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

آزمایشگاه میکروب

تست های بیوشیمیایی

تهیه کننده : سهیلا عباسی

مقدمه

- واکنشهای شیمیایی که در درون موجودات زنده به وقوع می پیوندد را متابولیسم می گویند که توسط آنزیم های موجود در آن ها رخ می دهد. به دلیل اینکه بسیاری از باکتری ها مورفولوژی سلولی و کلنی مشابهی دارند لذا عوامل دیگری مثل خصوصیات متابولیسمی نیز در تقسیم بندی آنها بکار می رود.

- تستهای آزمایشگاهی بر اساس ماده اولیه مورد استفاده باکتری و محصول متابولیکی که از آن بوجود می آید طراحی شده است و چون آنزیمهای موجود در باکتریها متفاوت است، این تست ها می توانند برای شناسایی جنس و گونه باکتری ها و تمایز قائل شدن بین باکتری های مشابه از نظر مورفولوژی استفاده شوند.

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

• برای انجام صحیح این تست ها باید باکتری مورد نظر بصورت خالص تهیه شود یعنی ابتدا مقداری از کلنی باکتری مورد نظر را ترجیحا از قسمت وسط که در نزدیکی کلنی دیگری نباشد برداشته و بعد از غنی نمودن آن در محیط آبگوشت مغذی، به محیط جامد دیگری به روش استریک پلیت متد کشت می دهیم و بعد از ۲۴ ساعت اگر از خلوص آن مطمئن بودیم، اقدام به انجام رنگ آمیزی گرم کرده و بر اساس نوع میکروب با توجه به واکنش گرم و مورفولوژی - تستهای بیوشیمیایی خاص آن دسته را بکار می بریم

• در همه تستهای بیوشیمیایی باید کشت باکتری خالص ، تازه بوده و برای هر محبط باید حتما یک شاهد منفی(محبط تلقیح نشده با باکتری) و ترجیحا یک شاهد مثبت وجود داشته باشد.

تهیه کننده : سهیلا عباسی

تست تخمیر قندها

- فرمانتاسیون یا تخمیر قندها یک فرآیند بیوشیمیایی تولید کننده انرژی است که در آن مولکولهای آلی بعنوان پذیرنده و دهنده الکترون عمل می‌کنند.
- توانایی یک میکروارگانیسم در تخمیر کربوهیدراتها و نوع محصولاتی که تشکیل می شود برای شناسایی و طبقه بندی باکتریها بسیار مفید می باشد. باکتری ها توانایی تخمیر بعضی از قندها را دارند در حالیکه توانایی تخمیر بعضی دیگر را ندارند. تعدادی از باکتریها نیز بطور کلی غیر تخمیری بوده و توانایی تخمیر هیچ کدام از قندها را ندارند.
- یک کربو هیدرات می تواند به انواع مختلفی از محصولات نهایی از جمله الکلها، اسیدها، گازها ، با مولکولهای آلی دیگر، بسته به نوع میکروارگانیسم تخمیر شود .
-

تهیه کننده : سهیلا عباسی

برای مثال اگر باکتری تخمیر کننده را در محیط مایعی که حاوی گلوکز است رشد دهیم ، و آن باکتری گلوکز را مصرف و تولید اسیدهای آلی نماید ، این اسیدها به محیط اطراف پخش شده و در نتیجه pH محیط را اسیدی می کنند. اگر یک اندیکاتور pH مانند فنل رد در محیط باشد، این تولید اسید می تواند رنگ محیط را از قرمز به زرد تبدیل کند. (فنل رد در pH اسیدی زرد و در pH خنثی قرمز و در pH بازی قرمز تیره می باشد).

تولید گاز نیز با استفاده از لوله های کوچکی که بطور وارونه در لوله های آزمایش حاوی محیط قندی قبل از اتو کلاو شدن قرار می گیرند، قابل بررسی می باشد. این لوله ها به نام لوله دورهام (Durham tube) نامیده می شوند. در حین اتو کلاو ، هوای داخل این لوله ها خارج شده و با محیط کشت پر می شوند. در خلال رشد و تخمیر توسط باکتری ، اگر گازی تولید شود ، جایگزین محیط مایع درون لوله های مزبور شده و بصورت حبابهایی در بالای این لوله ها مشاهده می شود.

تهیه کننده : سهیلا عباسی

تست تخمیر کربوهیدرات

برای این آزمایش از محیط PHENOL RED BROTH استفاده می شود که حاوی معرف pH فنل رد، پپتید و 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

- **مواد و وسایل لازم:**

محیط های قندی (فنل رد گلوکز براث، فنل رد فروکتوز براث ، فنل رد لاکتوز براث)، کشت میکروبی مورد نظر بصورت خالص، لوپ تلقیح

- **روش کار:**

۱- بوسیله لوپ استریل مقدار کمی از کلنی مورد نظر را برداشته و به روش حل کردن در محیطهای قند مزبور تحت شرایط آسپتیک تلقیح نمایید

۲- لوله ها را در انکوباتور ۳۷ درجه به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت اتوو گذاری نمایید.

۳- پس از این مدت برای مشاهده نتیجه به آزمایشگاه مراجعه کنید.

تهیه کننده : سهیلا عباسی

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

تفسیر نتایج :

لوله هایی که رنگ آنها از قرمز به زرد تغییر کرده باشند . (در حالیکه شاهد منفی تغیر رنگ نداشته باشد) بعنوان مثبت شناخته می شدند.

به عبات دیگر باکتری مورد آزمایش توانایی تخمیر قند و تولید اسید را داشته است و اندیکاتور موجود در محیط با تغییر رنگ توانسته است آن را آشکار سازد.

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_2 واکنش 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 برموتیمول 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

استفاده میکروب از سیترات سدیم بعنوان تنها منبع کربن در محیط کشت اساس این تست می باشد. این توانایی بستگی به حضور آنزیم سیترات پر مه آز است که انتقال سیترات را به داخل باکتری تسهیل می کند.

در داخل باکتری ، سیترات به اسید پیرووِیک و دی اکسید کربن تبدیل می شود. محیط جامد سیمون سیترات (بصورت اسلنت) حاوی سدیم سیترات بعنوان منبع کربن ، NH_4 بعنوان منبع نیتروژن و بر موتیمول بلو بعنوان اندیکاتور pH می باشد.

هنگامی که باکتری ها سیترات را اکسید می کنند، آن را از محیط حذف کرده و دی اکسید کربن آزاد می کند که با سدیم موجود در محیط و آب ترکیب شده و تولید سدیم کربنات می کند که قلیایی است و باعث بالارفتن pH و تغییر رنگ اندیکاتور از سبز به آبی می شود. (برمو تیمول بلو در محیط اسیدی زرد، در قلیایی آبی و در خنثی سبز می باشد).

تهیه کننده : سهیلا عباسی

مواد و وسایل لازم:

محیط کشت سیمون سیترات، کشت میکروبی، لوپ

روش کار:

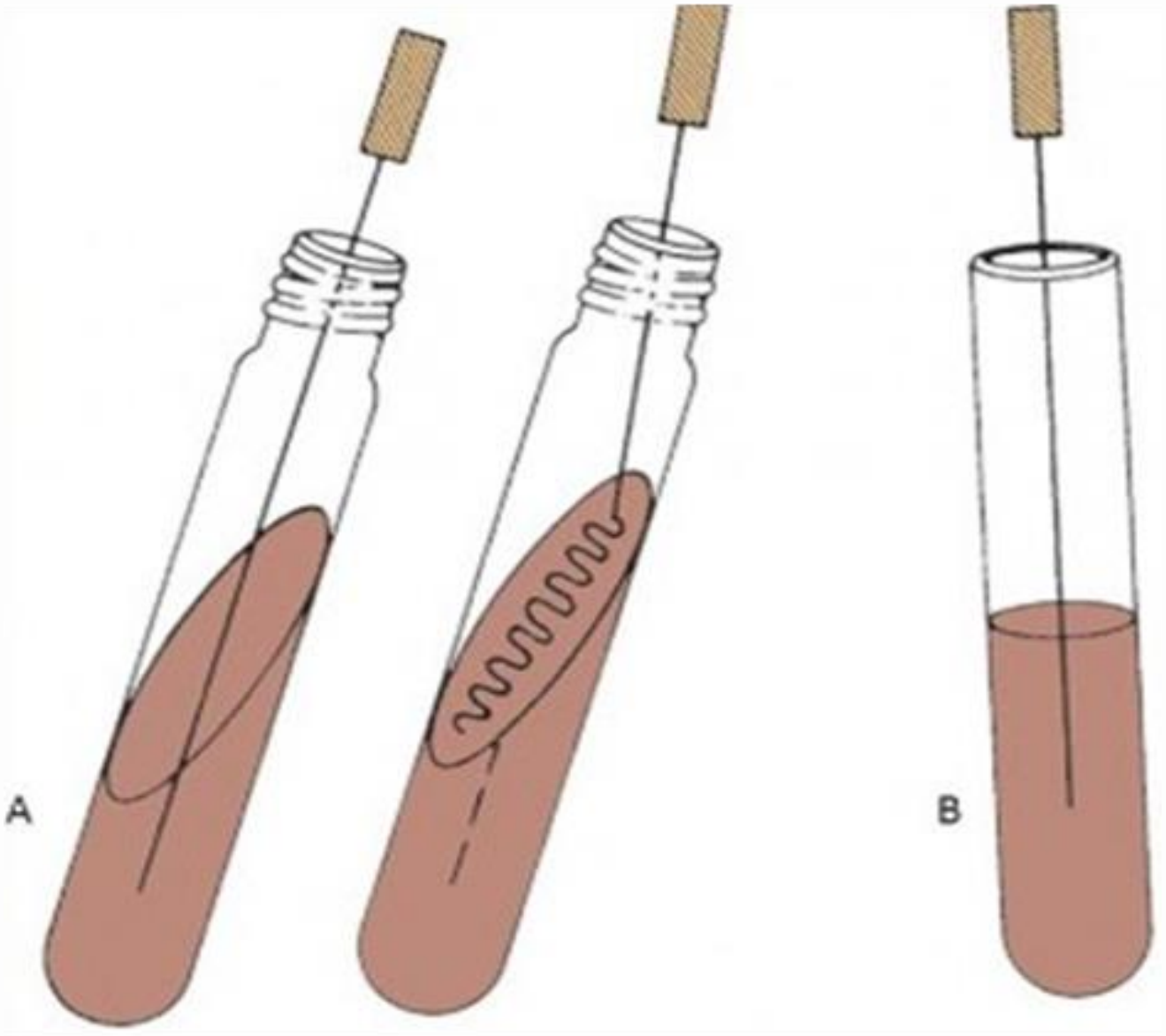
محیط کشت سیمون سیترات بصورت اسلنت با مورب می باشد. با لوپ سوزنی کلنی را برداشت کرده و بصورت عمقی سطحی در آن تلقیح نمایید این نحوه کشت را عمقی – سطحی(stab- streak) گویند. سپس آنرا در انکوباتور ۳۷ درجه به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت انکوبه گذاری کنید.

بررسی نتایج:

تغییر رنگ از سبز به آبی را مثبت گزارش کنید. نمونه‌های منفی رشدی در محیط نشان نمی‌دهند

تهیه کننده : سهیلا عباسی

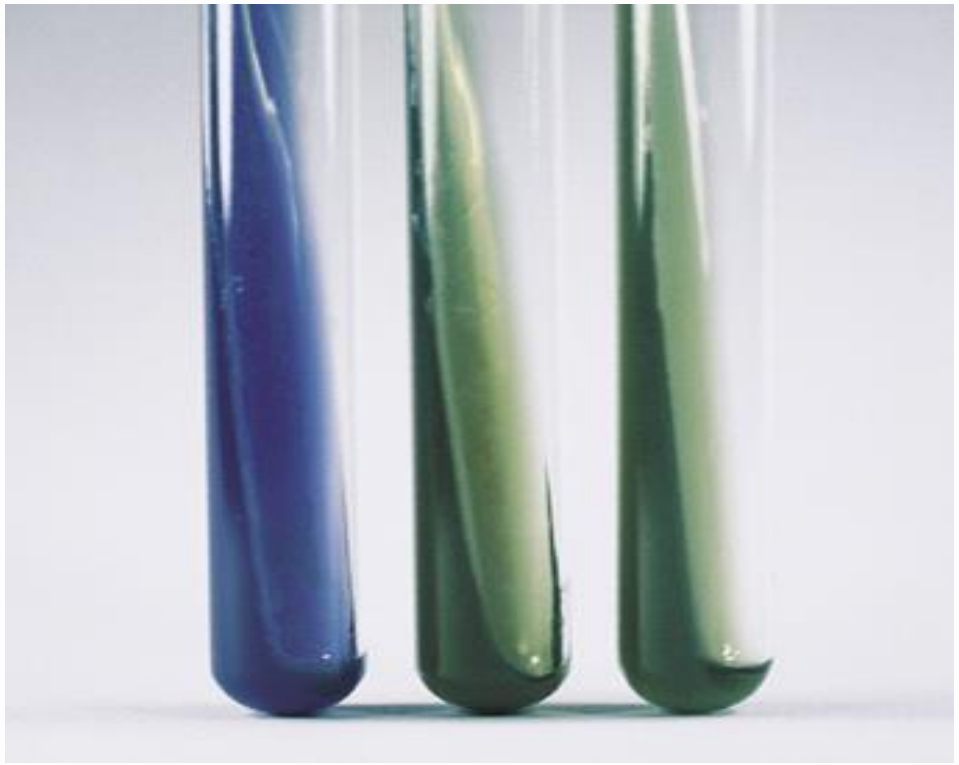
روش کشت در محیط اسلنت



تهیه کننده : سهیلا عباسی

Simmons Citrate

A B C



A: Positive…Enterobacter

B: Negative…E. coli

C: Control-uninoculated

تهیه کننده : سهیلا عباسی

تست تجزیه اوره

- برای سنجش اوره آز در باکتری ها است. اوره آز، اوره را به CO_2و NH_3 تجزیه می کند.

- تعدادی از باکتریها قادر به تولید آنزیمی به نام اوره آز هستند که به پیوند نیتروژن و کربن در ترکیات آمیدی مثل اوره حمله می کند و محصولاتی نظیر آمونیاک ، دی اکسید کربن و آب تولید می کند.
- فعالیت اوره آز با استفاده از باکتریهایی که بر روی محیط حاوی اوره رشد داده شده اند و با استفاده از یک اندیکاتور pH مثل فنل رد قابل آشکار نمودن است. وقتی که اوره هیدرولیز شود، آمونیاک در محیط جمع شده و آنرا قلیایی می کند. این افزایش pH سبب تغییر رنگ اندیکاتور از نارنجی به صورتی تیره با ارغوانی می شود.

تست تجزیه اوره

این تست برای شناسایی بین دو دسته باکتریهای روده ای اهمیت فراوانی دارد و برای شناسایی پروتئوس ها از گونه های سالونلا و شیگلا بکار می رود.

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.

- بعضی از باکتریها این واکنش را با تاخیر انجام می دهند و نیازمند این هستند که زمان بیشتری (بیش از ۴۸ ساعت) انکوبه شوند.

تهیه کننده : سهیلا عباسی

مواد و وسایل لازم :

محیط کشت اوره آگار (عمقدار و در لوله)، کشت میکروبی پروتئوس میرابیلیس، لوپ سوزنی.

روش کار:

ابتدا توسط لوپ چند کلنی از کشت باکتری موردنظر برداشت کرده و بر روی محیط مزبور کشت می دهیم. سپس محیط ها را در انکوباتور ۳۷ درجه بمدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت انکوبه گذاری کرده و بعد از این مدت به آزمایشگاه مراجعه و نتایج را یادداشت نمایید.

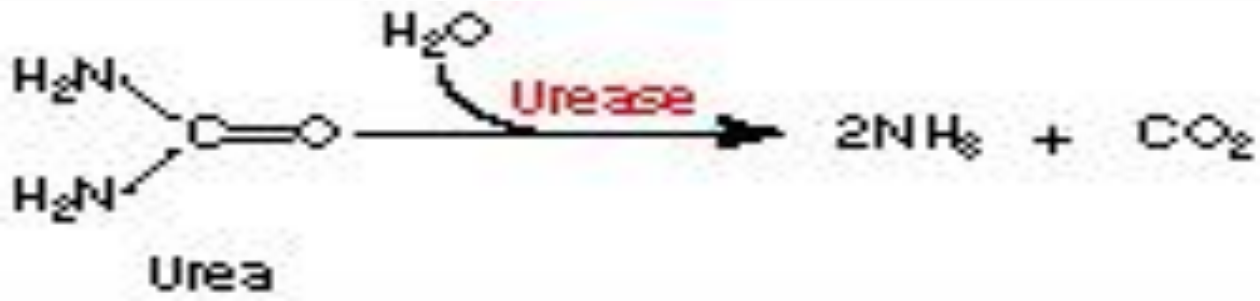
نتیجه : در صورتیکه رنگ محیط فوق از زرد مایل به نارنجی به ارغوانی تبدیل شده بود جواب تست مثبت و در صورتی که به همان رنگ باقی مانده باشد منفی است.

Urea agar

pos uninoculated neg

تهیه کننده : سهیلا عباسی

Urea Hydrolysis



تهیه کننده : سهیلا عباسی

بررسی تولید SH2 ، اندول و حرکت

بسیاری از پروتئینها غنی از اسید آمینه های حاوی گوگرد مثل سیستئین هستند. هنگامی که این پروتئین ها بوسیله بعضی از باکتری ها هیدرولیز می شوند، این اسید آمینه ها آزاد شده بعنوان مواد غذایی مصرف می شوند. سیستئین در حضور آنزیم سیستئین دسولفیدراز ، انم گوگردش را از دست می دهد که با اضافه شدن هیدروژن از آب ، گاز سولفید هیدروژن تولید می شود.

سولفید هیدروژن گازی ممکن است بواسطه احیای ترکیبات معدنی حاوی گوگرد مثل تیوسولفات، سولفات ($SO4^{2-}$)، یا سولفیت نیز تشکیل شود. برای مثال وقتی که بعضی از باکتری ها سدیم تبوسولفات را از محیط می گیرند، آن را با استفاده از آنزیم تیوسولفات ردوکتاز احیا کرده و به سولفیت تبدیل می کنند و گاز . سولفید هیدروژن آزاد می شود.

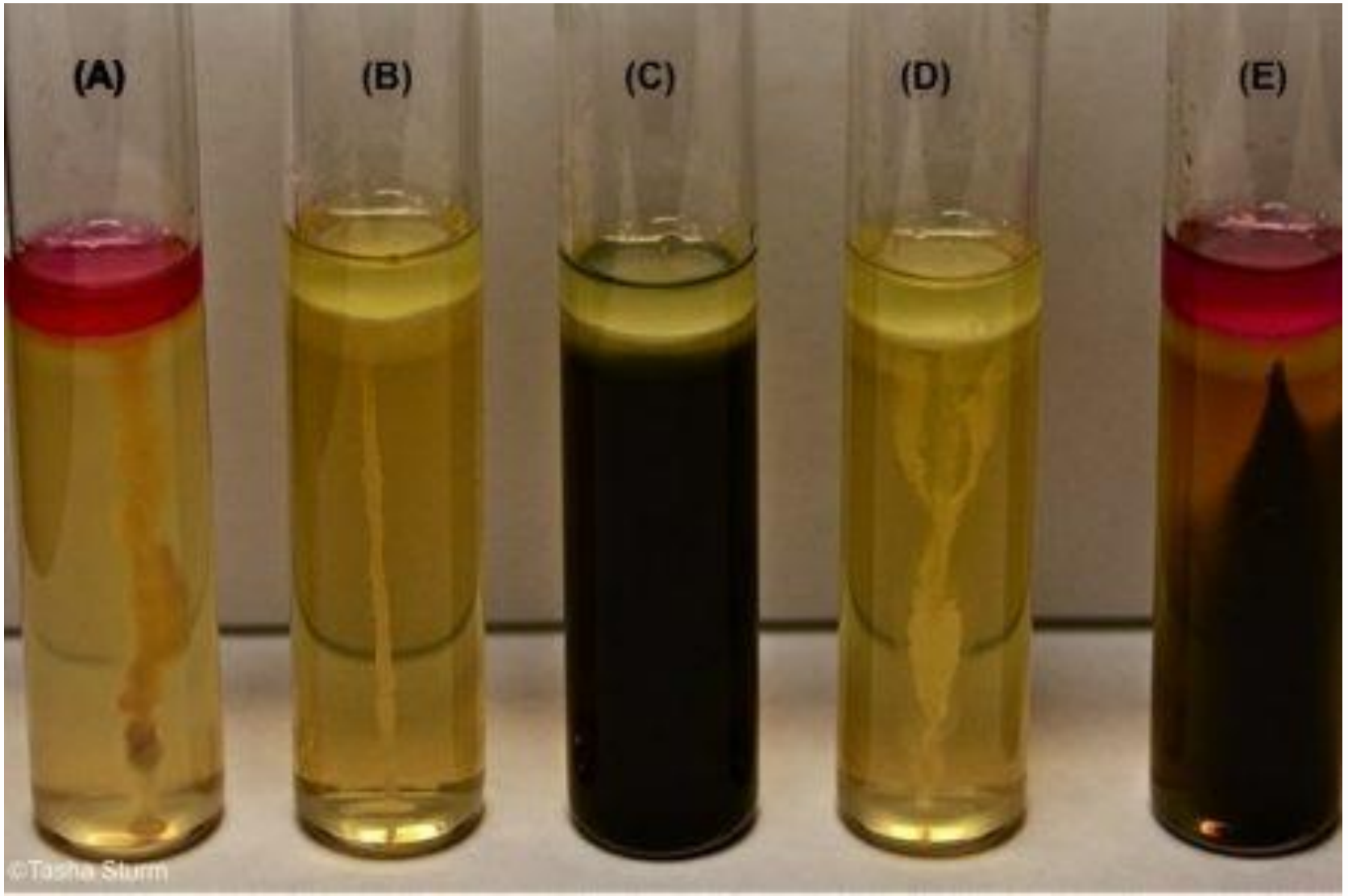
تهیه کننده : سهیلا عباسی

محیط SIM

محیط SIM حاوی پپتون و تیوسولفات سدیم بعنوان سوبسترا و سولفات آمونیوم آهن به عنوان اندیکاتور برای H2S می باشد. سیستئین جزئی از پپتون استفاده شده در این محیط است. مقدار کافی آگار برای ایجاد حالت نیمه جامد در این محیط وجود دارد. هنگامی که H2S تولید می شود، با سولفات آمونیوم آهن ترکیب شده و رسوب سیاه و غیر قابل حل سولفید آهن را ایجاد می کند که می تواند در امتداد خط تلقیح شده بطور خطی عمیق قابل دیدن است.

اگر ارگانیسم متحرک نیز باشد، همه لوله سیاه می شود. این سیاه شدن در امتداد خط تلقیح یا سیاه شدن کل لوله نشاندهنده واکنش مثبت تولید گاز مورد نظر می باشد.

تهیه کننده : سهیلا عباسی


(A)
(B)
(C)
(D)
(E)
©Tasha Sturm

SIM آگار برای آشکارسازی وجود یا عدم وجود حرکت در باکتری و همچنین تولید اندول نیز بکار می رود. حرکت وقتی مثبت است که رشد باکتریها محدود به خط کشت داده شده نباشد.

اسید آمینه تریپتوفان تقریبا در همه پروتئینها یافت می شود. باکتریهایی که دارای آنزیم تریپتوفانازهستند می توانند تریپتوفان را هیدرولیز کرده و آنرا به محصولاتی نظیر اندول، اسید پیرورویک، و آمونیاک تبدیل کنند.

باکتری از پیرورویک اسید و آمونیاک برای رفع نیازهای غذایی خود استفاده می کند. اندول مصرف نشده و در محیط کشت انباشته می شود که وجود آن بوسیله افزودن معرف کوآکس آشکار می شود. این معرف با اندول واکنش داده و یک ترکیب قرمز روشن در سطح محیط ایجاد می کند. باکتریهایی که لایه قرمز را با افزودن معرف ایجاد می کنند اندول مثبت هستند و اگر این رنگ آشکار نشد یعنی تریپتوفان هیدرولیز نشده و باکتری اندول منفی است.

تهیه کننده : سهیلا عباسی

- تست **SIM** که برای سنجش اندول، 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 SH2تجزیه 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

مواد و وسایل لازم:

محیط کشت SIM (حاوی ۴٪ آگار)، معرف کواکس، کشت میکروبی مورد نظر (اشرشیا کلی ، پروتئوس میرابیلیس)، لوپ سوزنی.

روش کار:

ابتدا توسط لوپ سوزنی از کلنی های مورد نظر برداشته و به طریقه سوزنی (خطی صاف) در محیط کشت تلقیح عمقی انجام می دهیم. سپس محبطها را در اتوو ۳۷ درجه به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت نگهداری و بعد از این مدت نتایج را بررسی می کنیم.

نتیجه:

تولید H_2S: رنگ سیاه در لوله نشاندهنده جواب مثبت و تولید گاز مزبور می باشد. در غیر اینصورت تولید H_2S را منفی گزارش کنید.

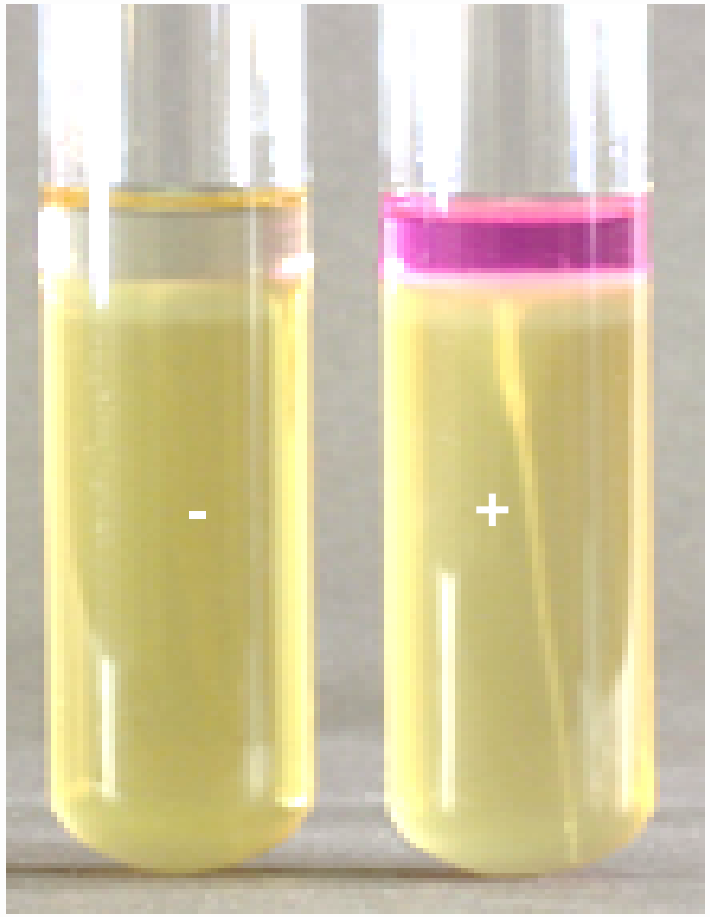
تولید اندول: ۲ تا ۳ قطره معرف کواکس را روی لوله بریزید و بلافاصله تغییر رنگ را در سطح لوله مشاهده کنید. اگر حلقه قرمز رنگ در بالای لوله ایجاد شد تولید اندول مثبت و در غیر اینصورت منفی است. اگر مدت اتوو گذاری محیط SIM بیش از ۴۸ ساعت باشد اندول تجزیه شده و نتیجه منفی کاذب می دهد.

بررسی حرکت : اگر میکروب بصورت ابر منتشر در اطراف محل تلقیح رشد کند حرکت مثبت است و اگر بصورت فشرده فقط در محل تلقیح رشد کند منفی است.

تهیه کننده : سهیلا عباسی

Indole Test

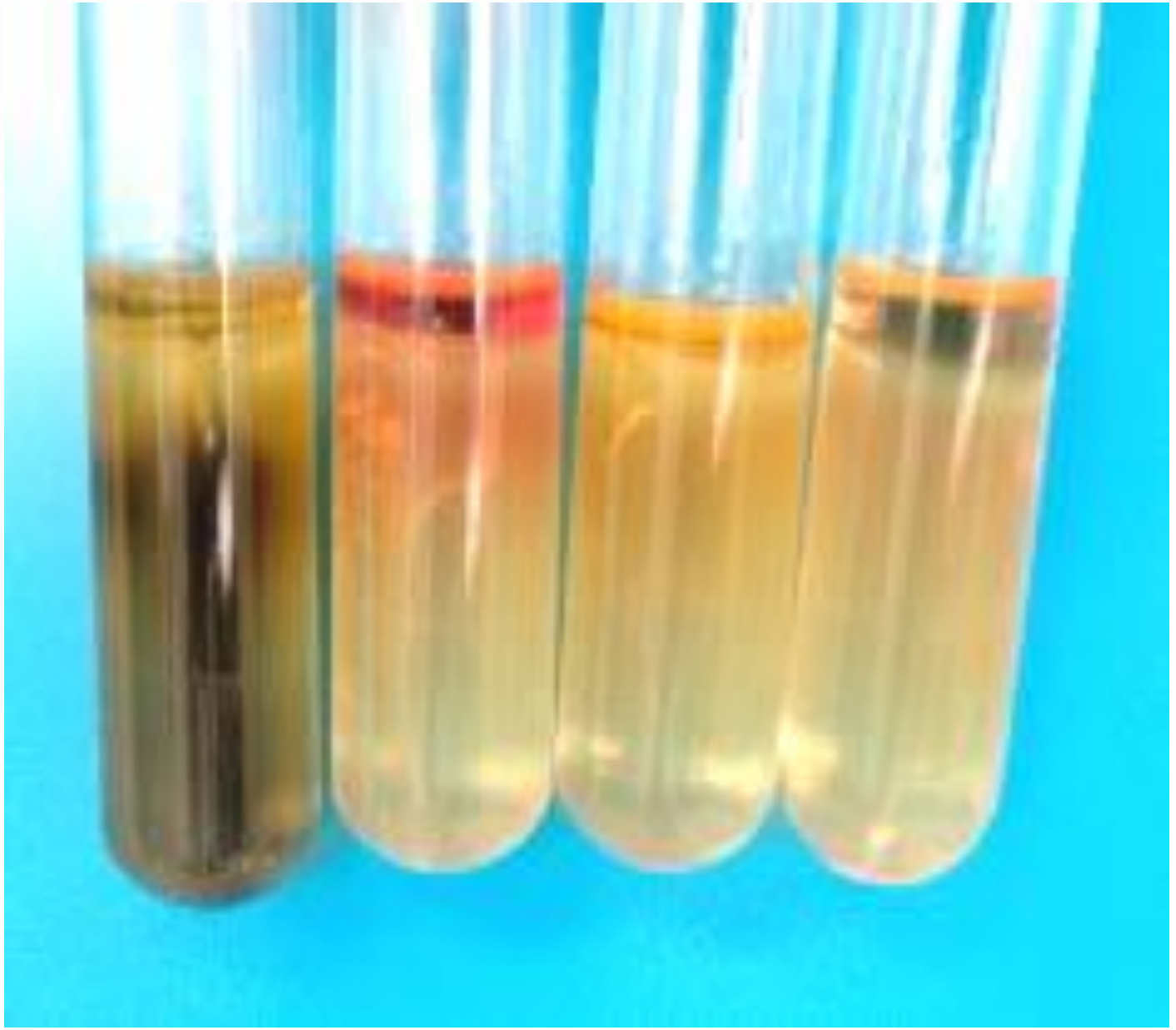
Negative Positive

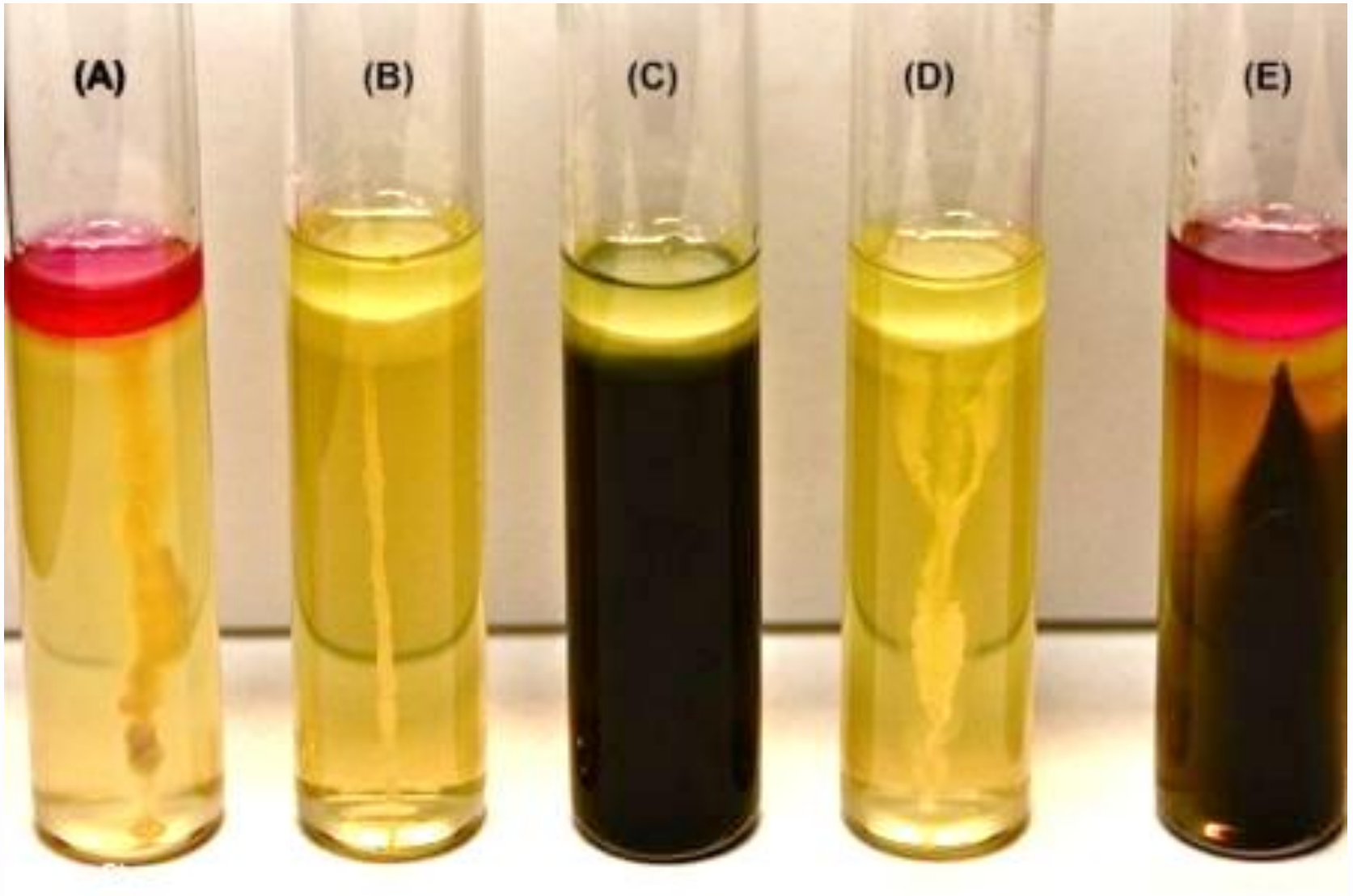


تهیه کننده : سهیلا عباسی

Motility Test

تهیه کننده : سهیلا عباسی





تهیه کننده : سهیلا عباسی

MR – VPتست

- Methyl Red Test
- همه باکتریهای روده ای برای تامین انرژی قادر به کاتابولیز کردن گلوکز هستند. ولی بواسطه دو راه مختلف که محصولات نهایی حاصل بسته به اینکه باکتری از کدام مسیر اینکار را انجام دهد و مسیرهای آنزیمی موجود در باکتری متفاوت است. این تست قادر است بین این دو دسته از میکروبها تمایز قایل شود.
- بدین ترتیب که باکتریهایی مثل E . coli در محیط مایع حاوی گلوکز ، تخمیر اسیدی مخلوط انجام داده(Mixed acid fermenters) که مقادیر زیادی اسید استیک ، اسید لاکتیک ، اسید فرمیک ، اسید سوکسینیک و اتانول تولید میشود که باعث پایین آمدن pH تا حدود ۴ یا ۵ می شود. معرف متیل رد بعنوان اندیکاتور pH می تواند اسیدی شدن محیط را برای ما با تغییر رنگ آشکار سازد، بنابراین برای بررسی پاسخ تست بصورت تشکیل اسیدهای آلی از آن استفاده می شود. این معرف در pH های اسیدی ۴ و ۵ قرمز و در pH های ۶ تا ۷ زرد رنگ است.

تهیه کننده : سهیلا عباسی

وژپروسکوئرVP

- از طرف دیگر باکتریهایی مثل E . aerogenes از راه تخمیری دیگری به نام تخمیر بوتیلن گلیکول استفاده می کنند که در آن مقدار ناچیزی اسید و مقادیر فراوانی بوتان دی اول و استوئین (ماده حدواسط برای تولید بوتیلن گلیکول) تولید می شود (Butanediol fermenters). و در نتیجه pH محیط خیلی پایین نمی رود و بررسی جواب تست با معرفهای دیگری به نام محلول KOH چهل درصد و سپس محلول منفی آلفا نفتل انجام می‌شود.
- در این آزمایش از محیط کشت MR-VP که دارای بهترین نسبت پپتون ، بافر و گلوکز برای آزمایش مورد نظر است استفاده می شود. این محیط به صورت تجاری موجود بوده و برای آزمایش متیل رد و وژپرسکوئر مصرف می‌شود.

تهیه کننده : سهیلا عباسی

تست MR/VP متیل رد و وژزپروسکوئر

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 گلیکول تولید می‌شود:

بوتیلن گلیکول←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

- تست **MR-VP** نیز محیطی است مایع و به رنگ زرد کم رنگ که جهت دو تست متیل رد و ووژز پروسکوئر به کار می رود .برای تشخیص باکتری های تولید کننده ۳ و ۲ بوتان دیول ,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

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 cc 2/5 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

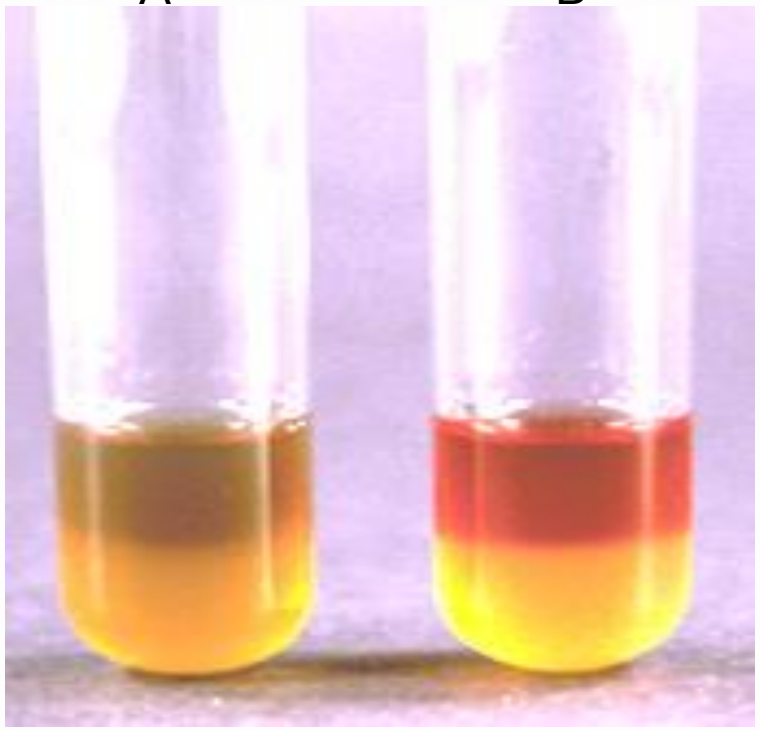
A B

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

تهیه کننده : سهیلا عباسی

Voges Proskauer Test

A B



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

تهیه کننده : سهیلا عباسی

هیدرولیز ژلاتین

برخی از باکتریها دارای آنزیم ژلاتیناز بوده و قادرند ژلاتین را هیدرولیز با اصطلاحا ذوب نمایند.
بررسی وجود یا عدم وجود این آنزیم در باکتری، برای جداسازی و شناسایی بسیاری از گونه های باکتریایی مفید و کاربردی است. از طرف دیگر برای بررسی پاتوژن بودن بعضی از باکتریها بکار می رود. زیرا تولید ژلاتیناز اغلب با توانایی باکتری برای تجزیه کلاژن بافت همبند و انتشار یافتن در بدن در ارتباط می باشد.
برای بررسی هیدرولیز ژلاتین از لوله های عمیق حاوی مواد غذایی و ژلاتین استفاده می شود.

بعد از انکوباسیون ، کشت ها در درون یخچال یا حمام یخ در دمای ۴ درجه سانتیگراد قرار می گیرند تا قسمت بالای محیط دوباره به شکل جامد در آید. اگر ژلاتین هیدرولیز شده باشد ، محیط مزبور حتی بعد از گذاشتن در یخچال هم باز بصورت مایع باقی می ماند. اگر ژلاتین هیدرولیز نشده باشد دوباره در دمای پایین به شکل جامد در می آید.

محیطهای کشت ژلاتین باید حتما تازه تهیه شده باشند زیرا چسبندگی محیط ژلاتین اتوکلاو شده در اثر نگهداری در دمای آزمایشگاه افزایش می یابد و جواب آزمایش را تحت تاثیر قرار می دهد.

تهیه کننده : سهیلا عباسی

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

مواد و وسایل لازم:

محیط کشت نوترینت براث + ۱۵٪ ژلاتین(ژلاتین براث)، کشت میکروبی ۲۴ ساعته استافیلو کو کوس آرئوس بر روی نوترینت آگار، لوپ سوزنی.

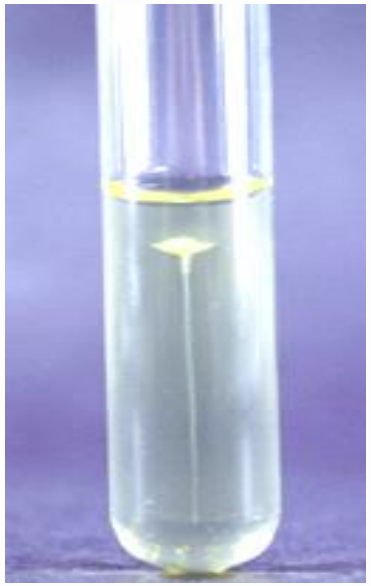
روش کار :

ابتدا به لوله حاوی ژلاتین که در یخچال بصورت جامد شده است از میکروب مورد نظر بطریقه عمقی (stab) با لوپ سوزنی تلقیح نمایید. سپس آنرا همراه با یک لوله شاهد بدون باکتری در انکوباتور ۳۷ درجه قرار دهید. هر ۲۴ ساعت یکبار لوله را از اتو خارج کرده و با گذاشتن در یخچال نتیجه را بررسی کنید.

نتیجه در صورتیکه قسمتی یا تمام ژلاتین ذوب شده در یخچال نیز بر خلاف لوله شاهد دوباره جامد نشده و مایع بماند ، جواب تست مثبت است. در صورتی که محیط مزبور در یخچال جامد شود ، جواب تست منفی است و البته باید تا یک هفته هر روز کنترل شود.

تهیه کننده : سهیلا عباسی

Gelatin Hydrolysis



تهیه کننده : سهیلا عباسی

تست هیدرولیز نشاسته

- بسیاری از باکتریها آنزیمهایی تولید می کنند که هیدرولاز نامیده می شوند. هیدرولازها در حضور آب باعث شکستن مولکولهای آلی بزرگ به مولکولهای کوچکتر می شوند. یکی از این آنزیمها ، آمیلاز نام دارد که اگزو آنزیمی است که قادر به شکستن نشاسته می باشد. مولکول نشاسته از دو جزء تشکیل شده است:
- آمیلوز که پلیمری غیر منشعب از گلوکز (۲۰۰ تا ۳۰۰ واحد) است و دیگری آمیلوپکتین که یک پلیمر بزرگ منشعب است. هر دوی اینها در بعضی از باکتریها بواسطه وجود آنزیم آلفا - آمیلاز به سرعت هیدرولیز می شوند و دکسترین ، مالتوز ، و گلوکز بدست می آید.

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.

مواد و وسایل لازم: محیط کشت نشاسته آگار، محلول ید یا لوگل (بدیدوره)، کشت میکروبی (باسیلوس سابتیلیس، اشرشیا کلی ، سودوموناس آئروژینوزا).

روش کار:

۱- محیط نشاسته آگار را به سه قسمت تقسیم کنید و در هر قسمت یک خط کوتاه از باکتری های مورد نظر را بطور جداگانه در هر قسمت تلقیح کنید.

۲- پلیت ها را به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت در انکوباتور قرار دهید .

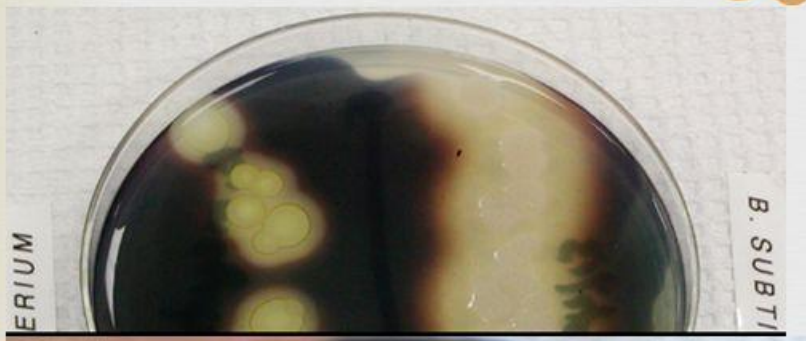
۳- رشد باکتریها را یادداشت کنید و سپس روی آن لوگل ریخته و نتایج را ثبت کنید.

تفسیر نتایج:

نقاطی که شفاف دیده می شوند ، نشاسته در آن قسمت ها هیدرولیز شده است و جواب تست مثبت است. در جاهایی که به رنگ آبی تیره دیده می شود یعنی هنوز نشاسته وجود داشته که با لوگل تولید کمپلکس رنگی را نموده است و جواب تست منفی است.

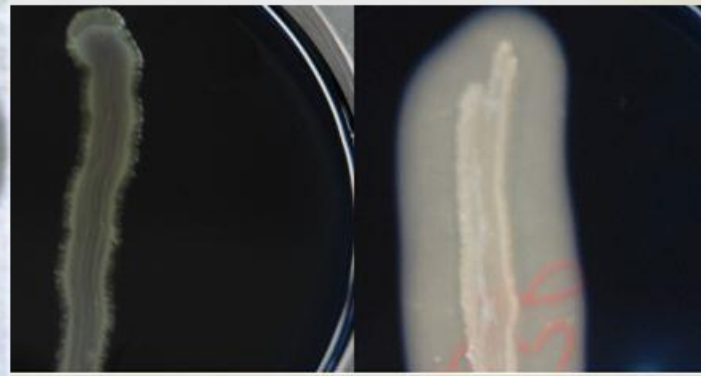
تهیه کننده : سهیلا عباسی

تست فعالیت آمیلولیتیک:



37°c

48 h



تست کاتالاز

- تعدادی از باکتریها فلاوو پروتئینهایی را دارا می باشند که O2 را احیا نموده و منجر به تشکیل پراکسید هیدروژن (H2O2) یا سوپراکسید می شوند. این ترکیبات به شدت سمی هستند. زیرا عواملی با قدرت اکسید کنندگی شدید بوده و می توانند همه اجزای سلولی را به سرعت تخریب نمایند. باکتری باید بتواند خود را در برابر این ترکیبات محافظت کند و گرنه کشته خواهد شد. بسیاری از باکتریها آنزیمهایی دارند که آنها را در برابر این مواد محافظت می کند.
- باکتریهای هوازی اجباری و بیهوازی اختیاری معمولا آنزیمهای سوپراکسید دیسموتاز (تخریب کننده سوپراکسید) و آنزیم کاتالاز با پراکسیداز (که پر اکسید هیدروژن را از بین می برد) را دارا می باشند.

- بیشتر باکتریهای بیهوازی اجباری فاقد هر دوی این آنزیمها بوده و بنابراین نمی توانند اکسیژن را تحمل کند.
- تولید آنزیم کاتالاز و فعالیت آن می تواند بواسطه افزودن ماده H_2O_2 به کشت باکتریایی که به میزان مناسب انکویه شده است (۱۸ تا ۲۴ ساعت) مشخص شود.
- اگر این آنزیم توسط باکتری تولید شده باشد، واکنش شیمیایی که در بالا گفته شد باعث تولید گاز اکسیژن آزاد می شود حبابهای اکسیژن نشاندهنده جواب مثبت تست می باشد و نبودشان نشاندهنده نتیجه منفی است.

- فعالیت کاتالازی صفت مفیدی در تمایز بین گروههای باکتریایی می باشد. برای مثال، باکتریهای انتروکوکوس و استافیلوکوکوس هر دو از نظر مورفولوژی مشابه هم هستند ولی با استفاده از این تست می توان آنها را از هم تشخیص داد. زیرا انتروکوکوس، کاتالاز منفی و استافیلوکوکوس کاتالاز ثبت می باشد.
- آنزیم کاتالاز در گلبولهای قرمز نیز وجود دارد لذا برداشت کلنی از محیط کشت آگار خوندار برای این تست منجر به ایجاد جواب مثبت کاذب خواهد شد. بنابر این هرگز از این محیط در این تست استفاده نمی شود.
- آنزیم کاتالاز در کشتهای تازه و باکتریهای زنده وجود دارد لذا از آزمایش کاتالاز روی کلنی های مسن و پیر (کشت بیش از ۲۴ ساعت) خودداری کنید زیرا ایجاد پاسخ منفی کاذب می شود.
- گاهی که برای آزمایش کاتالاز از فیلدو پلاتین های پلاتینیوم استفاده می شود حبابهایی در قطره آب اکسیژنه دیده می شود که منجر به پاسخ مثبت کاذب می گردد. لذا استفاده از فیلدو پلاتینهایی از جنس نیکروم توصیه می شود. این تست نیز به دو صورت لامی و لوله ای قابل انجام است.

تهیه کننده : سهیلا عباسی

- **مواد و وسایل لازم :**

آب اکسیژنه ۳٪ تازه تهیه شده در شیشه های رنگی دور از نور، کشت تازه از باکتری خالص

- **روش کار:**

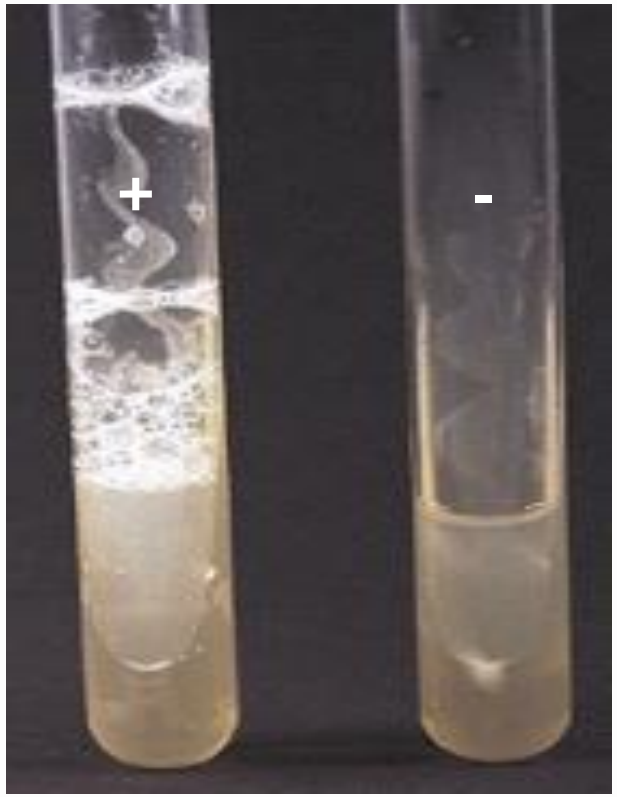
- **روش لامی** : یک لام تمیز را برداشته و مقداری از کلنی باکتری در کشت تازه را با استفاده از لوپ نیکرومی یا یک اپلیکاتور چوبی برداشته و بر روی لام می گذاریم. سپس یک قطره آب اکسیژنه ۳٪ به آن اضافه نموده و مخلوط می کنیم همان موقع نتایج تولید حباب) را بررسی می نماییم.
- **روش لوله ای** : باکتریهای مورد نظر را روی محیط کشت اسلنت کشت داده و در انکوباتور به مدت ۲۴ ساعت قرار می دهیم سپس لوله های مزبور را برداشته و در جالوله ای قرار می دهیم و چند قطره از آب اکسیژنه ۳٪ را روی مناطقی از اسلنت که باکتری رشد دارد می ریزیم و سپس نتایج را بررسی می کنیم.

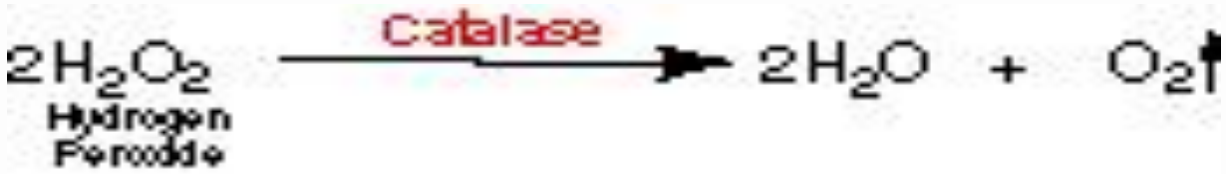
- **نتیجه:**

- پیدایش سریع حباب‌های اکسیژن نشان دهنده وجود آنزیم کاتالاز و انجام واکنش بالا و جواب مثبت می‌باشد

تهیه کننده : سهیلا عباسی

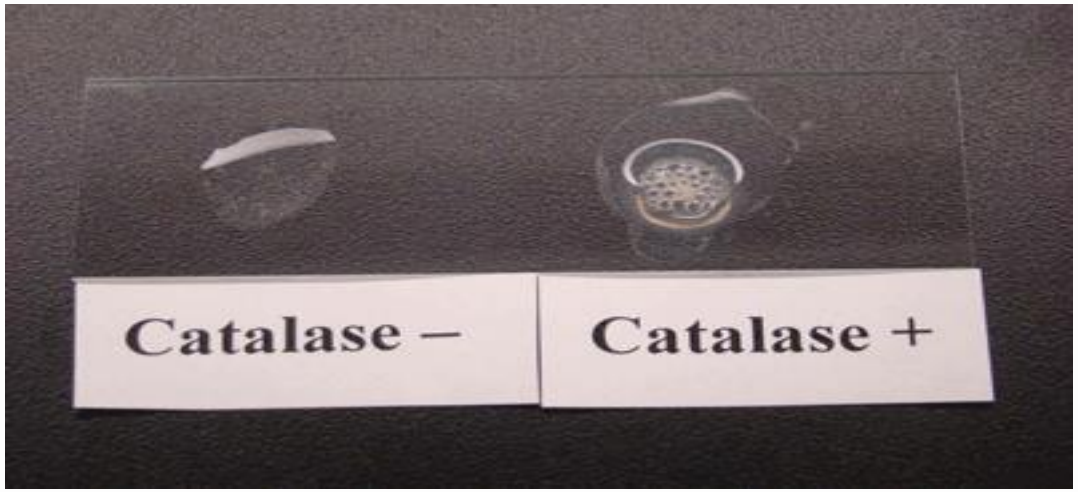
Catalase Test

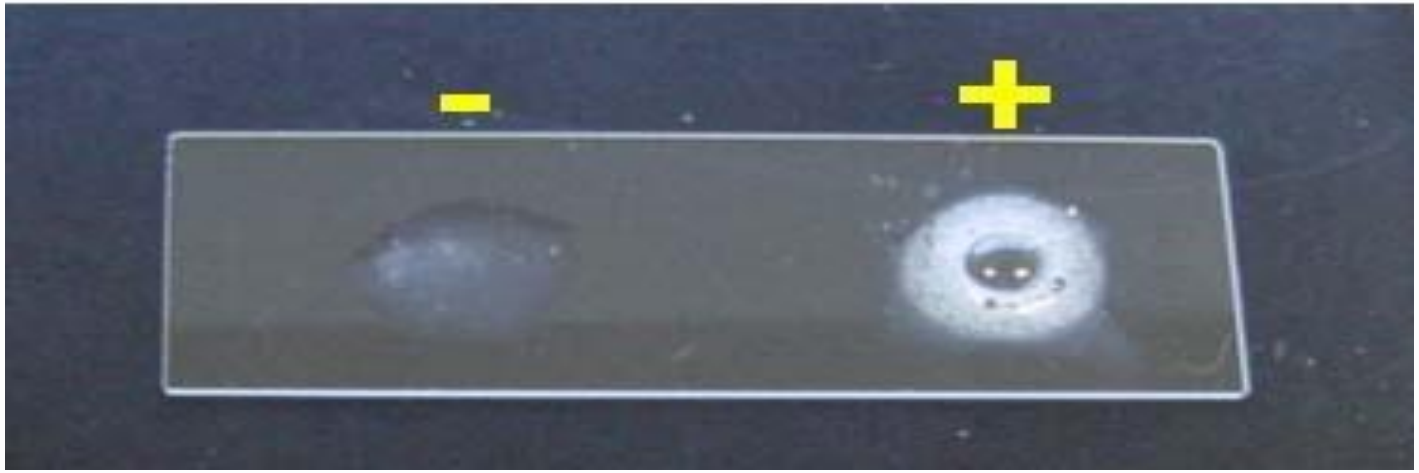




Positive Negative

Catalase test





با تشکر از حسن توجه شما