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

آزمایشگاه میکروب ۲

تست های بیوشیمیایی ۲

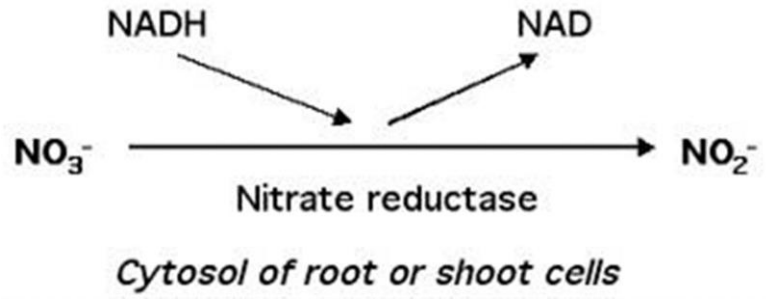
هیدرولیز نشاسته– احیای نیترات– همولیز– OF- TSI

زمینه ی نظری

- تست های بیوشیمیایی برای تشخیص جنس وگونه باکتری استفاده می شوند. 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.

آزمایش احیای نیترات Nitrite Reduction test

آنتروباکتریاسه ها داری آنزیمی هستند به نام نیترات ردوکتاز که قادراست نیترات رابه نیتریت احیا نماید



مکانیسم

باکتری در صورت احیای نیترات محصولات جدیدی مانند نیتریت اکسیدوز، نیتروزوغیره تولید می کند و باعث ازبین رفتن نیترات درمحیط می شود. اگر نیترات به نیتریت تبدیل شده باشد پس از اضافه کردن معرف اسید سولفانیلیک باعث ایجاد نیتروز اکسیدوتشکیل نمک دی آزونیوم شده واین نمک بامعرف آلفانفتیل آمین تشکیل رنگ قرمزیا بنفش محلول درآب رامی دهد

روش انجام آزمایش

- ارگانیسم موردنظررادرمحیط کشت مایع حاوی نیترات به مدت۲۴ساعت کشت دهید.
- حجم مساوی ازمحلول۱و۲راباهم مخلوط کرده وسپس یک دهم میلی لیترازاین معرف رابه محیط کشت اضافه می کنیم.
- ایجاد رنگ قرمزدرعرض۱تا۳دقیقه نشانه احیای نیترات به نیترات می باشد وتست مثبت تلقی میشود.
- محلول ۱: هشت گرم اسیدسولفانیلیک رادرهزارمیلی لیتراسید استیک پنج نرمال حل کنید
- محلول ۲: پنج گرم آلفانفتیل آمین رادر۱۰۰۰میلی لیتر اسید استک۵ نرمال حل کنید

- **Nitrate Test:**

• باکتری های هوازی بی هوازی اختیاری(انتروباکتریاسه) می توانند در غیاب اکسیژن از مواد آلی به عنوان گیرنده نهایی الکترون استفاده نمایند. این باکتری ها دارای آنزیم نیترات ردوکتاز می باشند، که می تواند نیترات را به نیتریت احیا کند. اگر نیترات به نیتریت احیا شده باشد، پس از اضافه کردن معرف اسید سولفانیلیک باعث ایجاد اسید نیتریک و تشکیل نمک دیازونیوم شده و این نمک با معرف آلفا نفنیل آمین تشکیل رنگ قرمز یا بنفش محلول در آب را می دهد.
پدیدار نشدن رنگ قرمز ممکن است به یکی از ۳ دلیل زیر مرتبط باشد:
۱ .تمام نیترات موجود در محیط به نیتریت و سپس به آمونیاک تبدیل شده که در این صورت نیتریت در محیط وجود ندارد که با اسید سولفانیلیک ترکیب شود.
۲ .تمامی نیترات موجود در محیط به گاز ازت تبدیل شده که در این حالت نیز نیتریت در محیط کشت وجود ندارد.
۳ .نیترات احیا نشده است.

• برای آگاهی از آنچه روی داده است مقدار کمی از گرد روی (Zn) به محیط کشت اضافه کنید در صورت احیا نشدن نیترات و وجود آن در محیط توسط پودر روی احیا شده و به نیتریت احیا می گردد و رنگ قرمز پدیدار می شود، ولی عدم پیدایش رنگ قرمز پس از اضافه کردن پودر روی، دلیل مصرف شدن همه نیترات بوده و آزمایش مثبت است.

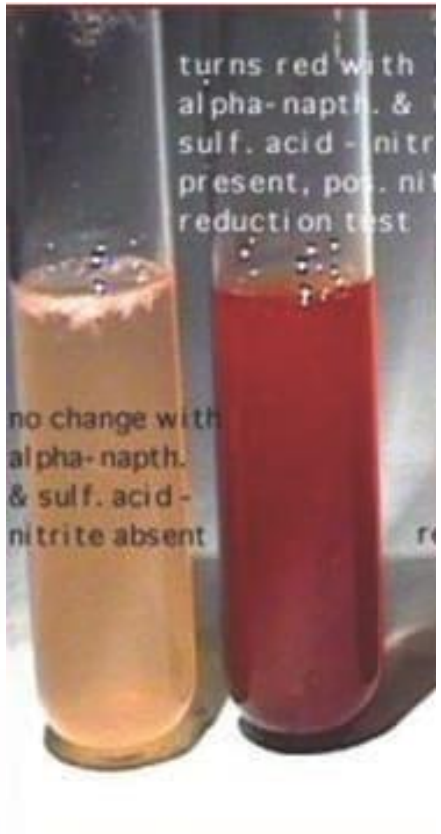
•

- اگررنگ قرمزایجادنشدجهت اطمینان مقدارکمی ازگرد روی به محیط کشت اضافه کنید که آیا واقعا باکتری نتوانسته نیترات رااحیا کند یا تولیدN2یا NH_2 کرده ایجادرنگ قرمز دراین حالت وجود نیترات احیانشده رامشخص می کند.
- ایجاد رنک قرمز دراین مرحله(اضافه کردن پودر روی) نشانه منفی بودن تست وعدم احیائ نیترات می باشد.

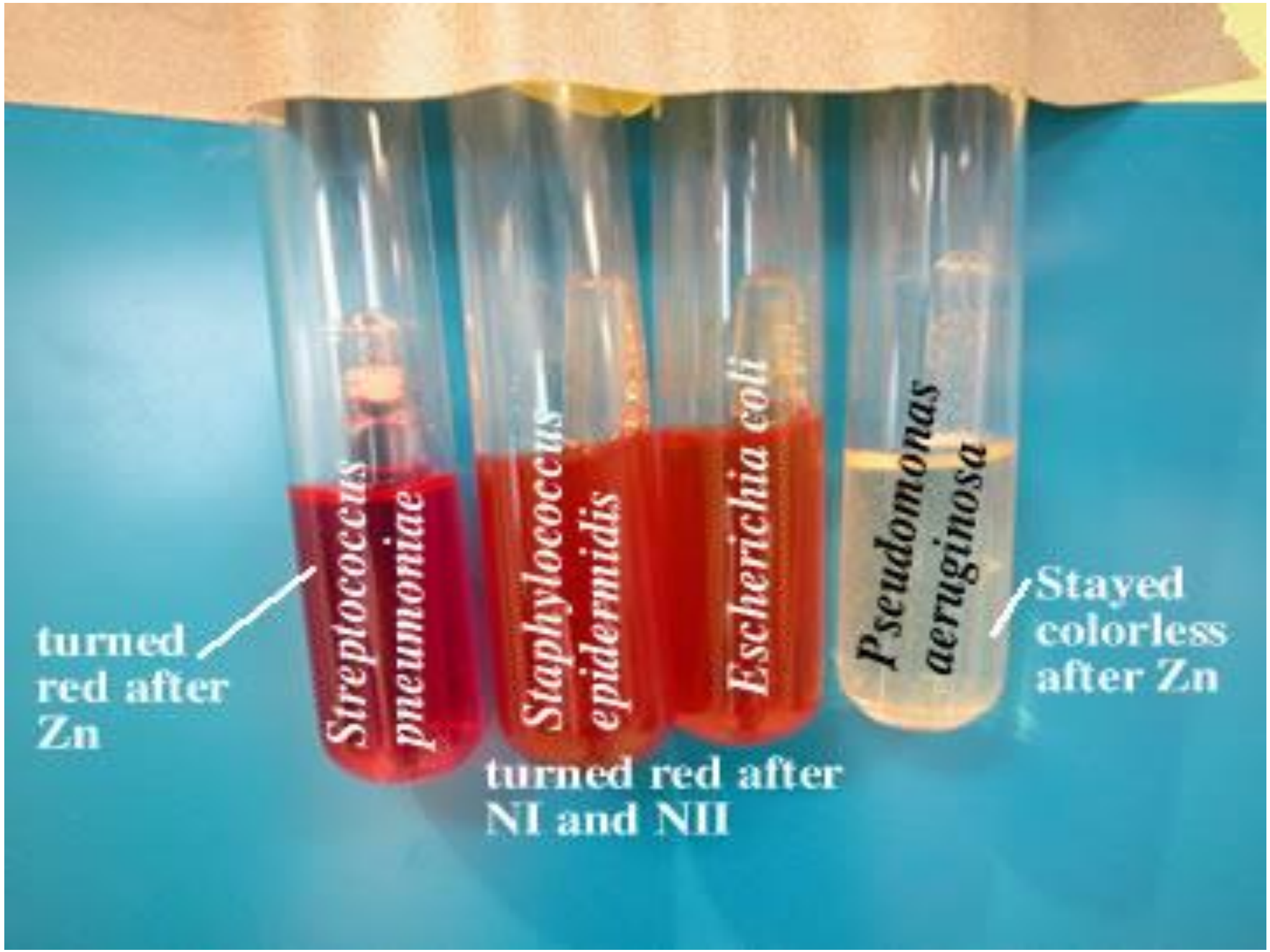
Nitrate Reduction Test

Nitrate negative

Nitrate positive



Nitrate Reduction


turned
red after
Zn
Streptococcus
pneumoniae
Staphylococcus
epidermidis
Escherichia coli
Pseudomonas
aeruginosa
Stayed
colorless
after Zn
turned red after
NI and NII

دستورالعمل تست TSI برای شناسایی گروه انتروباکتریاسه

آزمایش TSI برای شناسایی اعضای خانواده انتروباکتریاسه به کار می رود. همچنین این تست برای افتراق انتروباکتریاسه از سایر باسیل های روده ای گرم منفی استفاده می شود. محیط کشت TSI حاوی ۱ درصد لاکتوز، ۱ درصد ساکارز و ۰/۱ درصد گلوکز می باشد. اختلاف در غلظت این قند ها به منظور تشخیص توانایی مصرف آنها است. معرف فنول رد به عنوان شاخص PH تغییرات اسیدیته محیط را که نتیجه تخمیر کربوهیدرات ها می باشد، نشان می دهد. بطوری که تولید اسید ناشی از تخمیر قند را با تغییر رنگ قرمز به زرد نشان می دهد.در این محیط تیوسولفات سدیم و سولفات آهن ll نیز وجود دارد، تیوسولفات سدیم سوبسترای تولید H2S و سولفات آهن به عنوان معرف رنگی عمل می کند و در حضور H2S رسوب رنگی تشکیل می دهد.

البته می توان برای بررسی الگوی مصرف قند و تولید گاز H2S از محیط Kligler Iron Agar نیز استفاده نمود. در محیط اخیر تست های مشابه محیط TSI قابل انجام است.

کشت در محیط TSI به صورت کشت عمقی و کشت سطحی زیگزاگ در سطح شیبدار انجام می گیرد. سپس به مدت ۱۸ تا ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتیگراد نگهداری و سپس از نظر تخمیر قندی، تولید گاز و تولید H2S مورد بررسی قرار می گیرند. واکنش های محیط TSI به اشکال زیر مشاهده می شود:

۱.سطح شیبدار قرمز (قلیایی) و عمق لوله زرد (اسیدی)- در این حالت فقط گلوگز تخمیر شده است و تولید مقادیر اندک اسید باعث تغییر رنگ محیط به زرد می شود، از آنجایی که غلظت گلوکز کم است، به سرعت تمام شده و باکتری برای تامین انرژی مورد نیاز خود از ترکیبات دیگر محیط استفاده می کند، در چنین مواردی اگر باکتری توانایی تخمیر لاکتوز را نداشته باشد از ترکیبات پپتونه استفاده کرده و با تولید یون آمونیوم باعث قلیایی شدن سطح شیبدار محیط کشت و تغییر رنگ قرمز این ناحیه می گردد ولی به دلیل کمبود اکسیژن در بخش عمیق لوله رشد باکتری کند بوده و به همین جهت بخش عمیق لوله همچنان زرد رنگ باقی می ماند.

۲.سطح شیبدار زرد (اسیدی) و عمق لوله زرد(اسیدی)-این حالت نشان دهنده تخمیر لاکتوز و یا ساکارز می باشد و به علت غلظت بالای این دو قند و تولید مقادیر زیاد اسید، کل محیط به رنگ زرد در می آید.

۳.سطح شیبدار قرمز(قلیایی) و عمق لوله قرمز(قلیایی)-این حالت نشان می دهد که هیچکدام از قند های محیط تخمیر نشده و تولید اسید، گاز و گاز H_2S منفی است. بجای آن پپتون ها تحت شرایط هوازی یا بی هوازی مصرف شده و با تولید آمونیاک باعث قلیایی شدن محیط می شود.

۴ .

بررسی تولید H2S در محیط SIMآهن پپتونه است که مناسب تر از معرف سولفات آهن موجود در TSI است.

اسیدی شدن را با حرف A و قلیایی شدن را با Alk یا K نشان می دهیم.

A/A:تمام لوله زرد است و باکتری تمام قند را مصرف کرده و سبب اسیدی شدن محیط شده است.

Alk/A:این حالت در طی ۷۲ ساعت نشان دهنده مصرف تنها گلوگز است و بقیه قند ها مصرف نشده اند.

Alk/Alk :هیچ قندی مصرف نشده و محیط تغییر رنگ نمی دهد و شرایط قلیایی است.

اگر باکتری در این محیط قادر به استفاده از تیو سولفات سدیم باشد H2S تولید می کندکه با املاح آهن موجود در محیط رسوب سیاه رنگ خواهد داد.

همچنین اگر تخمیر قندبا تولید CO2 همراه باشد,حباب و ترک خوردن و حتی جابجایی محیط را خواهیم داشت.

تولید H_2S : معرف این تست سولفات آهن است. سولفات آهن درصورتی‌که با H_2S ترکیب شود ترکیبی سیاه رنگ می‌دهد، پس چنانچه باکتری H_2S+ باشد رسوبی سیاه رنگ را در لوله مشاهده می‌کنیم.

تولید گاز :بعضی از باکتری‌ها در مسیرهای متابولیکی خود گازهایی از قبیل N_2 و H_2 تولید می‌کنند. اگر محیط از لحاظ شکل سالم بود؛ تولید گاز منفی است ولی اگر محیط تکه‌تکه و حفره شده بود تولید گاز مثبت است. در مواردی یک حباب بزرگ مشاهده می‌کنید که بیانگر تولید فراوان گاز بوده است. شکستن، ترک خوردن و یا بالا آمدن محیط کشت در داخل لوله- این حالت نشان دهنده تولید گاز متعاقب تخمیر قندی می باشد و باکتری هایی که از تخمیر قند، اسید و گاز تولید می کنند، ضمن اسیدی کردن محیط (رنگ زرد) باعث ترک خوردگی یا بالا آمدن محیط می گردند.

تخمیر لاکتوز :یک تست بسیار مهم و کلیدی برای تفریق گونه‌های آنتروباکتریاسه‌ها از یکدیگر است.

مطالب ذکرشده را می‌توان به‌صورت زیر خلاصه نمود:

i. سطح زرد/ عمق زرد، گاز مثبت، H_2Sمنفی
ii. سطح زرد/ عمق زرد، گاز مثبت، H_2Sمثبت
iii. سطح قرمز/ عمق زرد، گاز مثبت، H_2Sمثبت
iv. سطح قرمز/ عمق زرد، گاز منفي، H_2Sمثبت
v. سطح قرمز/ عمق قرمز، گاز منفي، H_2Sمنفي

باسیل‌های گرم منفي را بر اساس واکنش ایجادشده بر روی این محیط می‌توان به پنج گروه تقسیم کرد:

در گروه i تخمیر گلوکز، لاکتوز، سوکروز، منتهي به اسیدی شدن (زرد شدن) تمامی محیط و تولید گاز می‌گردد.

هنگامی‌که عمق و سطح این محیط توسط باکتری‌های گروه iii, iv کشت داده می‌شود، باکتری کشت داده‌شده ابتدا به طور هوازی و سپس به طریقه بی‌هوازی شروع به مصرف گلوکز می‌نماید. زمانی که هر دو طریقه در حال انجام است (ساعات اولیه انکوباسیون ph (تمامی نقاط محیط کشت اسیدی و در نتیجه محیط زرد رنگ است اما از آنجایی که تخمیر هوازی در مقایسه با تخمیر بی‌هوازی با سرعت بیشتری بوقوع می‌پیوندد، گلوکز موجود در سطح به پایان رسیده و باکتری‌ها شروع به تجزیه پپتون موجود در محیط می‌نمایند. از تجزیه پپتون در شرایط هوازی، بی‌هوازی، آمونیاک (Nh3) تولید می‌شود. محصولات این عمل خاصیت قلیایی داشته و در نتیجه رنگ سطح محیط مجدداً قرمز می‌شود. در همین حال عمق محیط به دلیل سیر آرام‌تر تخمیر بی‌هوازی گلوکز، همچنان اسیدی و زرد رنگ باقی می‌ماند.

گروه v باسیل‌های گرم منفی، غیرتخمیرکننده مانند گونه‌های سودوموناس، پپتون‌های موجود در محیط را تجزیه کرده و سطح و عمق محیط را بدون تولید گاز، قرمز رنگ می‌نمایند.

K/A
A/A
A/A+H2S
K/A+H2S
Photo by Karen M. Kiser

TSI agar

Triple Sugar Iron Agar

0.1% dextrose

1.0% sucrose

1.0% lactose

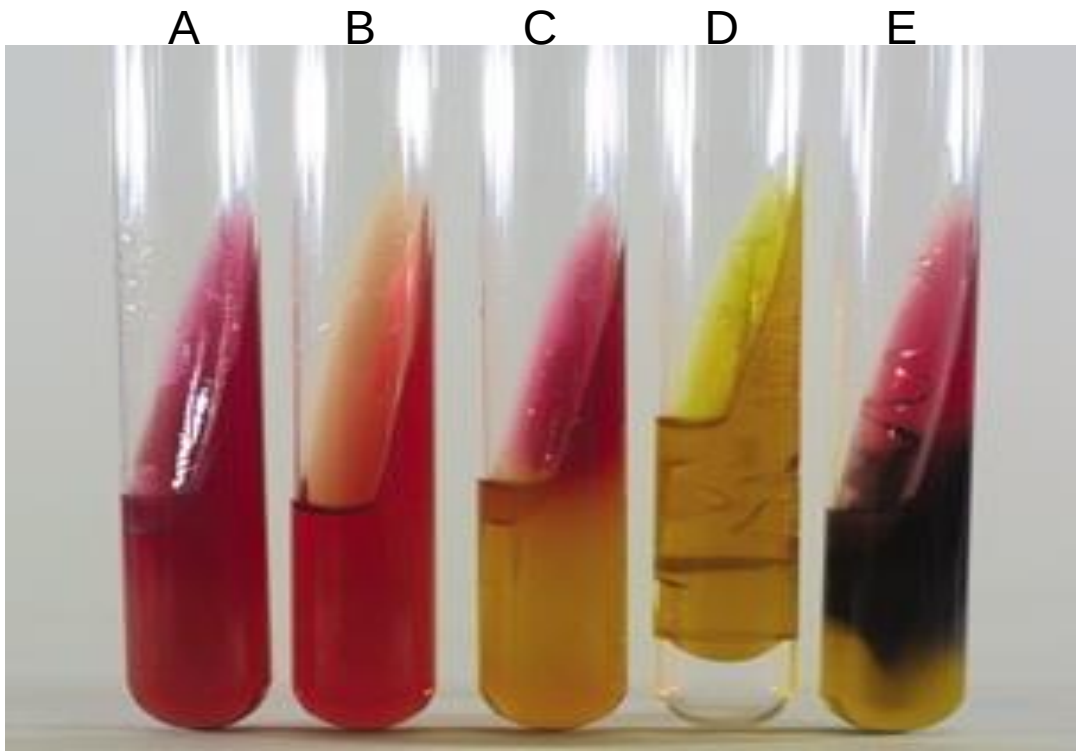
(a) Red/red (no sugar fermentation)

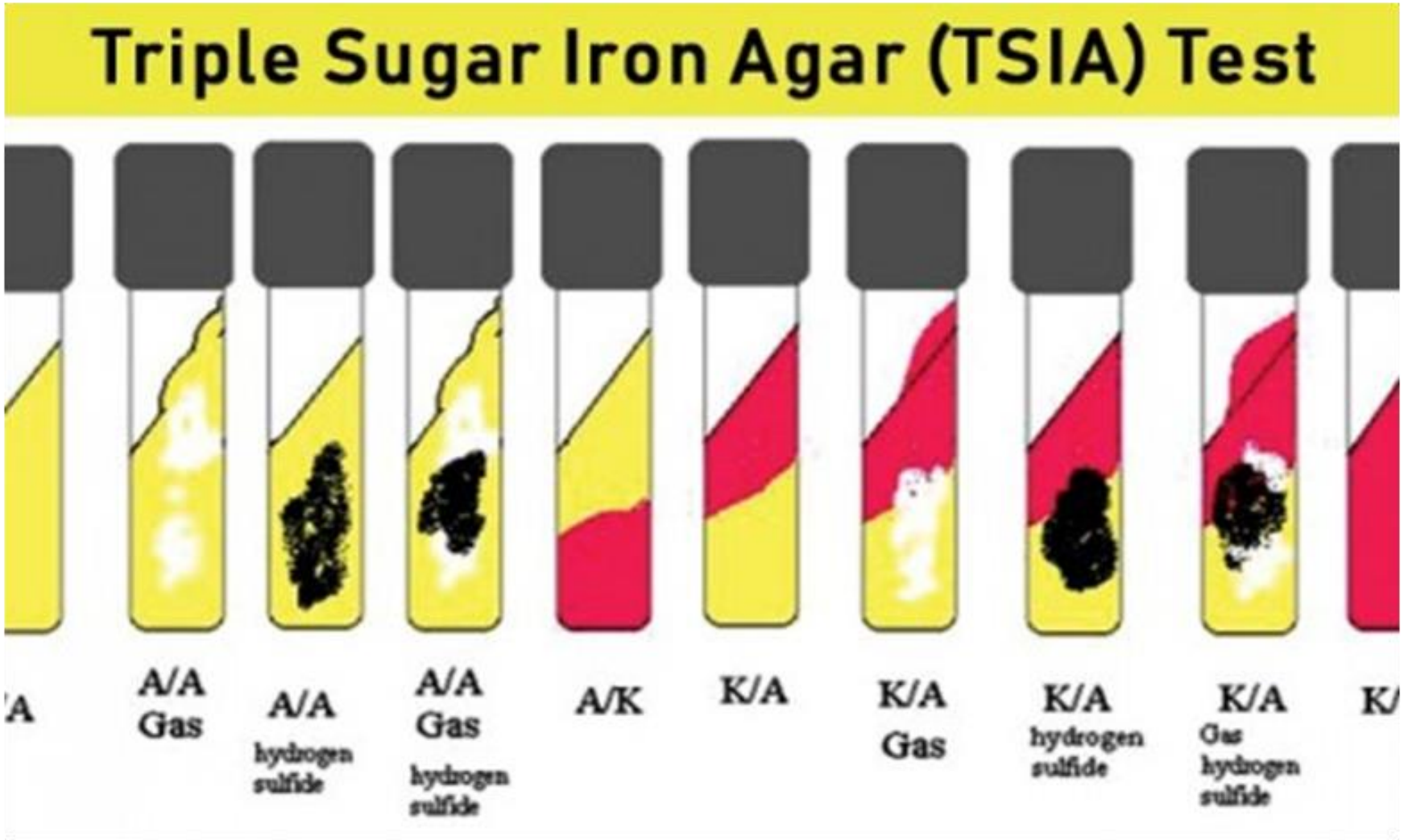
(b) Control

(c) Red/yellow (Glucose fermented but lactose and sucrose not fermented)

(d) Yellow/yellow (Glucose fermented. Lactose and/or sucrose fermented)

(e) Red/yellow with H_2S




Triple Sugar Iron Agar (TSIA) Test
A/A
Gas
A/A
hydrogen
sulfide
A/A
Gas
hydrogen
sulfide
A/K
K/A
K/A
Gas
K/A
hydrogen
sulfide
K/A
Gas
hydrogen
sulfide

. آزمایش OF

یکی از مهمترین خصوصیات افتراقی باکتری های گرم منفی غیر تخمیری از انتروباکتریاسه، توانایی ارگانیسم در استفاده از کروبوهیدرات ها می باشد. در این آزمایش از محیطی به نام Oxidative Fermentative Mediaکه دارای مقادیر بسیار کمی پپتون است، استفاده می شود.

هرچند محیط TSI و یا KIA تخمیر و عدم تخمیر قند را نشان می دهد، ولی به علت بالا بودن مقدار پپتون در محیط، مقادیر کم اسید خنثی می شود. بنابراین پاسخ درستی ارائه نمی گردد. ولی محیط OF دارای پپتون کم و مقدار بیشتری کربوهیدرات است. کاهش میزان پروتئین، تولید آمین های قلیایی را که مقادیر اندک اسید ناشی از اکسیداسیون قند را خنثی می کنند، کاهش داده و در نتیجه تولید مقدار کم اسید نیز مشخص می شود. همچنین با افزایش نسبی میزان قند محیط کشت OF مقدار اسید حاصل از اکسیداسین افزایش می یابد. در محیط کشت OF قدرت تحرک باکتری نیز مشخص می گردد.

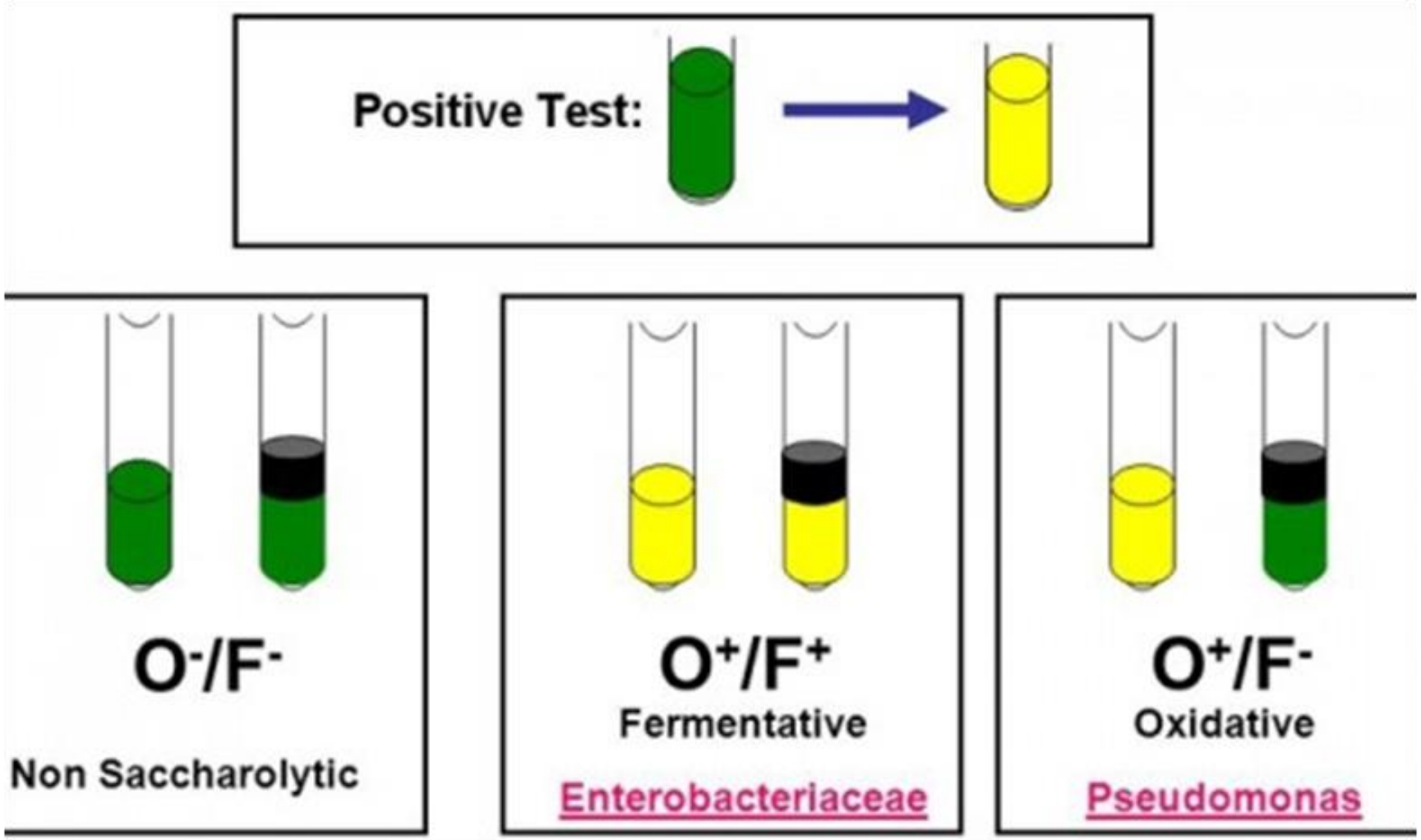
آزمون اکسیداسیون-فرمانتاسیون

نمونه مورد آزمایش را به ۲ لوله محیط کشت OF تلقیح کنید و سطح یکی از لوله ها را با لایه ای به ضخامت یک سانتیمتر از یک روغن معدنی یا پارافین ذوب شده بپوشانید تا شرایط بی هوازی ایجاد گردد. لوله دیگر را در شرایط هوازی انکوبه کنید. هر دو لوله را بر حسب باکتری مورد آزمایش به مدت چند روز در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد نگهداری کنید. پس از سپری شدن دوره انکوباسیون نمونه ها را از نظر تغییر رنگ و نوع واکنش محیط بررسی نمایید

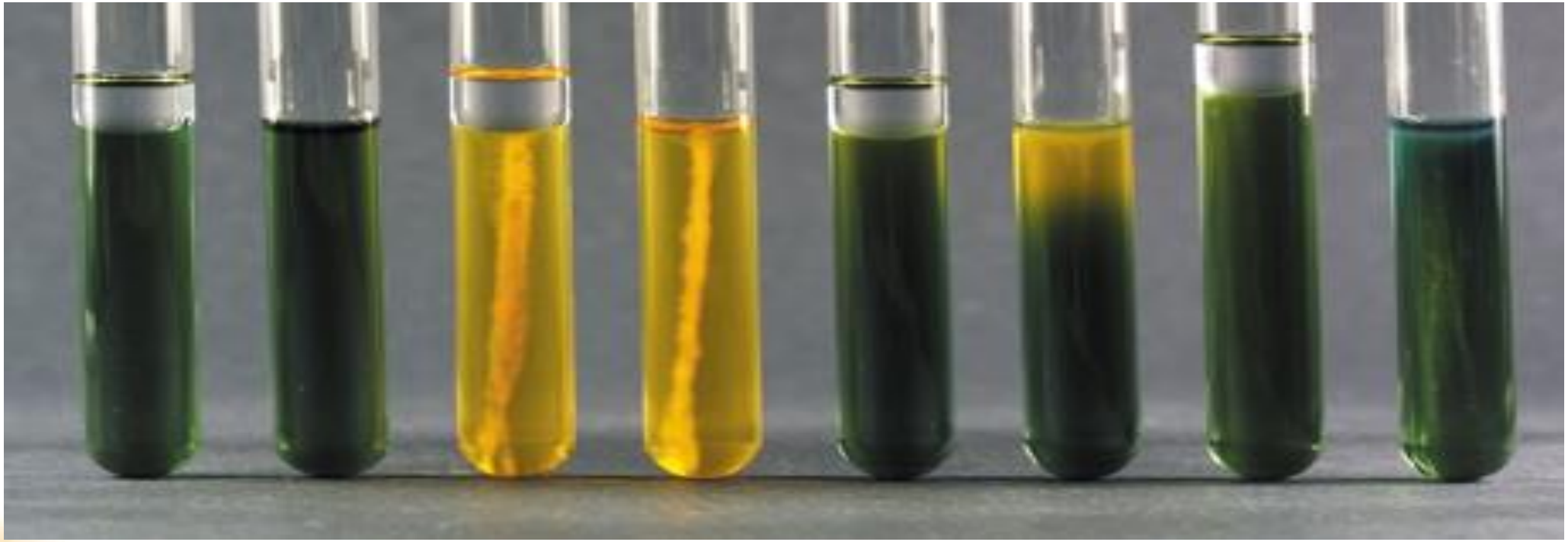
برای کشت بر روی این دو محیط از دو لوله استفاده می شود. ارگانیسم جدا شده را در هر دو محیط تلقیح کرده و سپس یکی از محیط ها را با پارافین استریل پوشانده که شرایط بی هوازی ایجاد شود.

بعد از انکوباسیون در لوله هایی که رنگ زرد ایجاد شده، اسید تولید و گلوکز مصرف شده است.در لوله واجد پارافین (شرایط بی هوازی) عمل تخمیر و در لوله ی فاقد پارافین (شرایط هوازی) عمل اکسیداسیون صورت می گیرد.

این محیط دارای قند گلوکز و معرف برموتیمول بلو می باشد. اگر گلوکز محیط مصرف شود، اسید تولید می شود و برموتیمول بلو از حالت سبز به زرد تغییر رنگ می دهد. اگر هر دو لوله (با یا بدون روغن) زرد شود، میکروارگانیسم بی هوازی اختیاری می باشد، یعنی توانایی استفاده از گلوکز را در حضور یا عدم حضور اکسیژن دارد. در صورتی که فقط در لوله بدون روغن رنگ زرد ایجاد شود، باکتری هوازی است و توانایی استفاده از گلوکز را تنها در حضور اکسیژن دارا می باشند. عدم تغییر رنگ در لوله نشانه این است که میکروارگانیسم قادر به مصرف گلوکز نمی باشد.


Positive Test:
O-/F-
Non Saccharolytic
O+/F+
Fermentative
Enterobacteriaceae
O+/F-
Oxidative
Pseudomonas

O-F tests



Control E. coli Pseudomonas Alcaligenes

Fermenter Oxidizer Nonsaccharolytic

- **آشنایی با محیط blood agar**

- محیط **blood agar** محیطی جامد و مغذی با ۵٪ خون گوسفند است و برای شناسایی باکتری هایی به کار می رود که به واسطه آنزیم هایی که تولید می کنند باعث لیز شدن گلبولهای قرمز می شود و این فرایند همولیز نامیده می شود .
- محیط بلاد آگار محیطی غنی شده برای رشد باکتری های سخت رشد مانند streptococciکه بر روی محیط های کشت روتین رشد نمیکنند.
- محیط کشت بلاد آگار برای رشد طیف وسیعی از پاتوژن های سخت رشد مانند Haemophilus influenzae , Streptococcus pneumoniaeو Neisseria به کار میرود .

- **اجزا سازنده محیط blood agar**
- 1- 1000mlنوترینت آگار
- ۲- ۵۰mlخون دفیبرینه گوسفندی استریل
- ۳- phمحیط باید در حدود ۷/۲ تا ۷/۶ در دمای اتاق باشد.
- **تهیه محیط بلاد آگار**
- 1- با توجه به دستورالعمل شرکت سازنده محیط بلاد آگار تهیه شود.
- ۲- محیط مورد نظر را در دمای ۱۲۱ درجه سلسیوس به مدت ۱۵ دقیقه اتوکلاو شود.
- ۳- محیط پایه به حمام آب گرم ۵۰ درجه انتقال داده شود .
- ۴- خون استریل به آرامی به محیط پایه اضافه شود و از تشکیل حباب هوا جلوگیری شود .
- ۵- ۱۵ mlاز محیط مورد نظر در ظروف پتری دیش در شرایط استریل ریخته شود.

انواع همولیز و بلاد آگار:

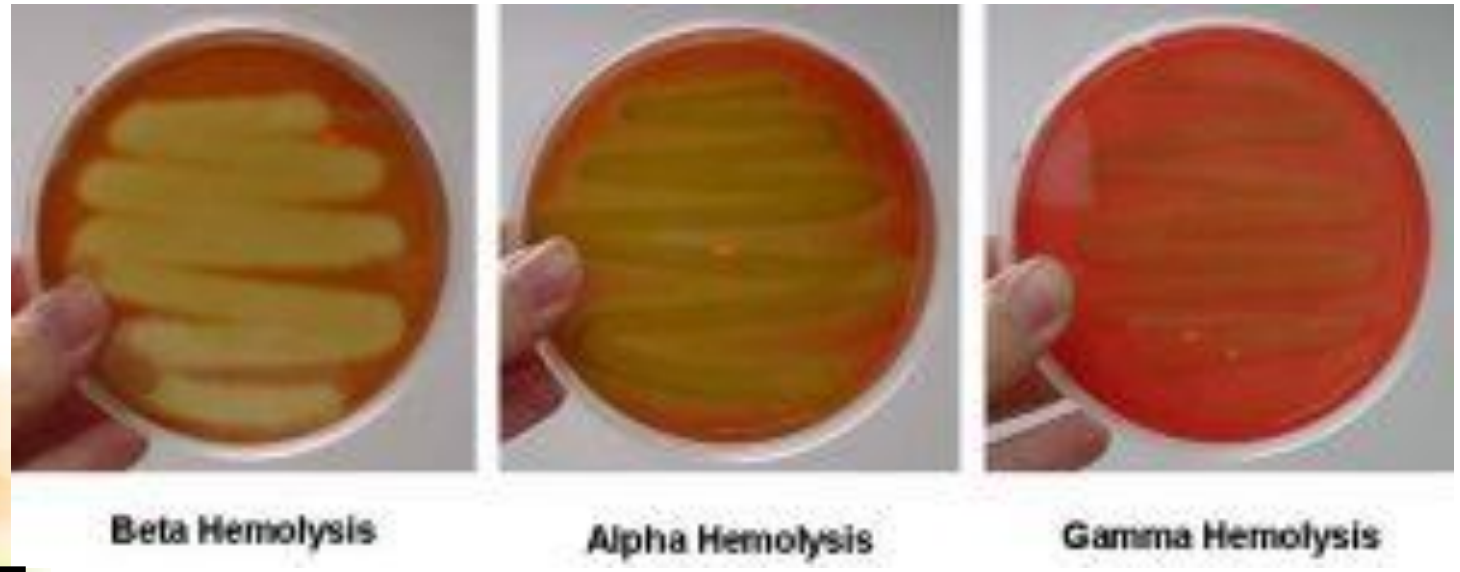
یرخی از گونه های باکتریایی از طریق تولید آنزیم ها قادر به همولیز سلولهای خونی در محیط هستند و تجزیه گلبولهای قرمز به دو صورت جزیی و کامل است.

به طور کلی ۳ نوع همولیز در محیط کشت آگار خون دار وجود دارد:

۱- همولیز کامل بتا

۲- همولیز جزیی آلفا

۳- عدم همولیز یا گاما



Hemolysis
Sheep Blood Agar
β
α
γ

مقایسه بین دو محیط بلاد آگار و شکلات آگار

هردو از محیط کشت پایه ساخته میشوند, درواقع محیط شکلات آگار همان محیط بلاد آگار است که گلبولهای قرمز آن لیز شده است.

زمان اضافه کردن خون در این دومحیط متفاوت است.

در صورتیکه خون در زمان گرم شدن محیط تا 80 درجه سانتی گراد اضافه شود باعث لیز شدن گلبول های قرمز و شکستن هموگلوبین شده و رنگ محیط کشت شکلاتی شده و به این دلیل به نام شکلات آگار نامیده میشود.

محیط شکلات آگار به دلیل داشتن فاکتورهای hemin و NAD برای رشد باکتری های سخت رشد مانند هموفیلوسها مناسب است.

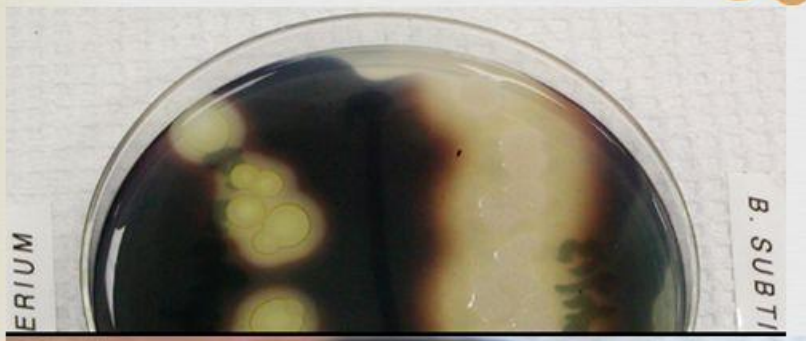
تست هیدرولیز نشاسته

- بعضی از میکروب ها آنزیم آمیلاز که یک اگزوآنزیم است را دارا می باشند که قادر است نشاسته را هیدرولیز کرده و به دی ساکارید و مونوساکاریدها تبدیل کند که این قندها قابل جذب از طریق غشای باکتری بوده و نهایتاً توسط اندو آنزیم های باکتری مورد استفاده قرار می گیرد و از انرژی آن ها استفاده می شود.

معرف تست:

- برای شناسایی تجزیه نشاسته از معرف ید استفاده می شود چون ید با نشاسته تولید کمپلکس بنفش یا آبی تیره نشاسته – ید می کند.
- در صورت تجزیه نشاسته رنگ زرد ایجاد می شود که بعد از مدتی بی رنگ می شود.

تست فعالیت آمیلولیتیک:



37°c

48 h