به نام خدا

Bacteriology Lab 1

By: **Dr. A. Mohammadi**

Department of Biology,
Faculty of science,
University of Alzahra

fppt.com

آزمایشگاه چهارم
سودوموناس

باکتری های گرم منفی روده ای
اشریشیا کلای
کلبسیلا
شیگلا
پروتئوس
سالمونلا

fppt.com

۱- سودوموناس

- سودومونا به انگلیسی: (Pseudomonas)، سرده (جنس) مهمی از باکتریهای گرم منفی متعلق به شاخه پروتئوباکتریا ، رده گاماپروتئوباکترها هستند.
- این ارگانیسمهای هوازی تنوع زیادی دارند. گونه‌های این سرده اغلب میله‌ای شکل، بدون اسپور، تاژک دار، کاتالاز مثبت و اکسیداز مثبت هستند.متابولیسم گونه‌های سودوموناس تنفسی بوده وحالت تخمیری ندارند. این باکتریها اغلب خاکزی هستند و قادرند از ۱۵۰ ترکیب آلی بعنوان منبع کربن وانرژی استفاده نمایند.
- گروه مهمی از سودوموناها مانند سودوموناس آئروژینوزا خاصیت فلورسانس دارند. وجه تمایز سودوموناس‌های فلورسنت از سایر سودوموناس‌ها، تولید پیگمانهایی است که در برابر نور طول موج کوتاه فرابنفش (۲۵۴ نانومتر) بویژه در شرایط کمبود آهن خاصیت فلورسانس دارند. به این پیگمان‌های با خاصیت فلورسنت و محلول در آب سیدروفور و اختصاصاً در مورد سودوموناس‌ها پیووردین یا سودوباکتین گفته می‌شود.

fppt.com

۱– سودوموناس

- جنس سودوموناس ها با توجه به توانایی بالایی که در برداشت مواد غذایی دارند در بسیاری از محیطها یافت می شوند .
- سودوموناس ها باسیل های گرم منفی مستقیم یا خمیده ، هوازی ، اکثرا متحرک و دارای چند فلاژل در یک قطبی یا دو قطبی باکتری هستند به جز سودوموناس مالئی **mallei** که بدون حرکت است
- باکتری های این جنس قادر به تخمیر قندها نیستند اما دارای آنزیم اکسیداز می باشند که به وسیله این تست ها از خانواده آنتروباکتریاسه ها جدا می شوند.
- سودوموناس آئروژینوزا یک عفونت فرصت طلب و اغلب بیمارستانی است تشخیص عفونت سودوموناس آئروژینوزا با جدا سازی و تشخیص آزمایشگاهی روی می‌دهد. این باکتری به خوبی روی بیشتر محیطهای کشت آزمایشگاهی رشد می‌کند . شناسایی این باکتری بر پایه مورفولوژی گرم، ناتوانی در تخمیر لاکتوز (یک واکنش اکسیداز مثبت)، بوی میوه (با مزه انگور) و توانایی رشد در دمای ۴۲ درجه سانتیگراد شناسایی می‌شود. ویژگی فلوئورسانس زیر نور فرابنفش نیز در تشخیص فوری کلنی‌های سودوموناس آئروژینوزا کارساز بوده و در تشخیص وجود آن در زخم‌ها کمک می‌کند. این باکتری به بسیاری از آنتی بیوتیکها مقاوم است.

fppt.com

۱– سودوموناس

- گونه های مهم جنس سودوموناس :
- سودوموناس آئروژینوزا ،
- سودوموناس سپاسیا ،
- سودوموناس مالتوفیلیا ،
- سودوموناس مالئی.
- سودوموناس آئروژینوزا ، سودوموناس پوتیدا ، و سودوموناس فلورسنس در گروه سودوموناس های فلورسنت قرار دارند
- سودوموناس مالئی و سودوموناس مالتوفیلیا و سودوموناس سپاسیا در گروه سودوموناس های غیر فلورسنت قرار دارند
- این باکتریها به سادگی در محیط های معمولی مثل آگار خوندار و آگار غذایی رشد میکنند و دارای همولیز بتا می باشند و تقریبا در تمام محیط های کشت آزمایشگاهی قابل پرورش و جداسازی هستند.

fppt.com

تشخیص آزمایشگاهی

- نمونه مورد نظر را پس از بررسی مستقیم توسط میکروسکوپ بر روی محیط های آگار خوندار و مک کانکی یا EMBکشت دهید.
- این باکتری بر روی محیط مک کانکی کلنی های درشت لاکتوز منفی به وجود می آورد. سپس کلنی حاصله را بر روی محیط کلیگر آیرون آگار یا TSIمنتقل کنید. این باکتری بر روی این دو محیط ایجاد جلای فلزی می نماید.
- تست سیترات در این باکتری مثبت و تست های اندول ، متیل رد و VPدر این باکتری منفی است و ژلاتین را ذوب می کند و قادر به تخمیر قندها نمی باشد.

fppt.com

Isolation Of Enterobacteriaceae

- To isolate Enterobacteriaceae and Pseudomonas, specimens from the infected site are plated out on any one of a large number of selective and differential media such as EMB agar, Endo agar, Deoxycholate agar, MacConkey agar, Hektoen Enteric agar, and XLD agar.
- Xylose Lysine Deoxycholate agar is selective for gram-negative bacteria XLD agar contains: sodium desoxycholate ,sugars lactose and sucrose, the amino acid L-lysine, sodium thiosulfate, ferric ammonium citrate and the pH indicator phenol red.
- sodium desoxycholate, which inhibits the growth of gram positive bacteria but permits the growth of gram-negatives.

fppt.com

- If the gram-negative bacterium ferments lactose and/or sucrose, acid end products will be produced and cause the colonies and the phenol red in the agar around the colonies to turn yellow. If lactose and sucrose are not fermented but the amino acid lysine is decarboxylated, ammonia, an alkaline end product will cause the phenol red in the agar around the colonies to turn a deeper red. Sometimes the sugars are fermented producing acid end products and lysine is broken down producing alkaline end products in this case some of the colonies and part of the agar turns yellow and some of the colonies and part of the agar turns a deeper red.
- If hydrogen sulfide is produced from thiosulfate reduction, part or the entire colony will appear black.

✓ Typical reactions for some of the Enterobacteriaceae and Pseudomonas are:

- *Escherichia coli*: flat yellow colonies; some strains may be inhibited.
- *Enterobacter* and *Klebsiella*: mucoid yellow colonies.
- *Proteus*: red to yellow colonies; may have black centers.
- *Salmonella*: usually red colonies with black centers.
- *Shigella* and *Pseudomonas*: red colonies without black centers.

fppt.com

Isolation Of *Pseudomonas*

- Pseudosel agar is selective for *Pseudomonas aeruginosa* and also stimulates *P. aeruginosa* to produce its characteristic pigment as well as fluorescent products. *Pseudomonas aeruginosa* will typically produce a green to blue water-soluble pigment on this agar and will also fluoresce when the plate is placed under a short wavelength ultraviolet light.

- Pseudosel agar contains cetrimide which inhibits most bacteria other than *Pseudomonas aeruginosa*. It also contains potassium sulfate and magnesium chloride which stimulate *P. aeruginosa* to produce the pyocyanin (a blue , non fluorescent pigment soluble in water and chloroform)
- Pseudosel agar can be used to stimulate the production of pigment and fluorescent products.

fppt.com

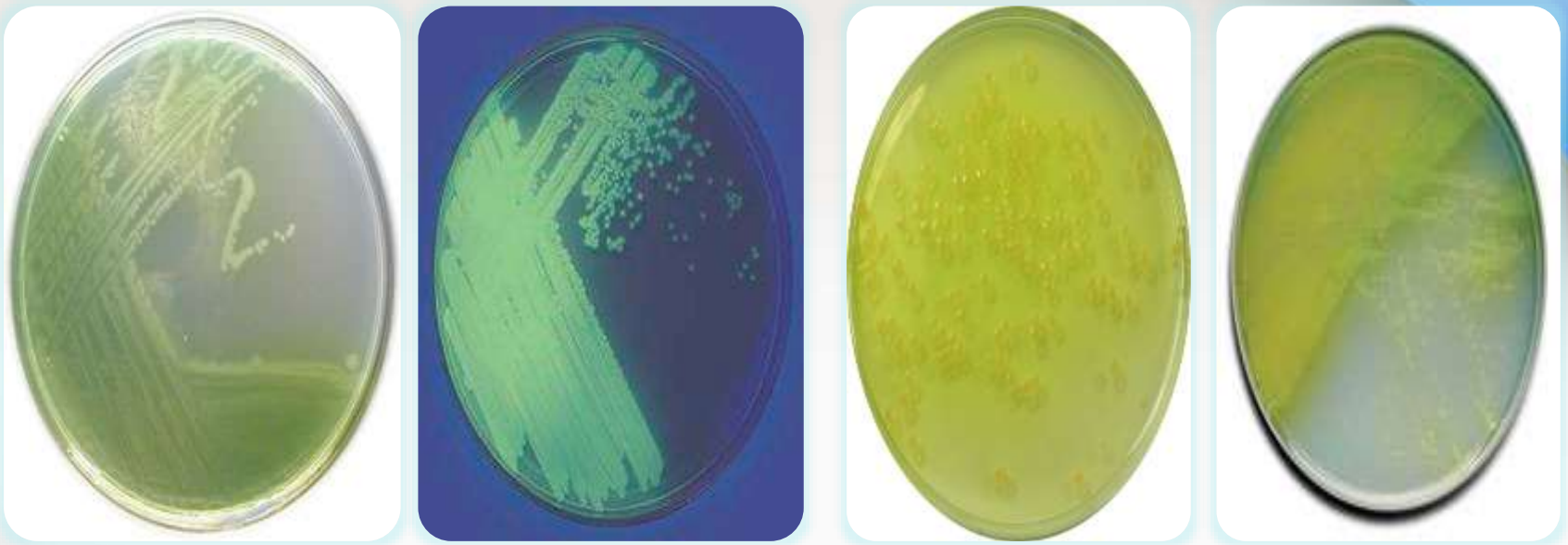
- **Pigment production on Pseudosel agar**
  - *Pseudomonas aeruginosa* produces a green to blue, water soluble pigment called pyocyanin.

- **Fluorescence under ultraviolet light on Pseudosel agar**
  - It produces a product called fluorescein that will fluoresce under short wavelength (254nm) ultraviolet light.

- **Odor**
  - Most of the Enterobacteriaceae have a rather foul smell; *Pseudomonas aeruginosa* produces a characteristic fruity or grape juice-like aroma due to production of an aromatic compound called aminoacetophenone.

- **Fermentation of glucose.**
  - All of the Enterobacteriaceae ferment the sugar glucose; *Pseudomonas aeruginosa* and other no fermentative gram negative rods will not.

fppt.com



Pigment production on Pseudosel agar
Fluorescence under ultraviolet light on Pseudosel agar

fppt.com

کار عملی

۱– تست اکسیداز

- این تست برای شناسایی باکتری‌های دارای آنزیم تنفسی سیتوکروم اکسیداز C بکار می‌رود.
- در میان کاربردهای فراوان این تست، شناسایی احتمالی **نایسریا** اکسیداز مثبت قرار دارد.
- این تست همچنین در جداسازی انتروباکتریاسه‌ها همانند گونه‌های استافیلوکوکوس و استرپتوکوکوس (که همه اکسیداز **منفی** هستند) از باکتری‌هایی مثل سودوموناس، ویبریوناسه، آئروموناس، کمپیلوباکتر و پاستورلا (که همه اکسیداز **مثبت**اند) مفید است.
- ضمن اینکه در شناسایی ارگانیسم‌هایی که فاقد آنزیم سیتوکروم اکسیدازند یا بی‌هوازی اجباری‌ها کاربرد دارد.

۱– تست اکسیداز

- این تست برای شناسایی باکتری‌های دارای آنزیم تنفسی سیتوکروم اکسیداز C بکار می‌رود.
- در میان کاربردهای فراوان این تست، شناسایی احتمالی **نایسریا** اکسیداز مثبت قرار دارد.
- این تست همچنین در جداسازی انتروباکتریاسه‌ها همانند گونه‌های استافیلوکوکوس و استرپتوکوکوس (که همه اکسیداز **منفی** هستند) از باکتری‌هایی مثل سودوموناس، ویبریوناسه، آئروموناس، کمپیلوباکتر و پاستورلا (که همه اکسیداز **مثبت**اند) مفید است.
- ضمن اینکه در شناسایی ارگانیسم‌هایی که فاقد آنزیم سیتوکروم اکسیدازند یا بی‌هوازی اجباری‌ها کاربرد دارد.

۱– تست اکسیداز

- در تست اکسیداز، عامل احیاءکننده (معرف کواکس، معرف گوردون و مک لئود و ...) مستقیماً به محیط کشت جامد باکتریایی یا یک کلنی باکتریایی به یک کاغذ آغشته به عامل احیاءکننده افزوده می‌شود.

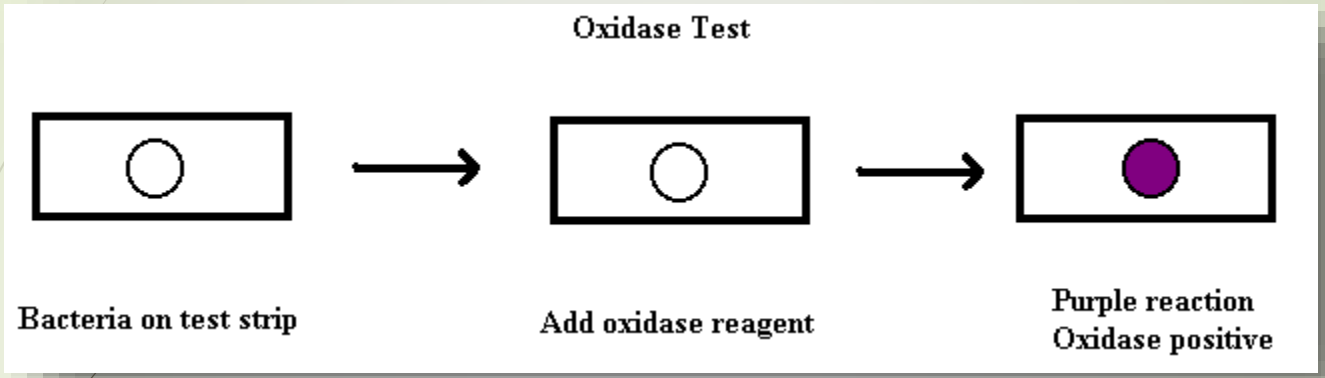
- اگر عامل احیاءکننده اکسید شود، در کسری از ثانیه می‌توان تغییر رنگ را مشاهده کرد که نشان‌دهنده حضور آنزیم سیتوکروم اکسیداز C است؛ اما عدم تغییر رنگ در زمان مشخص شده، نشان دهنده منفی بودن تست و نبود این آنزیم می‌باشد.

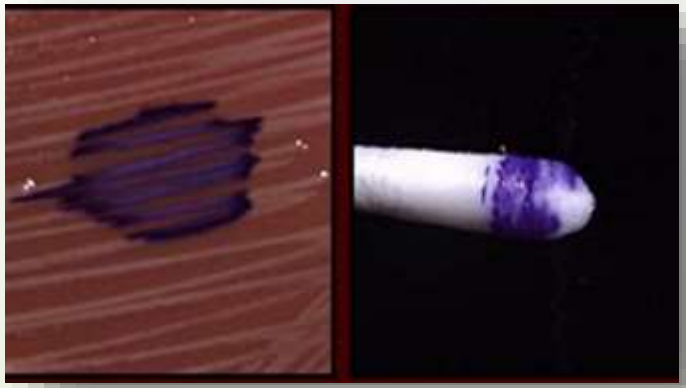
- بعضی از میکروارگانیسم‌ها اکسیداز **متغیر** و یا اکسیداز **مثبت تأخیری** می‌باشند.

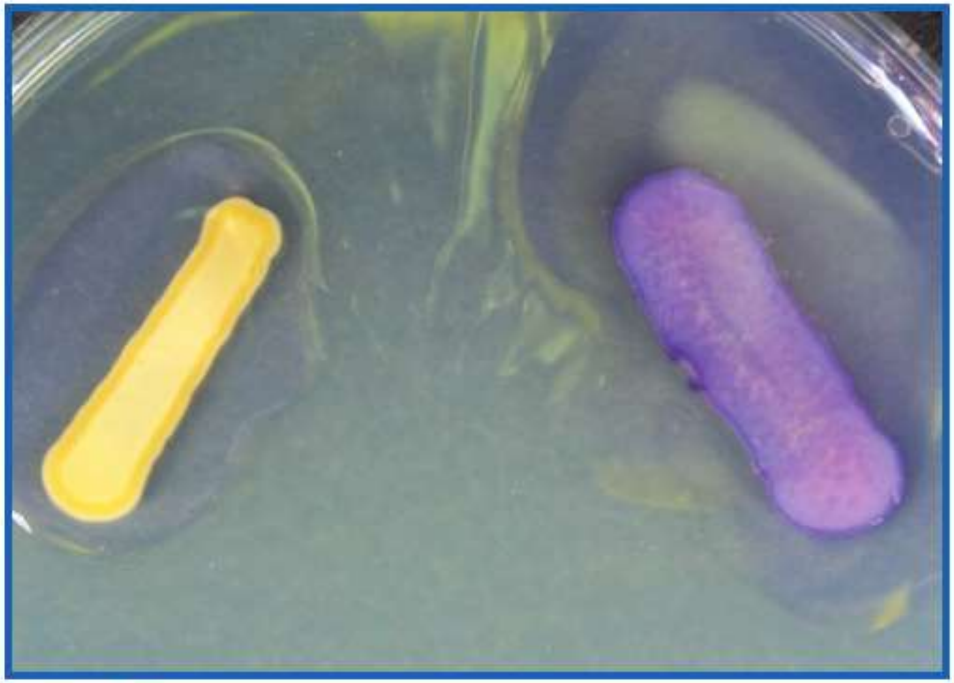
- **تنوع** در واکنش اکسیداز میکروارگانیسم‌ها به متفاوت بودن ترکیب سیتوکروم C، تنوع در سیتوکروم اکسیداز و تنوع در ترکیب زنجیره انتقالی مرتبط است.

Dr A.Mohammadi

Oxidase test







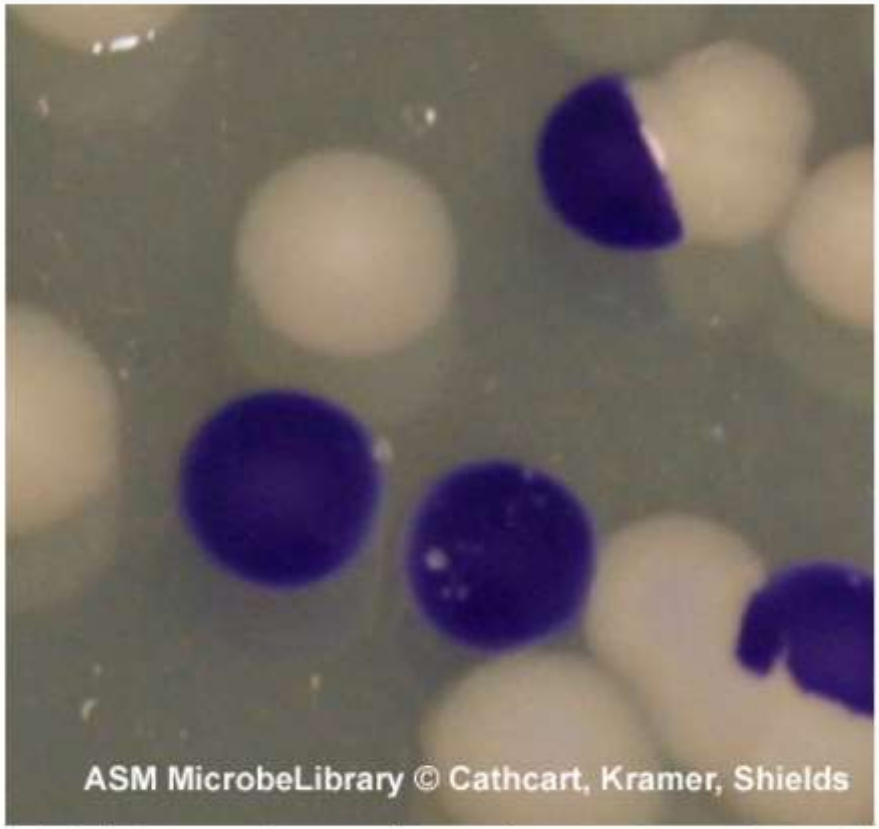
5-21 Oxidase Test on Bacterial Growth ✦ A few drops of reagent on oxidase-positive bacteria will produce a purple-blue color immediately.

5-22 Oxidase Slide Test ✦ Positive results with this test should appear within 20 seconds. The dark blue is a positive result. No color change is a negative result. The organism in the top right panel demonstrates a negative result (not blue) but appears yellow because it is pigmented. (BBL™ *Dry*Slide™ systems available from Becton Dickinson, Sparks, MD.)

Dr A.Mohammadi

نتیجه تست اکسیداز در روش کاغذ صافی؛ در سمت چپ، باکتری اکسیداز مثبت سودوموناس آئروژینوزا و در سمت راست، اشرشیا کلی اکسیداز منفی را مشاهده می کنید.

نتیجه تست اکسیداز در روش کاغذ صافی؛ در سمت چپ، باکتری اکسیداز مثبت سودوموناس آئروژینوزا و در سمت راست، اشرشیا کلی اکسیداز منفی را مشاهده می کنید.

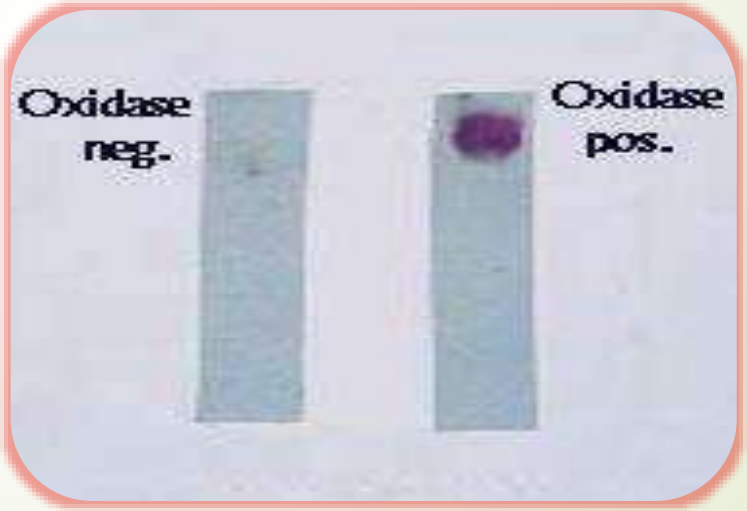


نتیجه تست اکسیداز در روش مستقیم روی پلیت؛ در این تصویر کشت مخلوطی از اشرشیا کلی اکسیداز منفی و ویبریو کلرا اکسیداز مثبت را مشاهده می کنید و اینکه چگونه تست اکسیداز موجب افتراق این دو شده است.

Dr A.Mohammadi

تست اکسیداز در لوله آزمایش؛
در سمت چپ، باکتری اکسیداز مثبت *Neisseria sicca* و در سمت راست، استافیلوکوکوس آرئوس اکسیداز منفی را مشاهده می کنید. پس از ۲۴ ساعت از کشت باکتری ها، معرف گبای و هادلی به هر لوله افزوده شد.

Dr A.Mohammadi



Dr A.Mohammadi

نکات

- نباید از کشت کهنه (بیشتر از ۲۴ ساعت) استفاده شود.
- محلول ۱٪ اکسیداز باید به‌صورت تازه و روزانه تهیه شود مگر اینکه محلول ساخته‌شده در فریزر نگهداری گردد. اکسیژن موجود در هوا می‌تواند روی معرف اثر گذارد و رنگ آن را ارغوانی کند.
- اگر از آمپول معرف‌ها استفاده می‌کنید، آن را به طور ایستاده و دور از خود نگه‌دارید. با کمک انگشت‌های نشانه و شست آن را فشار دهید تا شیشه داخل آمپول خرد شود.
- ارغوانی شدن پس از ۱۰ ثانیه نشانه واکنش منفی است چرا که اکسیژن هوا ممکن است معرف را اکسید کند.
- نباید از محیط‌های کشت رنگی مثل مک کانکی استفاده شود زیرا نتیجه مثبت کاذب می‌دهد.
- کنترل کیفی باید برای هر سری جدید و هر زمان که این تست انجام می‌شود، صورت گیرد. کنترل مثبت: *Pseudomonas aeruginosa* و کنترل منفی: ***E. coli***.
- برای انتقال باکتری روی کاغذ صافی یا دیسک اکسیداز نباید از لوپ فلزی مثل استیل یا نیکروم استفاده شود، زیرا بر اثر سوزاندن لوپ، مقدار کمی اکسید آهن بر روی آن ایجاد می‌شود، که ممکن است نتیجه مثبت کاذب دهد.
- به دلیل ایجاد تحریک، از تماس معرف با پوست و چشم خودداری نمایید.

Dr A.Mohammadi

کار عملی

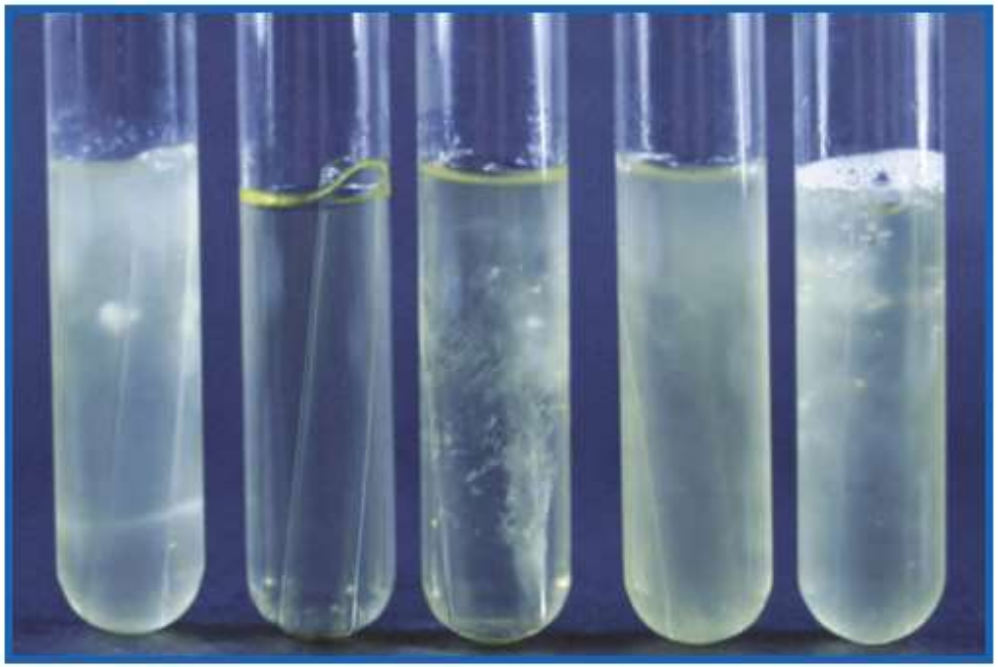
- ازمون اکسیداز را با کشت خالص از **باکتری سودوموناس و اشرشیا کلی** به صورت زیر انجام دهید :
- – ۲ تا ۳ قطره از معرف اکسیداز را روی یک کاغذ صافی قرار دهید .
- – با استفاده از یک میله شیشه ای ، سواب یا سوزن کشت پلاتینی (نیکل و کروم نباشد) مقداری از کلنی را روی کاغذ صافی قرار دهید
- – ظهور رنگ ارغوانی مایل به ابی تیره در مدت ۱۰ ثانیه را به عنوان واکنش مثبت در نظر بگیرید
- باکتری هایی که در مدت ۱۰ – ۶۰ ثانیه رنگ بنفش ایجاد می کنند ، نیاز به انجام تست های بیشتری دارند ، زیرا احتمالا متعلق به خانواده انتروباکتریاسه نمی باشند .

Dr A.Mohammadi

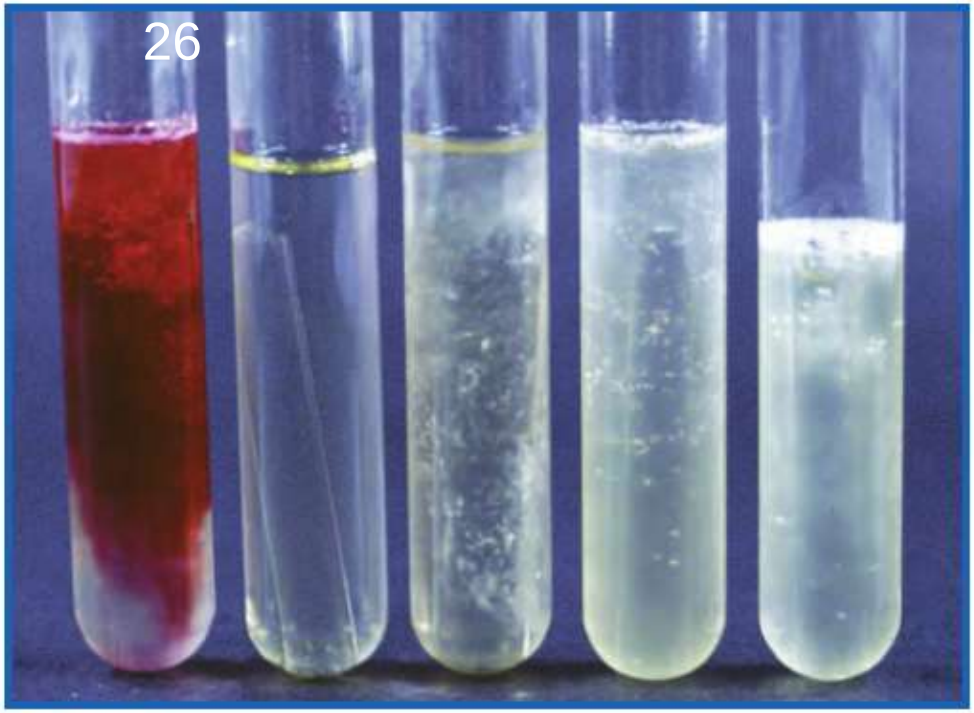
۲– احیای نیترات

- محیط نیترات براث یک محیط غیراختصاصی از عصاره گوشت، پپتون و نیترات پتاسیم (KNO_3) است.
- یک لوله دُرهام وارونه در هر براث قرار داده می‌شود تا هرگونه گاز تولیدی جمع‌آوری شود.
- برخلاف بسیاری از محیط‌های افتراقی، هیچ معرف رنگی در این محیط یافت نمی‌شود.

- **بررسی وجود دنیتریفیکاسیون**: بررسی چشمی برای حضور گاز در لوله دُرهام انجام می‌شود (شکل). اگر اینَ لوله دارای گاز بوده و باکتری موردنظر تخمیرکننده نباشد (شناسایی از طریق تست تخمیر)، تست، کامل و دِنیتریفیکاسیون انجام شده است.
- گاز تولید شده توسط یک باکتری تخمیرکننده در تست احیای نیترات، تعیین‌کننده نیست چرا که منشأ گاز مشخص نیست.



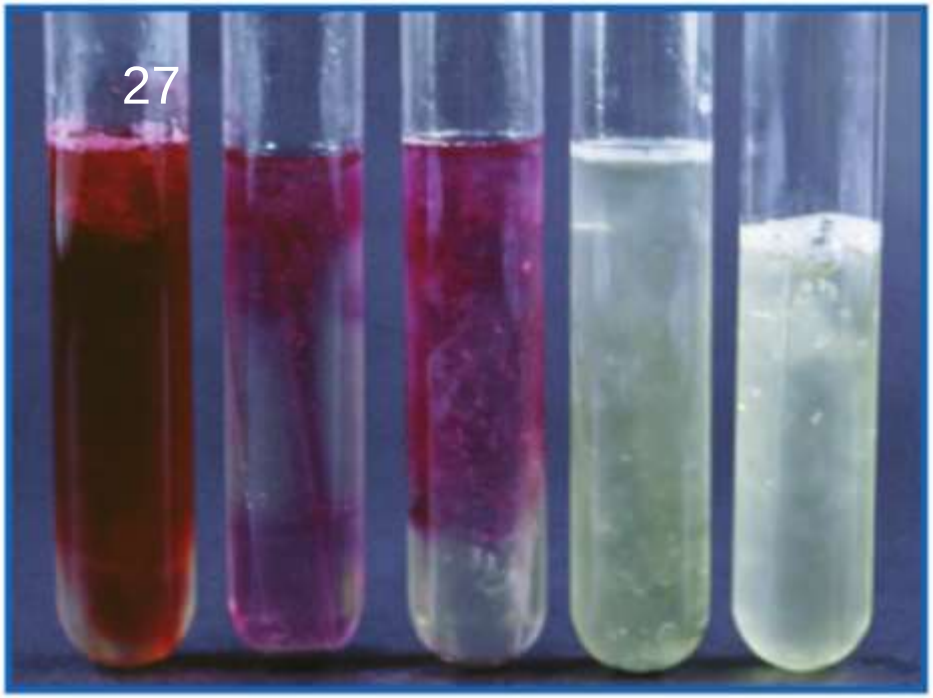
5-25 **Incubated Nitrate Broth Before the Addition of Reagents** ✦ Numbered 1 through 5 from left to right, these are Nitrate Broths immediately after incubation before the addition of reagents. Tube 2 is an uninoculated control used for color comparison. Note the gas produced by tube 5. It is a known nonfermenter and, therefore, will receive no reagents. The gas produced is an indication of denitrification and a positive result. Tubes 1 through 4 will receive reagents. See Figure 5-26.



5-26 INCUBATED NITRATE BROTH AFTER ADDITION OF REAGENTS ✦
After the addition of reagents, tube 1 shows a positive result. Tube 3 and tube 4 are inconclusive because they show no color change. Zinc dust must be added to tubes 2 (control), 3, and 4 to verify the presence or absence of nitrate. See Figure 5-27.

اگر شاهدی در خصوص دنیتریفیکاسیون دیده نشود، دو معرف اسید سولفانَیلیک (معرف A) و نفتیل آمین (معرف B) برای بررسی احیای نیترات به نیتریت، به محیط افزوده می‌شود. نیتریت در صورت وجود، در محیط آبی اسید نیتروز (HNO_2) ایجاد می‌کند. اسید نیتروز با معرف‌های افزوده شده واکنش داده و یک ماده قرمز رنگ محلول در آب تولید می‌کند .

اگر تغییر رنگی ایجاد نشود، احتمالاً نیترات احیاء نشده یا اینکه به دیگر ترکیبات نیتروژن دار (مثل نیتروژن مولکولی) احیاء شده است. به دلیل اینکه تشخیص میان این دو حالت به صورت چشمی غیرممکن می‌باشد بایستی از تست دیگری کمک گرفته شود.



5-27 INCUBATED NITRATE BROTH AFTER ADDITION OF REAGENTS AND ZINC ✦ Finally, a pinch of zinc is added to tubes 2, 3, and 4 because they have been colorless up to this point. Tube 2 (the control tube) and tube 3 turned red. This is a negative result because it indicates that nitrate is still present in the tube. Tube 4 did not change color, which indicates that the nitrate was reduced by the organism beyond nitrite to some other nitrogenous compound. This is a positive result.

افزودن مقدار کمی از پودر فلز روی به براث تا هر گونه نیترات موجود (که همچنان ممکن است به صورت KNO3موجود باشد) به نیتریت احیاء شود.

اگر باکتری‌ها یون‌های نیترات را احیاء نکرده باشند و لذا نیترات در هنگام افزودن روی در محیط موجود باشد، بلافاصله توسط روی به نیتریت تبدیل شده و با توجه به واکنش اسید نیتروز و معرف‌ها، رنگ قرمز در محیط ظاهر خواهد شد. در چنین مواردی، ظهور رنگ قرمز حاکی از عدم احیای نیترات توسط میکروارگانیسم و منفی بودن تست می‌باشد؛ اما اگر با افزودن روی هیچ تغییر رنگی مشاهده نشود، نتیجه‌ی آزمایش احیای نیترات مثبت می‌باشد.

در چنین مواقعی به دلیل احیای نیترات به NH3، NO، N2Oو یا دیگر ترکیبات نیتروژنی هیچ نیتراتی در محیط وجود ندارد.

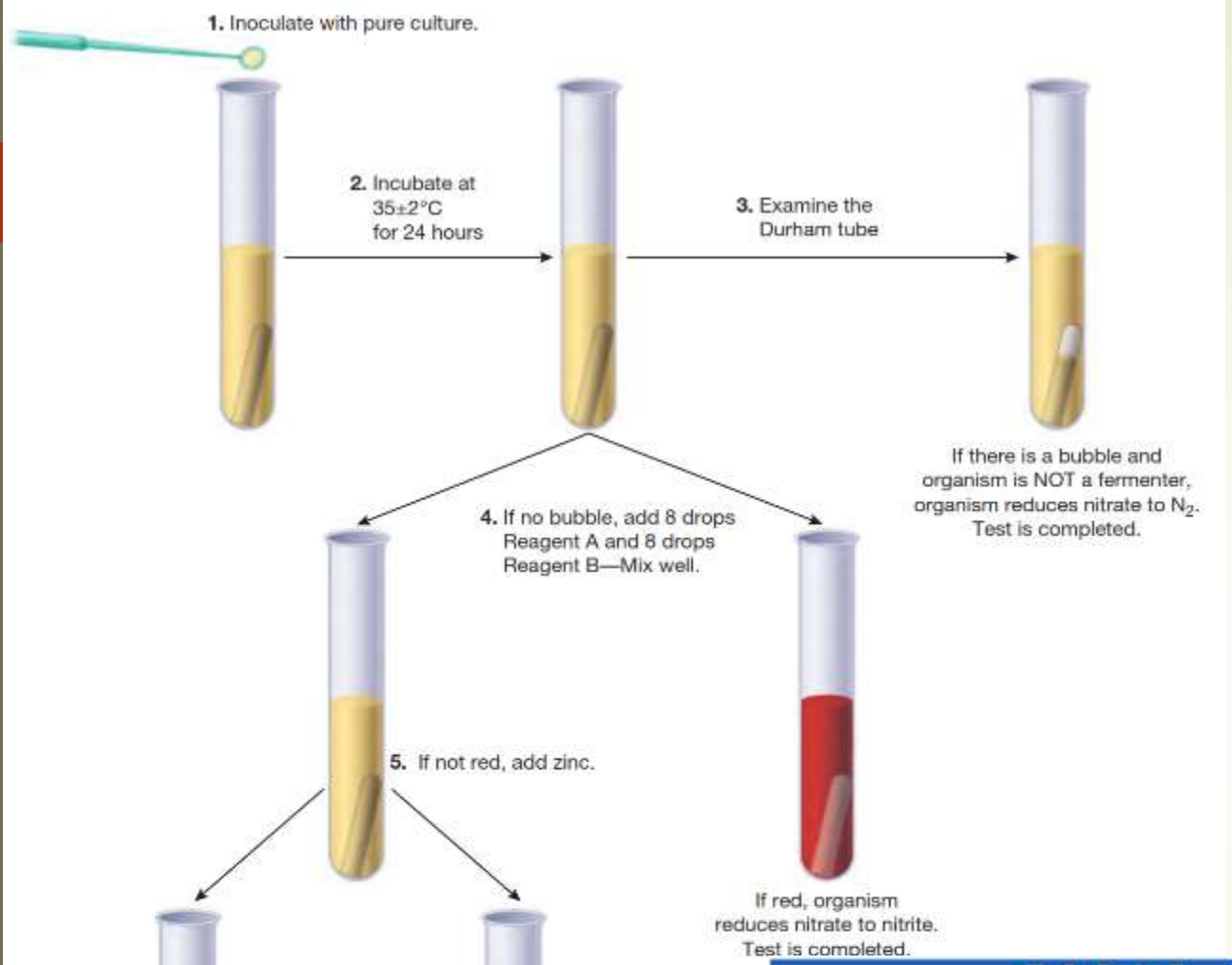


TABLE OF RESULTS

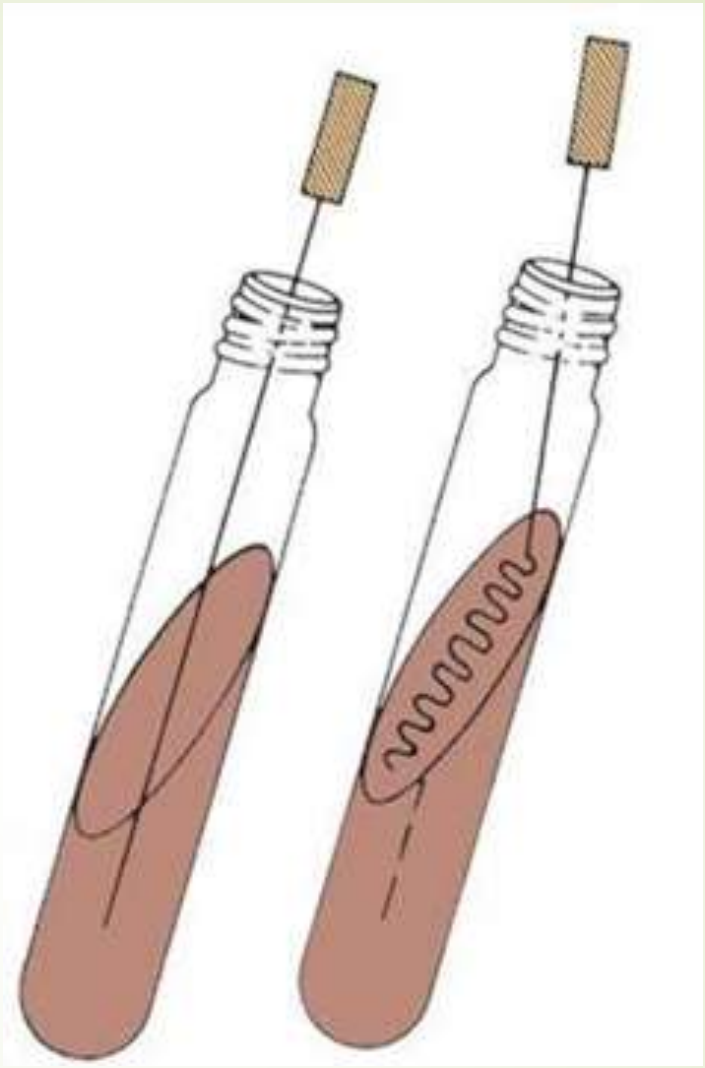
Result	Interpretation	Symbol
Gas (Nonfermenter)	Denitrification—production of nitrogen gas ($NO_3 \rightarrow NO_2 \rightarrow N_2$)	+
Gas (Fermenter, or status is unknown)	Source of gas is unknown; requires addition of reagents	
Red color (after addition of reagents A and B)	Nitrate reduction to nitrite ($NO_3 \rightarrow NO_2$)	+
No color (after the addition of reagents)	Incomplete test; requires the addition of zinc dust	
No color change (after addition of zinc)	Nitrate reduction to nongaseous nitrogenous compounds ($NO_3 \rightarrow NO_2 \rightarrow$ nongaseous nitrogenous products)	+
Red color (after addition of zinc dust)	No nitrate reduction	–

کار عملی

- سه لوله حاوی نیترات براث آماده کنید. نام نمونه یا باکتری مورد آزمایش، نام خودتان و تاریخ را بر سه عدد آن درج کنید. لوله چهارم را کنترل برچسب‌گذاری کنید.
- دو لوله براث را با باکتری‌های مورد آزمون **سودوموناس و اشرشیا کلی** تلقیح کنید. لوله کنترل را تلقیح نکنید.
- تمام لوله‌ها را در دمای ۲ ± ۳۵ °C، به مدت ۲۴ الی ۴۸ ساعت گرمخانه‌گذاری کنید.
- هر یک از لوله‌ها را از نظر تولید گاز بررسی کنید. نتایج به دست آمده را ثبت کنید. با کمک جدول تفسیر، نتایج را بررسی کنید.
- در صورت عدم وجود حباب، ۸ قطره (حدود ۵/۰ میلی‌لیتر) از معرف‌های **A** و **B** را به لوله‌ها اضافه کنید. لوله‌ها را به آرامی تکان دهید تا معرف‌ها به خوبی با محیط مخلوط شود. آنگاه لوله‌ها را به مدت ۱۰ دقیقه در مکانی ثابت قرار دهید. مشاهدات خود را ثبت کنید. لوله‌های تست مثبت که به رنگ قرمز درآمده‌اند را کنار بگذارید.
- در لوله‌هایی که تغییر رنگ در آن‌ها دیده نشده مقدار کمی پودر روی اضافه کنید (فقط مقدار کمی نیاز است. اپلیکاتور چوبی را درون پودر روی فرو برده و مقادیر کم متصل شده به آن را به درون لوله‌های موردنظر منتقل کنید). اگر پس از ۱۰ دقیقه هیچ‌گونه تغییر رنگی مشاهده نشود، نتیجه‌ی آزمایش برای احیای نیترات مثبت است امّا اگر تغییر رنگ به صورتی یا قرمز مشاهده شود، نتیجه‌ی آزمایش منفی است.
- نتایج این مرحله را نیز ثبت کنید.

۳-محیط TSI

- محیط تریپل شوگر آیرون آگار یک محیط غنی می‌باشد که برای جداسازی باکتری‌ها بر اساس توانایی تخمیر گلوکز، لاکتوز و ساکاروز و نیز احیا سولفور طراحی شده است.
- علاوه بر این سه کربوهیدرات، این محیط کشت حاوی پروتئین‌های حیوانی به عنوان منابع کربن و نیتروژن و سولفات فروس و سدیم تیوسولفات به عنوان منابع سولفور اکسید شده می‌باشد. اندیکاتورهای تغییر pHو سولفید هیدروژن در این محیط به ترتیب فنل رد و آهن به شکل سولفات فروس می‌باشند.
- آگار موجود در این محیط به صورت آگار شیب‌دار با ضخامت کم به همراه عمق زیاد در انتهای لوله است که شرایط رشد برای باکتری‌های هوازی و بی‌هوازی را فراهم می‌کند.
- تلقیح باکتری در این محیط به این صورت است که ابتدا به صورت عمقی و سپس سطح آن را به صورت خطی مارپیچ کشت می‌دهند. زمان گرمخانه‌گذاری به منظور تخمیر کربوهیدرات، ۱۸ تا ۲۴ ساعت و برای واکنش‌های سولفید هیدروژن بیشتر از ۴۸ ساعت می‌باشدAgar .



نتیجه	تفسیر	علامت
سطح زرد/ عمق زرد -- KIA	تخمیر گلوکز و لاکتوز به همراه تجمع اسید در سطح شیب‌دار و عمق	A/A
سطح زرد/ عمق زرد -- TSIA	تخمیر گلوکز و لاکتوز و/ یا ساکاروز به همراه تجمع اسید در سطح شیب‌دار و عمق	A/A
سطح قرمز/ عمق زرد	تخمیر گلوکز به همراه تولید اسید. پروتئین‌ها در شرایط هوازی (در سطح شیب‌دار) با تولید محصولات قلیایی (reversion) تجزیه می‌شوند.	K/A
سطح قرمز/ عمق قرمز	هیچ تخمیری صورت نگرفته است. پپتون در شرایط هوازی و بی‌هوازی با تولید محصولات قلیایی تجزیه می‌شوند. باکتری مورد نظر از خانواده انتروباکتریاسه نیست.	K/K
سطح قرمز/ عمق بدون تغییر	هیچ تخمیری صورت نگرفته است. پپتون در شرایط هوازی با تولید محصولات قلیایی تجزیه می‌شوند. باکتری مورد نظر از خانواده انتروباکتریاسه نیست.	K/NC
سطح شیب‌دار بدون تغییر/ عمق بدون تغییر	باکتری دارای رشد آهسته می‌باشد. از خانواده انتروباکتریاسه نیست.	NC/NC
رسوب سیاه در آگار	احیا سولفور. (در شرایط اسیدی، از تخمیر گلوکز یا لاکتوز، رسوب سیاه در عمق ایجاد می‌شود حتی اگر رنگ زرد به‌واسطه رسوب سیاه نامشخص و مبهم باشد.	H_2S
ایجاد شکاف در آگار یا بلند شدن آگار	تولید گاز	

کار عملی

کشت سطحی و عمقی سودوموناس و اشرشیا

۴- محیط کشت MAC

- مک کانکی آگار یک محیط انتخابی و افتراقی برای تشخیص ارگانیسم‌های کلی‌فرم و پاتوژن‌های روده‌ای است.
- از این محیط با توجه به قابلیت تخمیر **لاکتوز** برای جداسازی و افتراق اعضای خانواده انتروباکتریاسه استفاده می‌شود.
- این محیط انواع مختلفی دارد : مک کانکی آگار بدون کریستال ویوله (CS) که کوکسی‌های گرم مثبت در آن رشد می‌کنند و مک کانکی آگار دارای CS برای کنترل باکتری‌های سوارمینگ (پروتئوس) که در دیگر نتایج تداخل ایجاد می‌کنند.
- **املاح صفراوی** و **کریستال ویوله** مانع از رشد باکتری‌های گرم مثبت به‌ویژه انتروکوک‌ها و استافیلوکوک‌ها می‌شوند.
- **نوترال رد** به عنوان معرف pHدر محیط قلیایی (بالای ۸/۶) بی‌رنگ و در محیط اسیدی (زیر ۸/۶) قرمزرنگ است که از این ویژگی جهت نشان دادن خصوصیات افتراقی استفاده می‌شود.

TABLE **4-5** MacConkey Agar Results and Interpretations

TABLE OF RESULTS		
Result	**Interpretation**	**Presumptive ID**
Poor growth or no growth (P)	Organism is inhibited by crystal violet and/or bile	Gram-positive
Good growth (G)	Organism is not inhibited by crystal violet or bile	Gram-negative
Pink to red growth with or without bile precipitate (R)	Organism produces acid from lactose fermentation	Probable coliform
Growth is "colorless" (not red or pink) (C)	Organism does not ferment lactose. No reaction	Noncoliform

4-9 MacConkey Agar ✦ This MacConkey Agar was inoculated with four members of *Enterobacteriaceae*, all of which show abundant growth. The top organism and the one on the right are lactose fermenters, as evidenced by the pink color. Note the bile precipitate around the top organism. The organisms on the bottom and on the left produced no color, s they do not appear to be lactose fermenters.

کار عملی

کشت خطی متراکم سودوموناس و اشرشیا در پلیت ۱

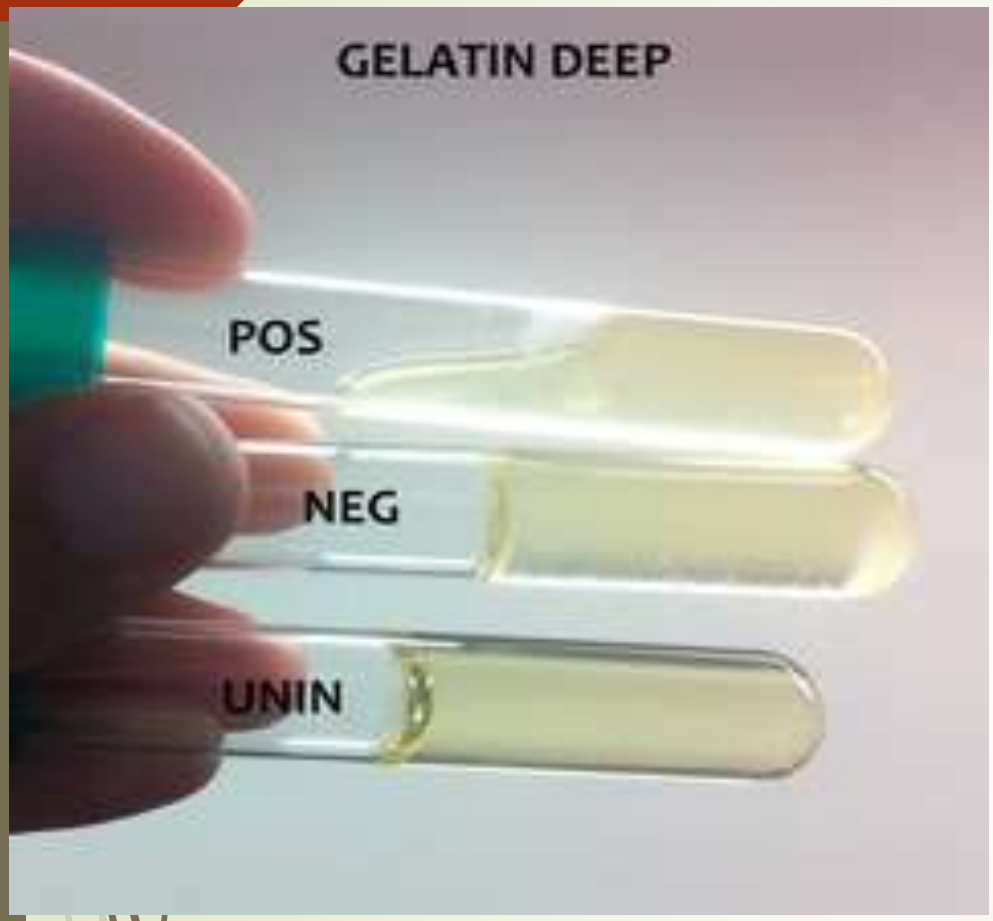
۵- هیدرولیز ژلاتین

- استافیلوکوکوس اورئوس که ژلاتیناز مثبت است می‌تواند از استافیلوکوکوس اپیدرمیس متمایز شود. گونه‌های سراشیا و پروتئوس اعضای مثبت انتروباکتریاسه هستند درحالی‌که اکثر اعضای این خانواده، ژلاتیناز منفی می‌باشند. باسیلوس آنتراسیس، باسیلوس سرئوس و دیگر اعضای این جنس و همچنین کلستریدیوم تتانی و کلستریدیوم پرفرنژنس، ژلاتیناز مثبت هستند.

- هنگامی که یک محیط ژلاتین غذایی توسط یک باکتری ژلاتیناز مثبت به صورت عمقی تلقیح شود، ژلاتیناز ترشح شده موجب مایع شدن محیط می‌شود.

- معمولاً یک دوره ۷ روزه گرمخانه‌گذاری برای مشاهده مایع شدن محیط کفایت می‌کند. با این حال فعالیت ژلاتینازی در برخی از باکتری‌ها به کندی صورت می‌پذیرد. تمام لوله‌هایی که پس از ۷ روز همچنان منفی هستند، بایستی مجدداً برای ۷ روز دیگر گرمخانه‌گذاری شوند.

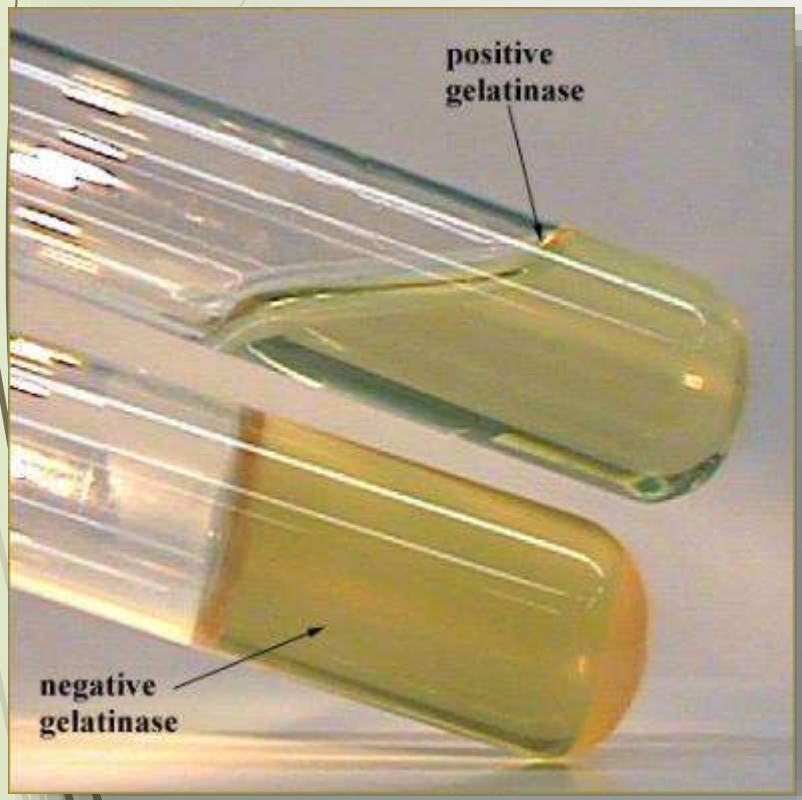
Gelatin liquefaction test



- یکی از اشکالات جزئی محیط ژلاتین غذایی، ذوب شدن آن در دمای ºC 28است؛ بنابراین همراه با لوله‌های تست بایستی نمونه کنترل نیز در دمای ºC 25گرمخانه‌گذاری شود تا تأیید شود که مایع شدن محیط به دلیل گرما نبوده است.

Gelatin liquefaction test

Nutrient Gelatin



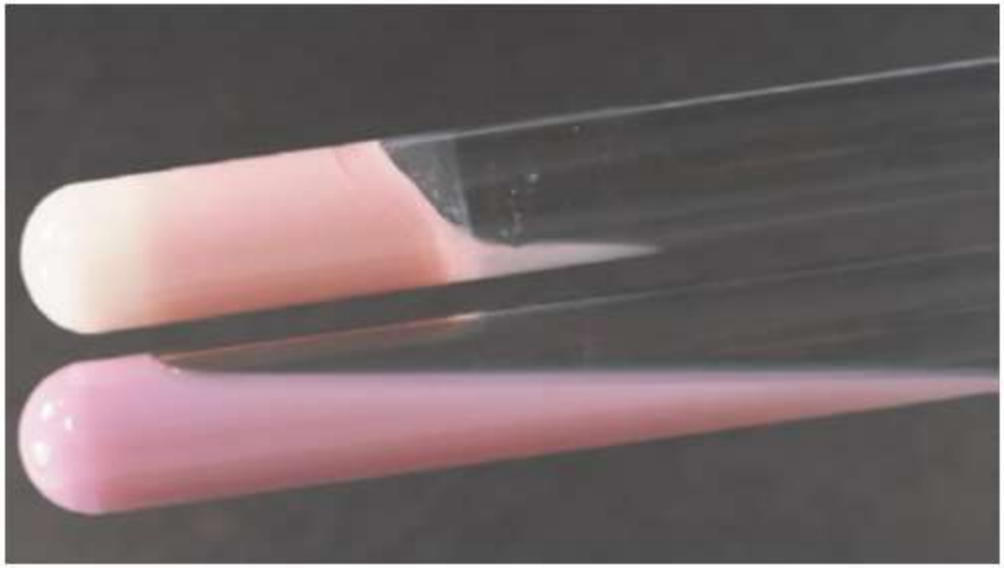
- کشت سودوموناس و اشرشیا با انس

۶– لیتموس میلک

- محیط لیتموس میلک در ابتدا به منظور افتراق اعضای جنس کلستریدوم بکار گرفته می¬شد. این محیط بر اساس توانایی باکتری‌های روده‌ای در احیا لیتموس، خانواده‌ی انتروباکتریاسه را از سایر باسیل‌های گرم منفی متمایز می‌کند. این محیط همچنین به منظور کشت و نگه داری باکتری‌های لاکتیک اسید کاربرد دارد.
- چهار واکنش پایه در محیط لیتموس میلک رخ می‌دهد: تخمیر لاکتوز، احیا لیتموس، انعقاد کازئین و هیدرولیز کازئین. ترکیب این واکنش‌ها با هم تنوعی از نتایج را نشان می‌دهد که هر کدام از آن‌ها به منظور افتراق باکتری‌ها از هم مورد استفاده قرار می‌گیرند.

شکل) **واکنش‌ها در محیط لیتموس میلک**. از چپ به راست: هضم، واکنش قلیایی (DK)؛ تشکیل لخته‌ی اسید، احیا لیتموس (ACR)؛ تشکیل لخته‌ی اسید، احیاء لیتموس، تولید گاز به‌واسطه تخمیر (ACRG- توجه به شکاف کوچک گاز در لخته داشته باشید)؛ تشکیل دلمه، احیا لیتموس (CR)؛ لوله‌ی کنترل بدون تلقیح؛ واکنش اسیدی (A)؛ و واکنش قلیایی (K).

شکل) **تولید گاز به واسطه تخمیر.** این باکتری شکاف گازی را در لخته ایجاد کرده است.



شکل) **لخته اسیدی**. لخته اسیدی در بالای لوله ظاهر می‌شود؛ کنترل بدون تلقیح در پایین قرار گرفته است. توجه داشته باشید که لیتموس احیاء شده (به رنگ سفید) در انتهای لخته می‌باشد.

نتیجه	تفسیر	علامت
رنگ صورتی	واکنش اسیدی	A
رنگ صورتی و جامد (اگر لیتموس احیا شود، رنگ سفید در بخش پایین‌تر مشاهده خواهد شد)؛ لخته بدون حرکت	لخته‌ی اسید	AC
شکاف در لخته	گاز	G
لخته شکسته و از هم جدا شده	تخمیر طوفانی	S
رنگ سفید (بخش پایین‌تر محیط)	احیا لیتموس	R
محیط نیمه جامد که صورتی نیست؛ مایع شفاف تا خاکستری در بالا	دلمه	C
وضوح محیط؛ از دست دادن بدنه	هضم	D
محیط آبی یا نوار آبی در بالا	واکنش قلیایی	K
بدون تغییر	هیچ‌کدام از واکنش‌های فوق	NC

تذکر: این نتایج ممکن است با یکدیگر در انواع ترکیبات ظاهر شوند.

کار عملی

- ۱) سه لوله حاوی محیط لیتموس میلک تهیه کنید. دو لوله را با نام باکتری‌ها، نام خودتان و تاریخ روز آزمایش نام‌گذاری کرده و یک لوله هم به عنوان کنترل نام‌گذاری کنید.
- ۲) دو لوله را با باکتری‌های *Klebsiella pneumoniae* و **سودوموناس** تلقیح کنید. در لوله‌ی کنترل هیچ تلقیحی انجام نشود.
- ۳) تمام لوله‌ها در شرایط هوازی، در دمای $35 \pm 2\ ^{\circ}C$ به مدت ۷ – ۱۴ روز گرمخانه گذاری شوند.
- آزمایشگاه دوم:
- ۱) لوله‌ها را از نظر تغییر رنگ، تولید گاز و تشکیل لخته بررسی کنید. مطمئن باشید که تمام لوله‌ها را با کنترل مقایسه کرده‌اید و برای تفسیر نتایج خود به جدول زیر مراجعه کنید.
- ۲) نتایج خود را در جدول آماده شده در دفتر نتایج ثبت کنید.
- نکته: •هنگام آمادهسازی محیط لیتموس میلک، pH نهایی ۶/۸ ± ۰/۲ ضروری است تا تغییرات pH حاصل از متابولیسم باکتریایی از طریق تغییر رنگ لیتموس قابل تشخیص باشد. محیط کشت تلقیح شده بایستی به رنگ بنفش کم رنگ یا آبی–ارغوانی باشد..

۷- کشت در سودوموناس آگار

- کشت خطی در محیط سودوموناس آگار.

8-OF (Oxidative Fermentative)

- مراحل:

۱) در دو لوله ی آزمایش حاوی محیط کشت OF base باکتری را کشت میدهیم سپس روی یکی از محیط ها پارافین اضافه میکنیم تا محیط بی هوازی شود.

آزمایش ۱۳: با یک نیدل استریل مقداری از باکتری مورد نظر برداشته، در دو لوله حاوی محیط جامد O/Fbase کشت می‌دهیم روی یکی از دو لوله مقداری پارافین مایع می‌ریزیم تا شرایط بی هوازی شود. این محیط حاوی قندهای Glu ، Lac و sac است. همچنین هوازی یا بی هوازی بودن باکتری و تولید گاز یا عدم تولید گاز توسط آن بررسی می‌گردد.

اگر در هر دو رشد کرد، بی‌هوازی اختیاری است.

اگر در محیط هوازی رشد کرد، هوازی است. اگر فقط در محیط بی‌هوازی رشد کرد هوازی محیط است

منبع:

- **مهارت های آزمایشگاه میکروب شناسی** ، جلد ۱ –۳ ،

نگارش:

- دکتر علی محمدی–عضو هیئت علمی دانشگاه الزهرا (س)
- دکتر حمیده میرشفیعی – دانشگاه شهید بهشتی

fppt.com