله) را در سطح آگار شیب‌دار سیمون سیترات تلقیح می‌کنیم.

به مدت ۲۴-۴۸ ساعت لوله را در ۳۵-۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه می‌نماییم. ایجاد رنگ آبی نشان‌دهنده واکنش مثبت است.

تهیه کننده : سهیلا عباسی

Simmons Citrate



A: Positive…Enterobacter

B: Negative…E. coli

C: Control-uninoculated

تهیه کننده : سهیلا عباسی

- تست اوره برای سنجش اوره آز در باکتری ها است. اوره آز، اوره را به CO_2و NH_3 تجزیه می کند. اگر رنگ محیط ارغوانی یا صورتی شود تست + است. همچنین آگار آن شیب دار (Slant)است.

تهیه کننده : سهیلا عباسی

تست اوره‌آز

اوره‌آز آنزیمی است که بعضی از ارگانیسم‌ها آن را تولید کرده و اوره را به دی‌اکسید کربن، آب و آمونیاک هیدرولیز می‌کنند. آمونیاک در محلول به کربنات آمونیوم تبدیل شده و باعث قلیایی شدن محیط و بالا رفتن pH می‌شود. از این آزمون می‌توان برای افتراق انتروباکتریاسه‌ها، افتراق بین گونه‌های بروسلا، شناسایی گونه‌های مهمی نظیر کورینه‌باکتریوم اوره‌آلیتیکوم، هلیکوباکترپیلوری، تشخیص مخمرهای کپسول‌دار و به‌عنوان یک تست اضافی برای تشخیص بعضی کوکوباسیل‌های گرم منفی استفاده کرد.

تهیه کننده : سهیلا عباسی

Urea agar

pos uninoculated neg

تهیه کننده : سهیلا عباسی

Urea Hydrolysis

تهیه کننده : سهیلا عباسی

• محیط SIM محیطی است نیمه جامد و زرد کم رنگ که به واسطه آن سه آزمایش تولید H2Sتولید اندول و حرکت باکتری ها مورد بررسی قرار می گیرد. این محیط فقط دارای عمق است و به صورت Stab کشت داده می شود.

• تولید اندول به وسیله اضافه کردن چند قطره معرف کوآکس برسطح محیط SIM و تغییر رنگ معرف به صورتی تا بنفش نمایان می شود.حرکت باکتری نیز که در تشخیص انواع باکتری از آن استفاده می شود به واسطه وجود کدورت در اطراف محل ورود آنس در این محیط پس از ۲۴ ساعت مشخص می گردد.

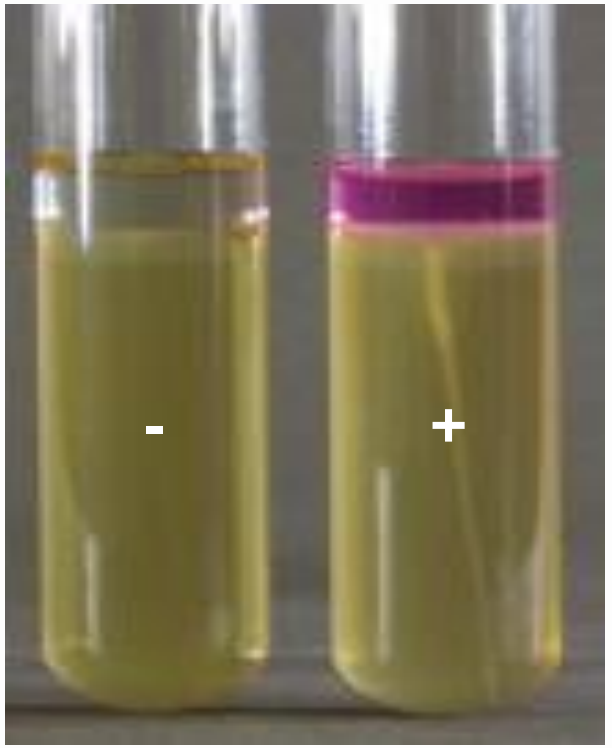
تهیه کننده : سهیلا عباسی

- تست **SIM** که برای سنجش ایندول، SH2 و توانایی حرکت باکتری است. اندول به وسیله اضافه کردن چند قطره معرف کوآکس برسطح محیط SIM و تغییر رنگ معرف به صورتی تا بنفش نمایان می شود. حرکت باکتری نیز که در تشخیص انواع باکتری از آن استفاده می شود به واسطه وجود کدورت در اطراف محل ورود آنس در این محیط پس از ۲۴ ساعت مشخص می گردد. بررسی تولید SH2در محیط SIM آهن دار است .سیستئیناز، سیستئین را به SH2 تجزیه می کند و واکنش SH2با آهن تولید رسوب سیاه رنگ Fe2Sمی کند. تریپتوفاناز، تریپتوفان را به اندول تجزیه می کند و اندول با کوآکس واکنش می دهند.

تهیه کننده : سهیلا عباسی

Indole Test

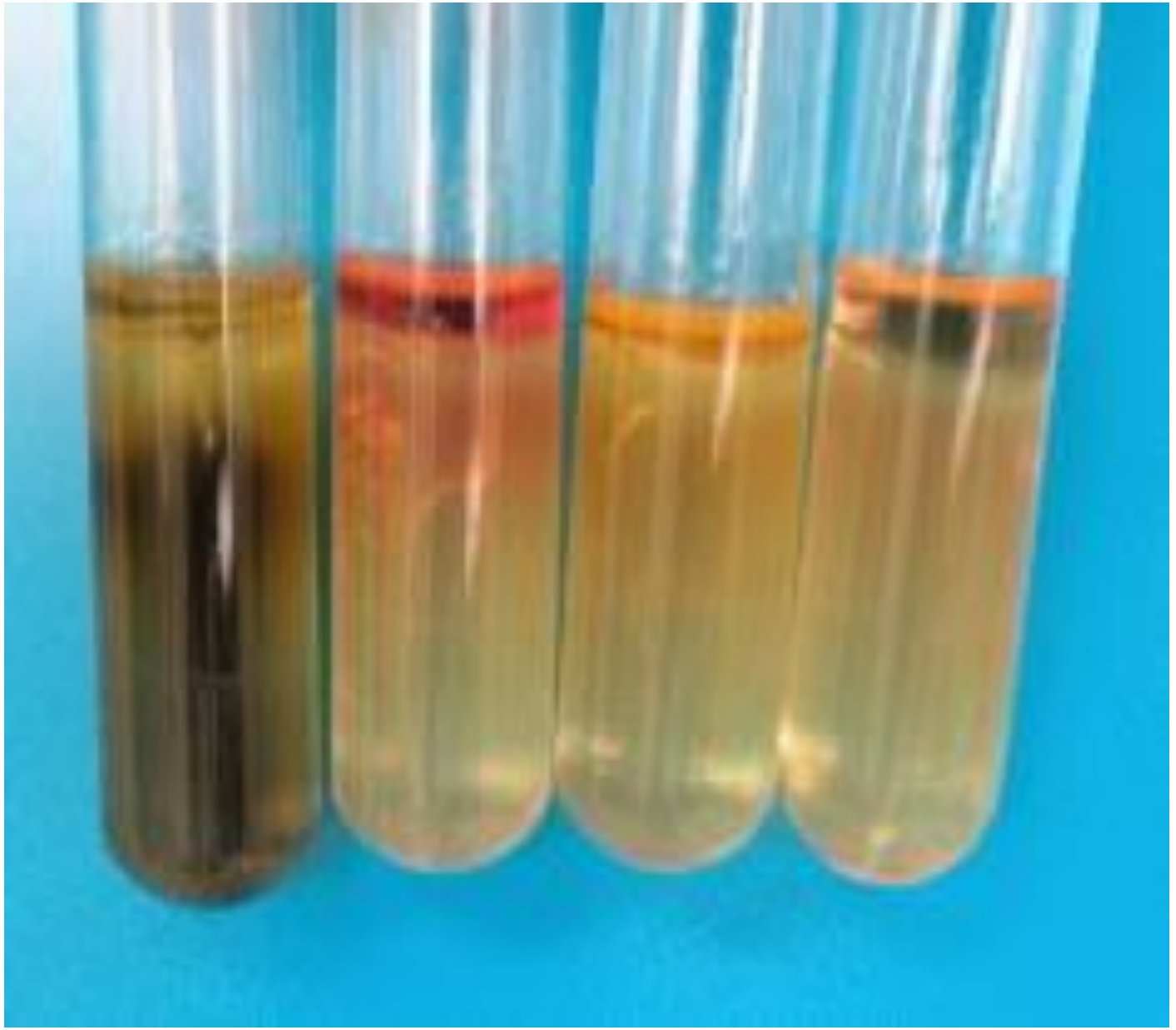
Negative Positive



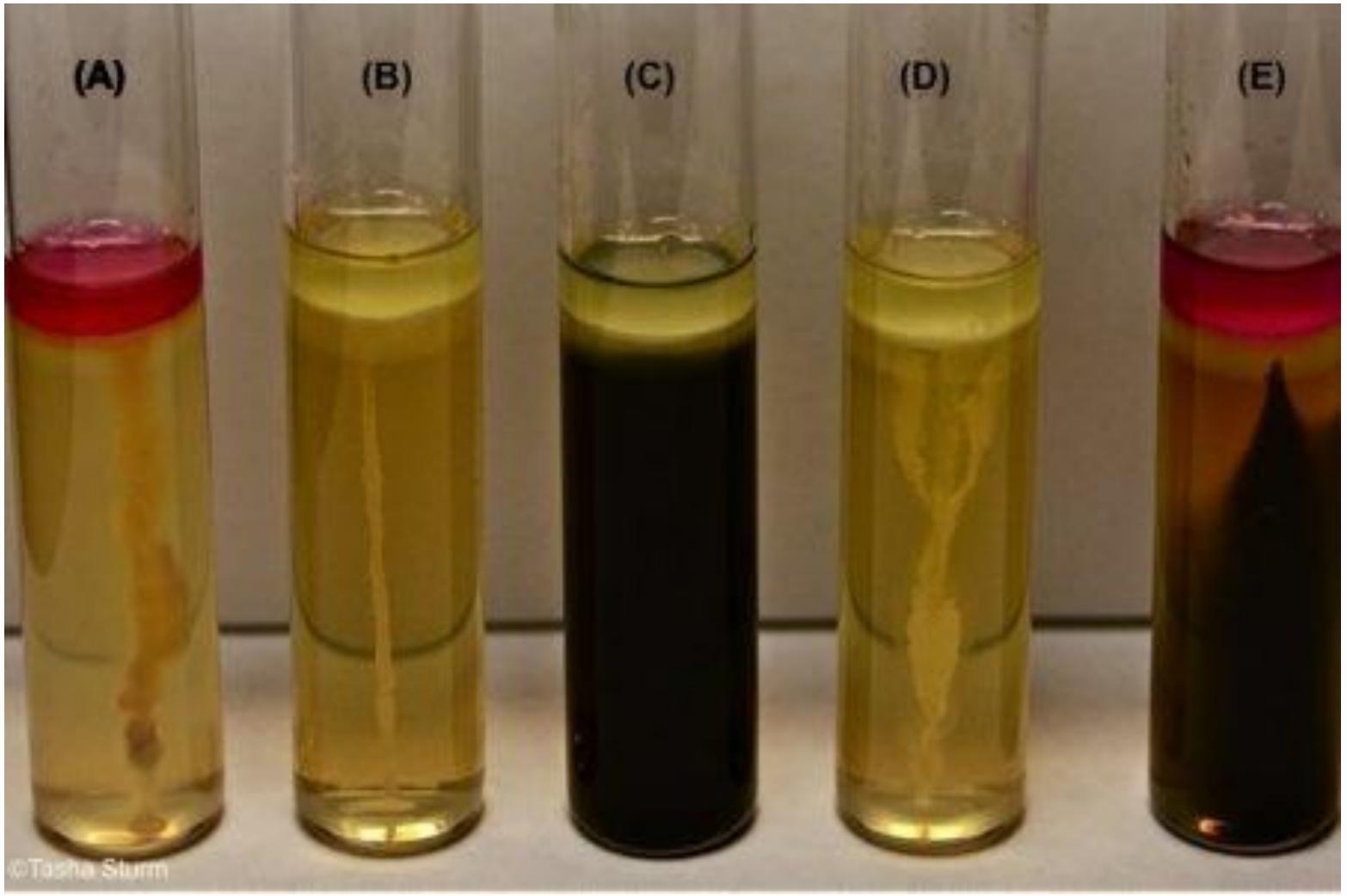
تهیه کننده : سهیلا عباسی

Motility Test

تهیه کننده : سهیلا عباسی



19



تهیه کننده : سهیلا عباسی

تست MR/VP متیل رد و وژ پروسکوئر

تست MR/VP یکی از تست‌های تشخیصی باکتری‌های انتروباکتریاسه می‌باشد. این آزمون جهت بررسی محصول نهایی تخمیر باکتری‌ها استفاده می‌شود. محیط MR/VP دارای قند گلوکز و فسفات دی‌پتاسیک است. تمام اعضای انتروباکتریاسه توانایی تخمیر قند گلوکز را دارند البته از دو راه مختلف؛ یکی مخلوط اسیدی و دیگری تخمیر الکلی. برای تشخیص باکتری‌های تولیدکننده مخلوطی از اسیدها در تخمیر مخلوط اسیدی (شامل اسید لاکتیک، اسید سوکسینیک و اسید فرمیک که از گلوکز موجود در محیط MR.VP حاصل می‌شوند) از محیط متیل رد (MR) استفاده می‌شود که بی‌رنگ می‌باشد. در مسیر دیگر از تخمیر قند گلوکز، بوتیلن گلایکول تولید می‌شود:

بوتیلن گلایکول←استوئین←اسید پیروئیک←گلوکز

در این صورت میزان اسیدیته محیط پایین است و از معرف VP استفاده می‌شود. در این حالت MR منفی است. باکتری‌هایی مانند کلبسیلا، انتروباکتروسراشیا می‌توانند تولید استوئین نمایند، درحضور اکسیژن هوا و هیدروکسید پتاسیم ۴۰ درصد، استوئین به دی‌استیل تبدیل می‌شود و آلفانفتول به‌عنوان یک کاتالیزور عمل نموده و تولید رنگ قرمز می‌نماید. معرف VP از دو بخش آلفا نفتول ۵٪ و هیدروکسید پتاسیم ۴۰٪ تشکیل شده است.

تهیه کننده : سهیلا عباسی

مراحل انجام کار:

۱ -ابتدا باکتری را در محیط MR-VPکشت می‌دهیم.

۲ -لوله آزمایش را به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه می‌کنیم.

۳ -پس از طی شدن زمان انکوباسیون، مخلوط باکتری و محیط کشت را در دو لوله مجزا تقسیم می‌کنیم.

۴ -معرف قرمز رنگ MR را قطره‌قطره به داخل کشت یکی از لوله‌ها افزوده و واکنش ایجادشده را بررسی می‌نماییم. درصورتی‌که تخمیر از راه مخلوط اسیدی باشد معرف رنگ خود را در PH اسیدی حفظ می‌کند، در غیر این صورت رنگ قرمز معرف بی‌رنگ می‌گردد.

۵ -در لوله‌ی دیگر به ازای 2/5 cc کشت، شش قطره آلفا نفتول و دو قطره پتاس ٪۴۰ به محیط اضافه می‌شود، محیط را تکان داده و در دمای آزمایشگاه به مدت ۲۰ دقیقه بدون حرکت قرار می‌دهیم. پس از این مدت اگر باکتری VP مثبت باشد در سطح محیط کشت رنگ نارنجی ظاهر می‌گردد.

تهیه کننده : سهیلا عباسی

Methyl Red Test

A B

A: Positive (E. coli) B: Negative (Enterobacter aerogenes)

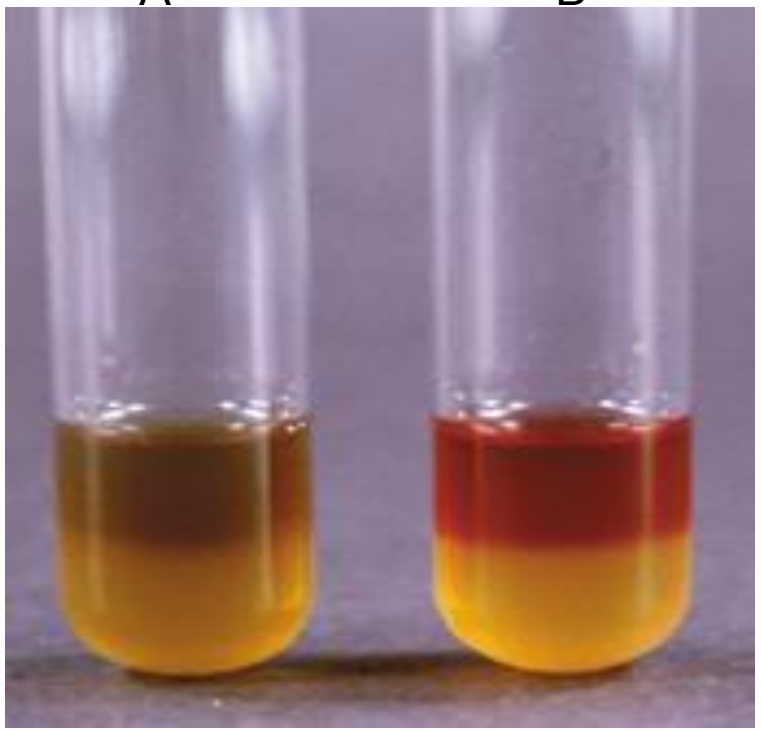
تهیه کننده : سهیلا عباسی

- تست **MR-VP** نیز محیطی است مایع و به رنگ زرد کم رنگ که جهت دو تست متیل ردو ووگس پروسکوئر به کار می رود .برای تشخیص باکتری های تولید کننده ۳ و ۲ بوتانیدول ,آزمایش (VP)به کار میرود ولیکن اساس آزمایش تشخیص ماده پیش ساز ۳ و ۲ بوتان دیول یعنی استوئین (استیل متیل کربینول) می باشد که طی واکنش هایی از گلوکز موجود در محیط (MR-VP) حاصل می شود. متیل رد در محیط بازی زرد می شود و در محیط اسیدی و خنثی قرمز باقی می ماند.

تهیه کننده : سهیلا عباسی

Voges Proskauer Test

A B



A: Negative (E. coli) B: Positive (Enterobacter aerogenes)

تهیه کننده : سهیلا عباسی

هیدرولیز ژلاتین

اساس آزمایش:

محیط ژلاتین یک محیط افتراقی است که جهت کشف آنزیم ژلاتیناز از طریق هیدرولیز ژلاتین بکارمی رود. ژلاتین در اصل مشتق پروتئین کلاژن حیوانی است که به محیط های مختلف افزوده می شود. ژلاتین توسط آنزیم ژلاتیناز به اسیدهای آمینه سازنده اش هیدرولیز می شود و خاصیت ژلاتینی خود را از دست می دهد

تهیه کننده : سهیلا عباسی

۳ **نحوه انجام کار:**

•در لوله های حاوی ژلاتین باید محکم بسته شده، در حرارت ° C 8-4یخچال نگهداری شوند. لوله ها را درست تا زمان تلقیح در یخچال نگهداری کنید.

•برای تلقیح از کشت تازه ۱۸-۲۴ ساعته (KIAیا سایر محیط های مناسب) استفاده نمایید.

•مقدار حجیمی از کلنی مورد نظر را تا عمق ۵/۲ – ۵/۱ سانتی متری لوله فرو ببرید.

•لوله تلقیح نشده ای را به عنوان لوله کنترل در کنار لوله آزمایش قرار دهید. هر ۲ لوله را در حرارت $35\ ^oC$یا در صورت رشد بهتر در $25\text{-}22\ ^oC$ ، در این دما به مدت ۱-۱۴ روز انکوبه کنید. لوله ها را تا ۲ هفته هر روز بررسی کنید مگر اینکه در زمان زودتری عمل ذوب انجام پذیرد.

•در صورت وجود علائمی از ذوب، هر ۲ لوله را به مدت ۲ ساعت در یخچال یا حمام یخ قرار دهید تا مشخص شود که آیا هضم ژلاتین صورت گرفته است یا خیر.

•روزانه لوله ها را از انکوباتور بیرون آورده و بمدت ۲ ساعت در یخچال قرار دهید. انتقال لوله ها از انکوباتور به یخچال بدون تکان دادن لوله ها انجام گیرد. گاهی مقدار اندکی هضم ژلاتین تنها در محل تلقیح باکتری ایجاد می گردد.

•ممکن است گهگاه انکوباسیون طولانی تری (۳۰ روز تا ۶ هفته) مورد نیاز باشد ولی برای آزمایشات روزانه نتیجه آزمایش (ذوب یا عدم ذوب) در پایان ۲ هفته انکوباسیون در $35\ ^oC$باید گزارش گردد.

تهیه کننده : سهیلا عباسی

Gelatin Hydrolysis

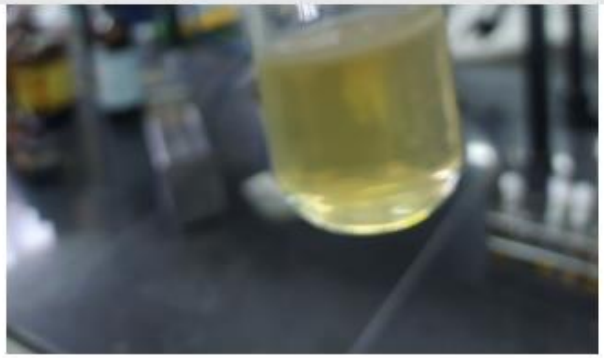
تهیه کننده : سهیلا عباسی

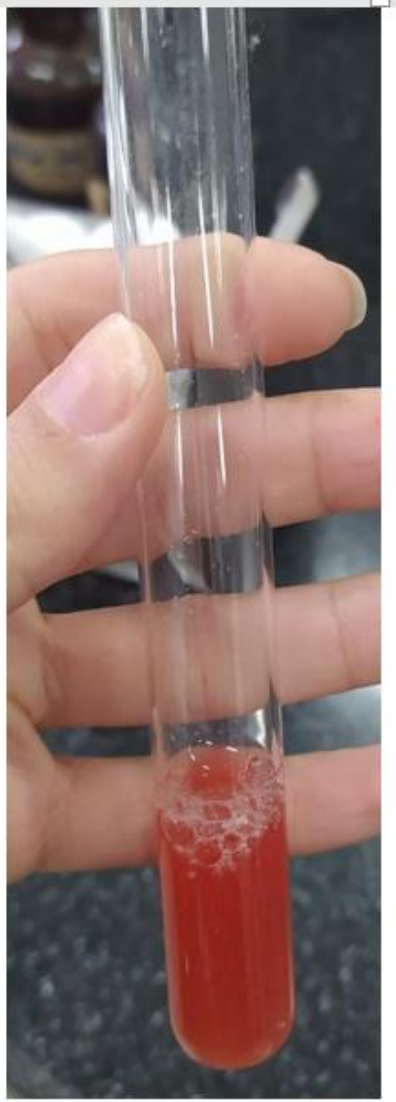
MR

تست TSI :

تست MR مثبت و VP مثبت

تست سیترات مثبت





تست فنل رد منفی

باکتری دارای حرکت

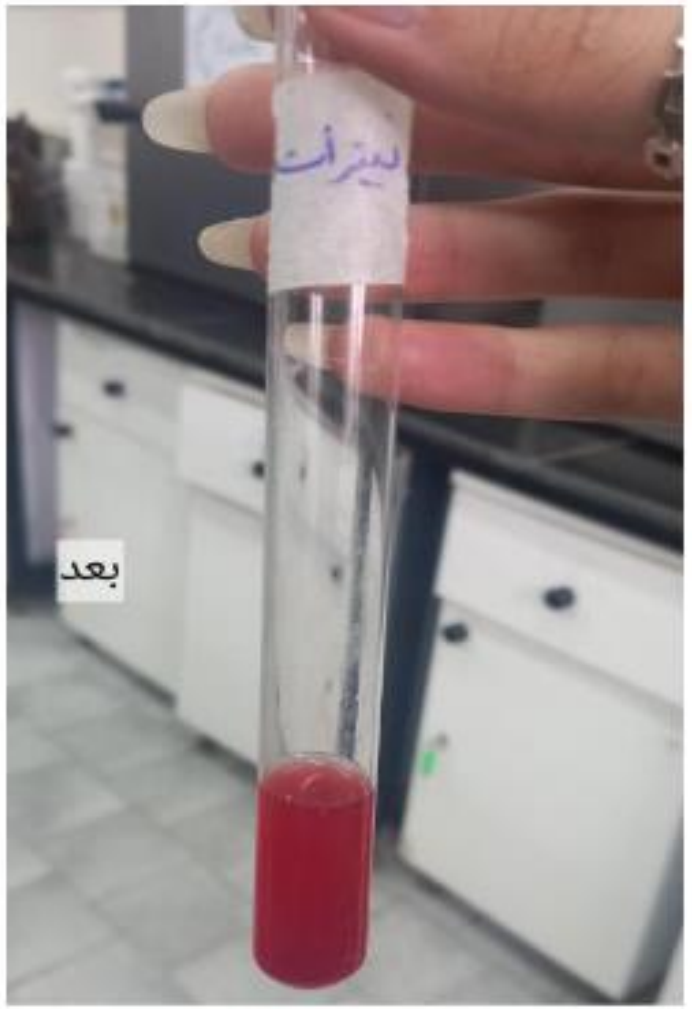
عدم تولید H_2S و

(عدم ایجاد رسوب)

تست نیترات مثبت

تست سیترات مثبت

تست نیترات مثبت



تست اوره مثبت

تست SIM:تولیدSH2منفي ،اندول منفی و حرکت مثبت

تست متیل رد مثبت

تست وژپروسکوئر منفی

با تشکر از حسن توجه شما