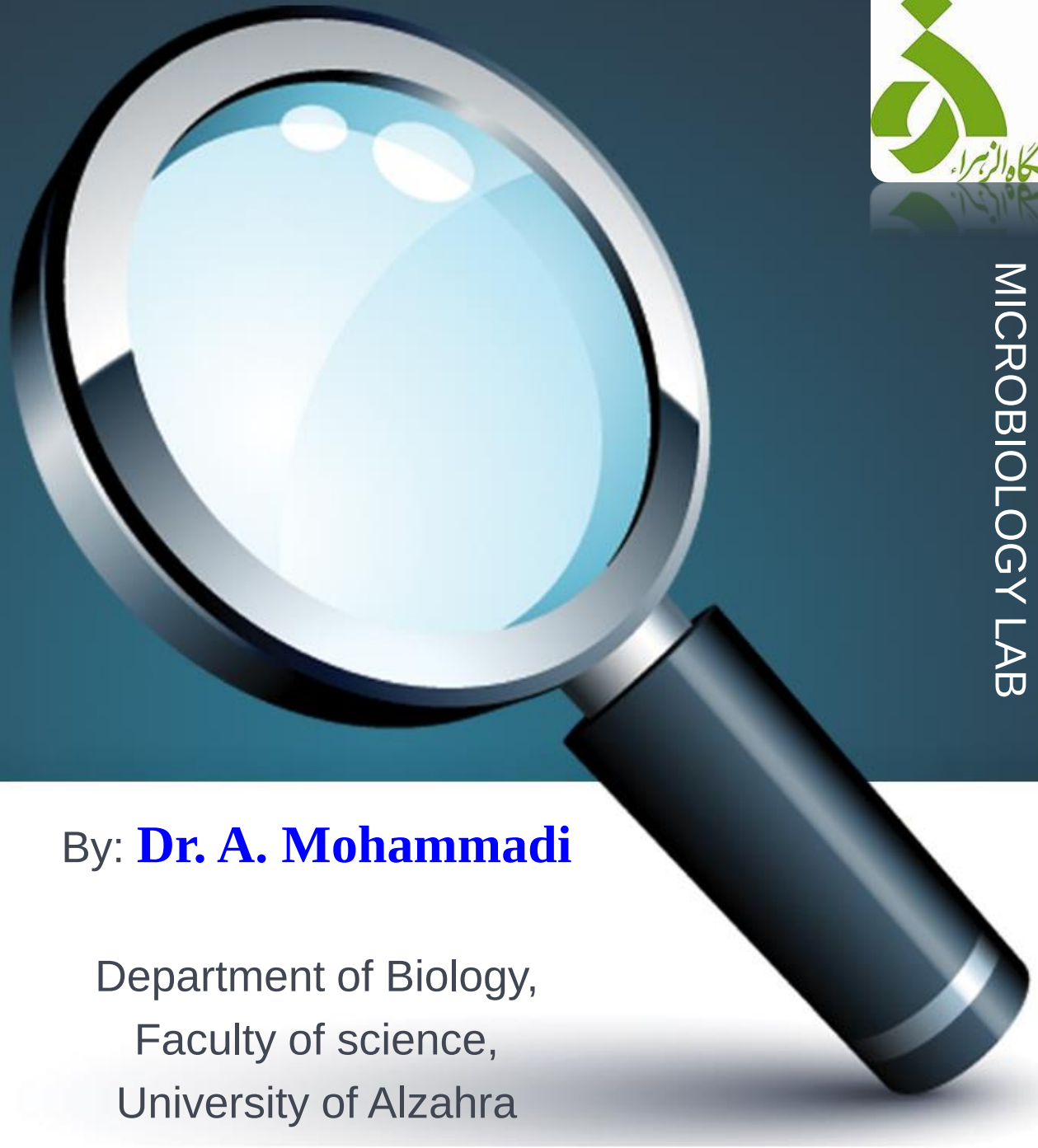
به نام خدا

Respiration Tests

MICROBIOLOGY LAB



By: **Dr. A. Mohammadi**

Department of Biology,
Faculty of science,
University of Alzahra

تست‌های تنفس

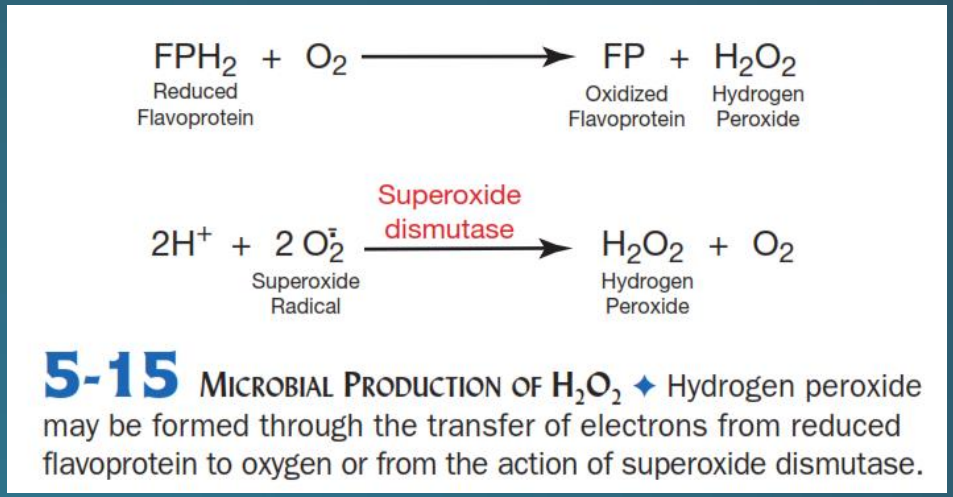
در این قسمت با تست‌هایی آشنا می‌شوید که برای افتراق باکتری‌ها با توجه به قابلیت تنفس شان طراحی شده است. همان‌طور که قبلاً ذکر شد، تنفس تبدیل گلوکز به انرژی ATP از طریق گلیکولیز، چرخه کربس و فسفریلاسیون اکسیداتیو در زنجیره انتقال الکترون (ETC) است. در تنفس، همواره پذیرنده نهایی الکترون در پایان ETC یک مولکول معدنی است.

تست‌هایی که تعیین کننده هوازی یا بی‌هوازی بودن یک باکتری هستند عموماً بر اساس شناسایی محصولات خاص حاصل از احیاء پذیرنده نهایی الکترون طراحی شده‌اند. تنفس کنندگان هوازی قادرند اکسیژن را به آب یا دیگر ترکیبات احیاء کنند. تنفس کنندگان بی‌هوازی دیگر مولکول‌های معدنی همچون نیترات یا سولفات را احیاء می‌کنند. نیترات به گاز نیتروژن (N_2) یا دیگر ترکیبات نیتروژنی همچون نیتریت (NO_2) احیاء می‌شود. به همین منوال، سولفات به گاز سولفید هیدروژن (H_2S) احیاء می‌شود.

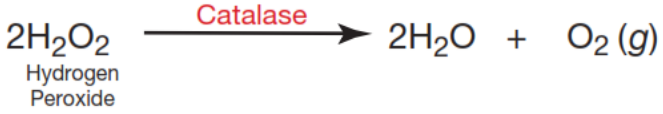
تمرین‌ها و باکتری‌های انتخاب‌شده برای این قسمت می‌توانند مستقیماً یا به صورت غیرمستقیم حضور ETC را اثبات کنند. تست کاتالاز مشخص‌کننده باکتری‌هایی است که قادرند آنزیم کاتالاز تولید کنند؛ آنزیمی که با تبدیل پراکسید هیدروژن حاصل از ETC به آب و اکسیژن مولکولی می‌توانند سلول را سم‌زدایی کنند. تست اکسیداز حضور آنزیم سیتوکروم C اکسیداز در ETC را مشخص می‌کند. تست احیاء نیترات نیز باکتری‌هایی را مشخص می‌کند که قادرند در انتهای ETC با انتقال الکترون به نیترات موجب تنفس بی‌هوازی باکتری شوند. بهتر است با این تست‌ها بیشتر آشنا شوید.

1-Catalase test

- این تست به شناسایی موجوداتی که قادرند آنزیم کاتالاز تولید کنند، کمک می‌کند. معمولاً از این تست برای افتراق اعضای کاتالاز مثبت خانواده میکروکوکاسه از اعضای کاتالاز منفی خانواده استرپتوکوکاسه استفاده می‌شود. ضمن اینکه مشتقاتی از این تست نیز برای شناسایی گونه‌های مایکوباکتریوم بکار می‌رود.

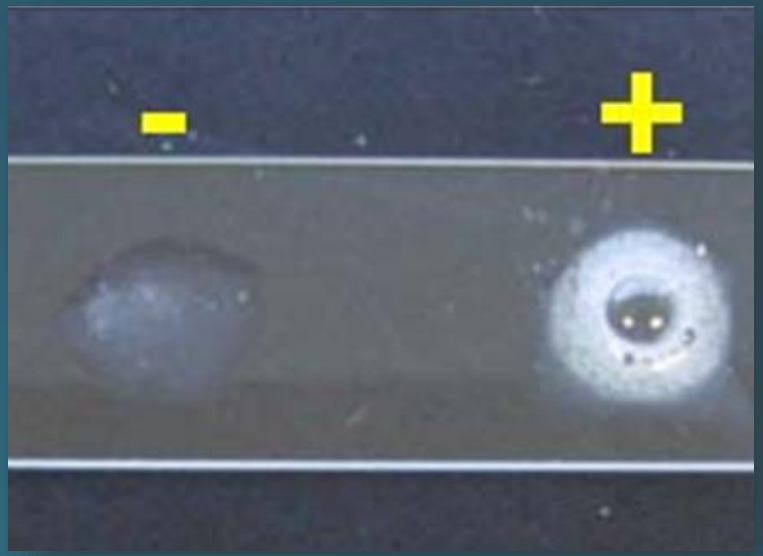


5-15 MICROBIAL PRODUCTION OF H_2O_2 ✦ Hydrogen peroxide may be formed through the transfer of electrons from reduced flavoprotein to oxygen or from the action of superoxide dismutase.



5-16 CATALASE MEDIATED CONVERSION OF H_2O_2 ✦ Catalase is an enzyme of aerobes, microaerophiles, and facultative anaerobes that converts hydrogen peroxide to water and oxygen gas.

Catalase test



برای تشخیص اینکه یک باکتری خاص می‌تواند آنزیم کاتالاز را بسازد یا نه، مقدار کمی از باکتری را با یک قطره محلول ۳ درصد پراکسید هیدروژن مخلوط می‌کنیم. در صورت مشاهده‌ی حباب‌های کوچک گاز اکسیژن، نتیجه‌ی تست مثبت است

2- Oxidase test

- 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 مثبت‌اند) مفید است.
- ضمن اینکه در شناسایی ارگانیسم‌هایی که فاقد آنزیم سیتوکروم اکسیدازند یا بی‌هوازی اجباری‌ها کاربرد دارد.

2- Oxidase test

- 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.

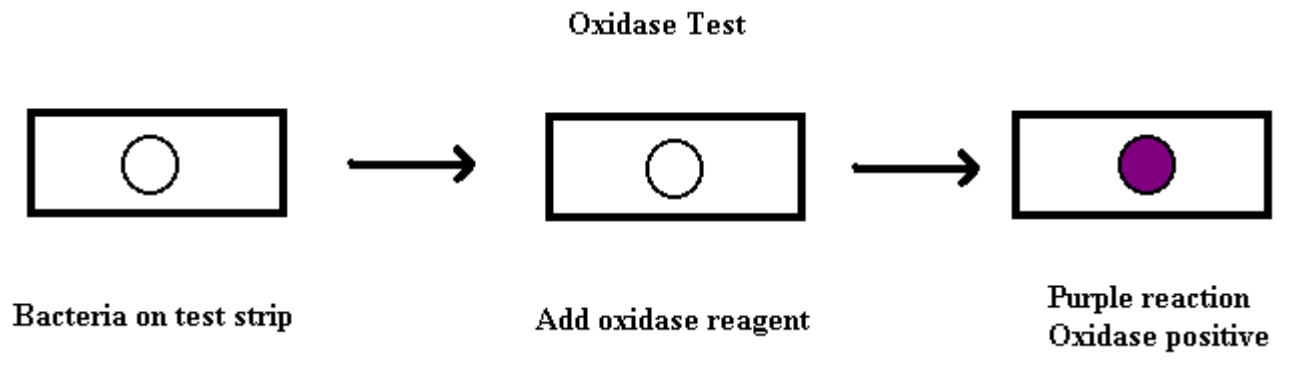
- اگر عامل احیاءکننده اکسید شود، در کسری از ثانیه می‌توان تغییر رنگ را مشاهده کرد که نشان‌دهنده حضور آنزیم سیتوکروم اکسیداز C است؛ اما عدم تغییر رنگ در زمان مشخص شده، نشان دهنده منفی بودن تست و نبود این آنزیم می‌باشد.

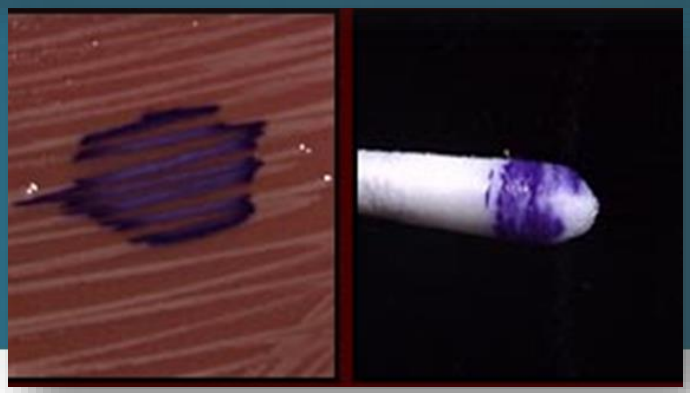
- بعضی از میکروارگانیسم‌ها اکسیداز متغیر و یا اکسیداز مثبت تأخیری می‌باشند.

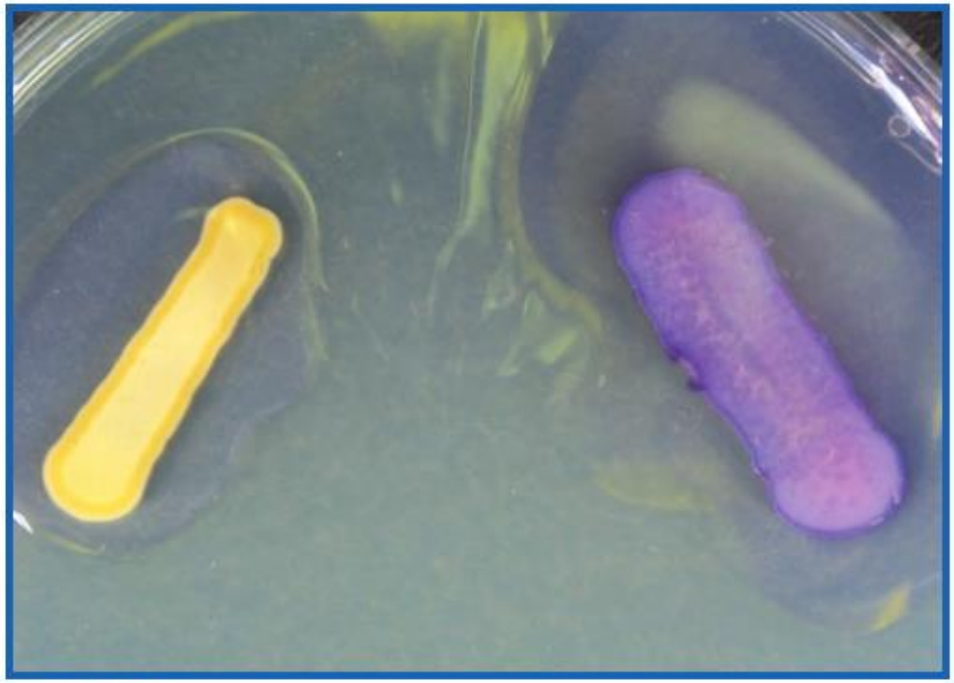
- تنوع در واکنش اکسیداز میکروارگانیسم‌ها به متفاوت بودن ترکیب سیتوکروم C، تنوع در سیتوکروم اکسیداز و تنوع در ترکیب زنجیره انتقالی مرتبط است.

Oxidase test

روش‌های مختلفی برای انجام تست اکسیداز وجود دارد که برخی از آن‌ها عبارت‌اند از روش کاغذ صافی[1]، روش کاغذ صافی لکه‌ای[2]، روش مستقیم بر روی پلیت و روش لوله آزمایش. دقت داشته باشید که زمان و غلظت‌های مورد استفاده هر یک از روش‌ها کاملاً به دستورالعمل سازنده بستگی دارد.







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.)

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.

Oxidase Test

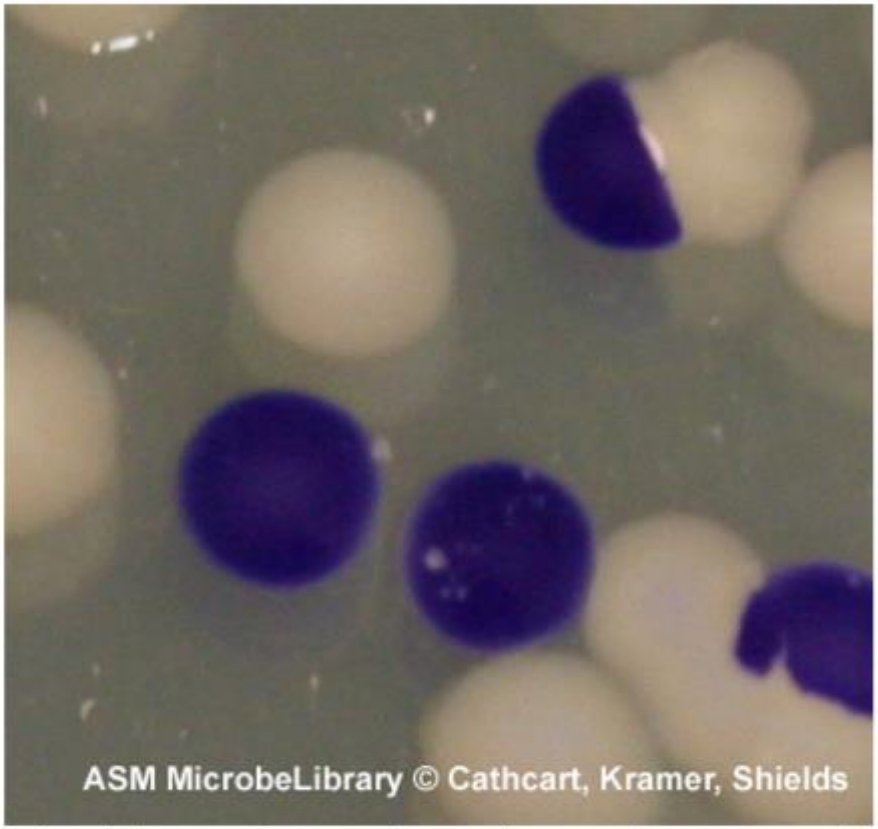
Discriminates organisms that can produce cytochrome oxidase which catalyzes the transfer of electrons from reduced cytochrome c in the electron transport chain to molecular oxygen.

Test uses NNNN-tetramethyl-p-phenylenediamine (Oxidase Reagent) as an artificial electron acceptor: when oxidized it is colorless, when reduced it turns purple

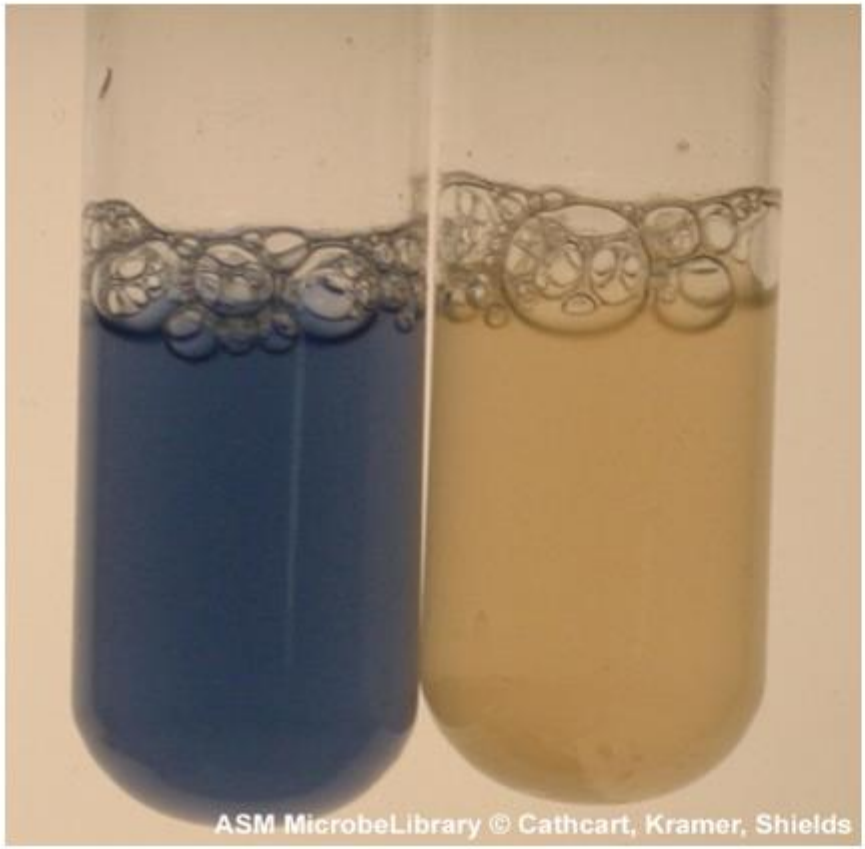
*Look for color change on the bacteria, not on the cotton swab! (The reagent will turn light purple when exposed to oxygen in the air)

Copyright © The McGraw-Hill Companies, Inc. Permission required for reproduction or display.

© The McGraw-Hill Companies/Auburn University Photographic Service



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.

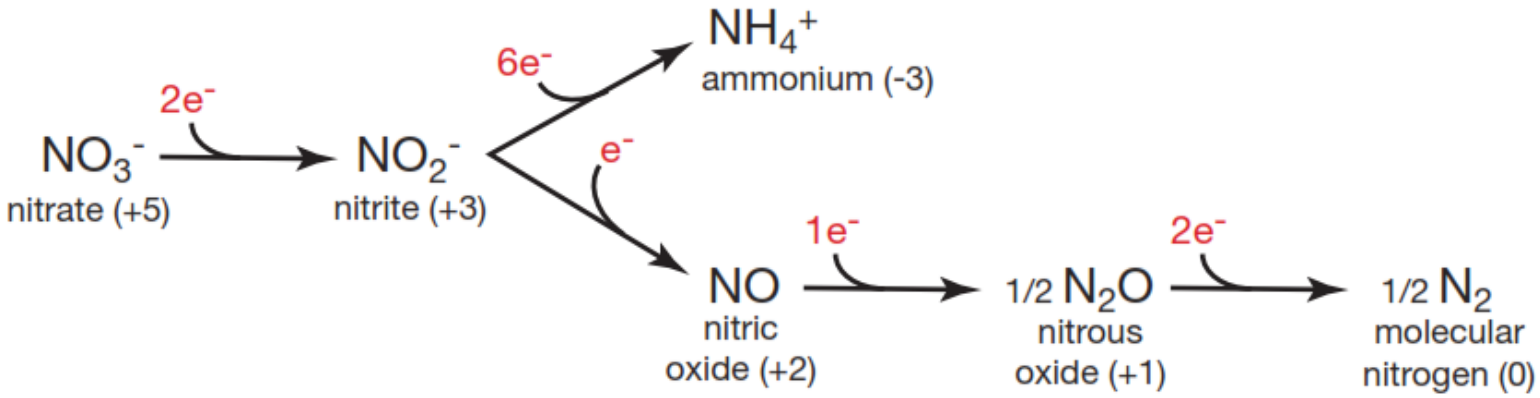


تست اکسیداز در لوله آزمایش؛

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.

3- Nitrate reduction test

- تقریباً تمام اعضای انتروباکتریاسه احیای یک مرحله‌ای نیترات به نیتریت را انجام می‌دهند.
- تست احیای نیترات برای افتراق آن‌ها از باکتری‌های میله‌ای گرم منفی استفاده می‌شود که باکتری‌های اخیر قادر به احیای نیترات نبوده یا اینکه نیترات را به N2یا دیگر ترکیبات احیاء می‌کند.

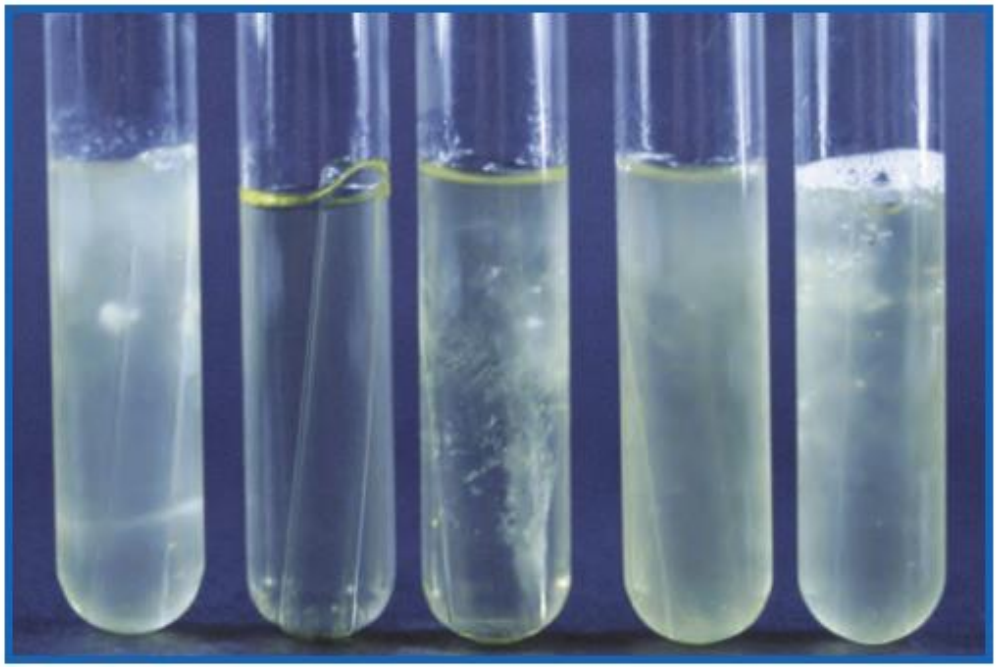


اعضای انتروباکتریاسه به سادگی نیترات را نیتریت احیاء می‌کنند. سایر باکتری‌ها که جزو شوره‌زداها و در چرخه نیتروژن بسیار مهم هستند، NO_3را از طریق واسطه‌هایی به N_2تبدیل می‌کنند. دیگر موجودات نیز به طور مشابهی قادر به احیای نیترات هستند که در آن NO_3به NH_4احیاء می‌شود که می‌تواند در سنتز اسیدآمینه استفاده شود..

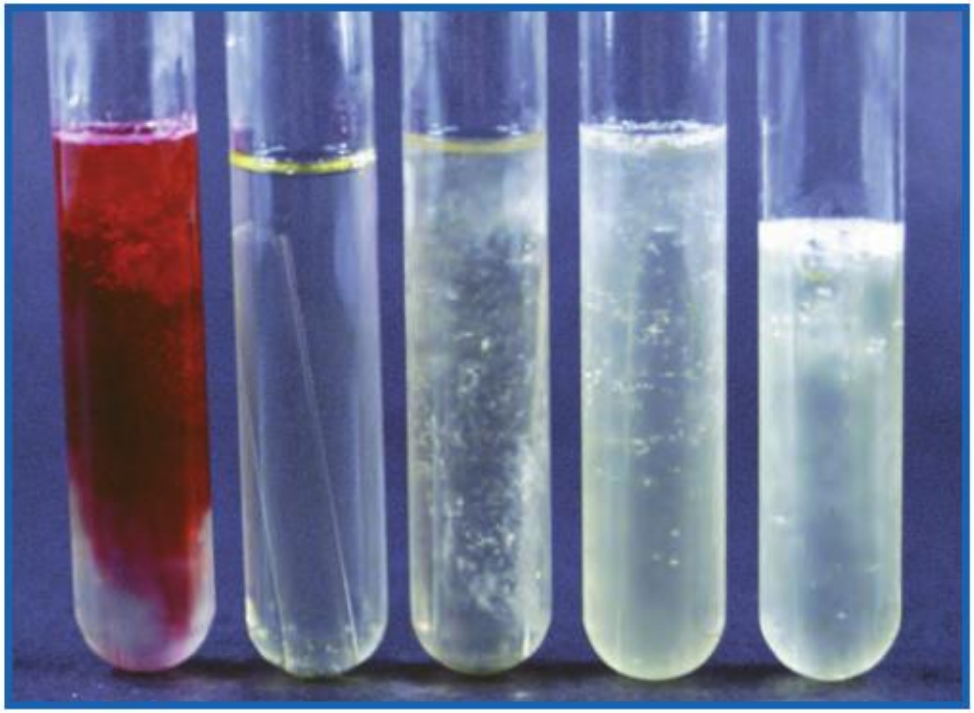
3- Nitrate reduction test

- 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 دِنیتریفیکاسیون**: بررسی چشمی برای حضور گاز در لوله دُرهام انجام می‌شود (شکل). اگر این 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.



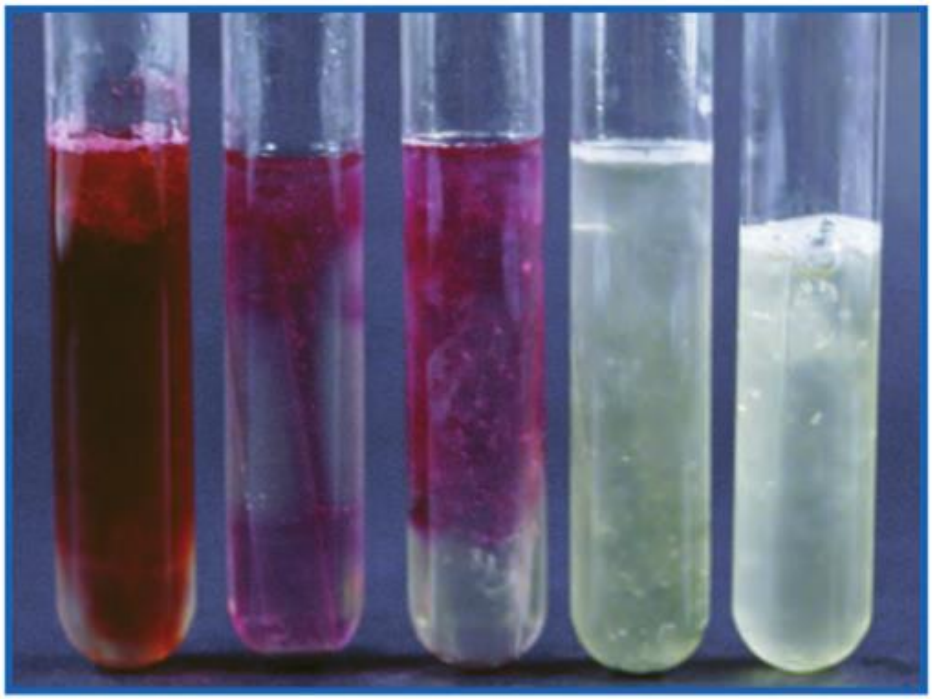
5-25 **Incubated Nitrate Broth Before the Addition of Reagents** ✦ Numbered 1 through 5 from left to right, these are Nitrate Broths immediately after incubation before the addition of reagents. Tube 2 is an uninoculated control used for color comparison. Note the gas produced by tube 5. It is a known 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 دِنیتریفیکاسیون دیده نشود، دو معرف اسید سولفانیلیک (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 KNO_3موجود 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 NH_3، NO، N_2Oو یا دیگر ترکیبات نیتروژنی هیچ نیتراتی در محیط وجود ندارد.

Copyright © The McGraw-Hill Companies, Inc. Permission required for reproduction or display.

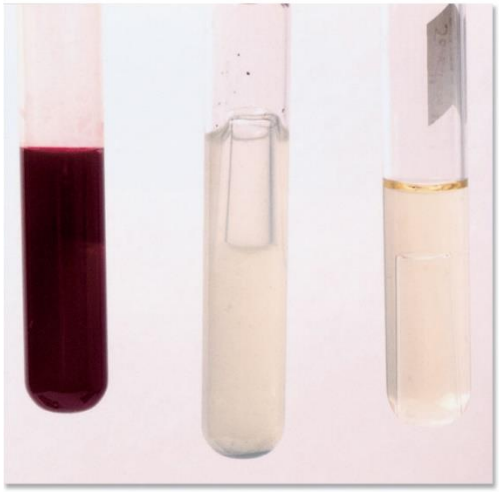
$$NO_3^- + 2e^- + 2H^+ \xrightarrow{\text{nitrate reductase}} NO_2^- + H_2O$$

sulfanilic acid (reagent A) + dimethyl-alpha-naphthylamine (reagent B)

A + B + nitrite = red

Zinc converts nitrate to nitrite

Copyright © The McGraw-Hill Companies, Inc. Permission required for reproduction or display.

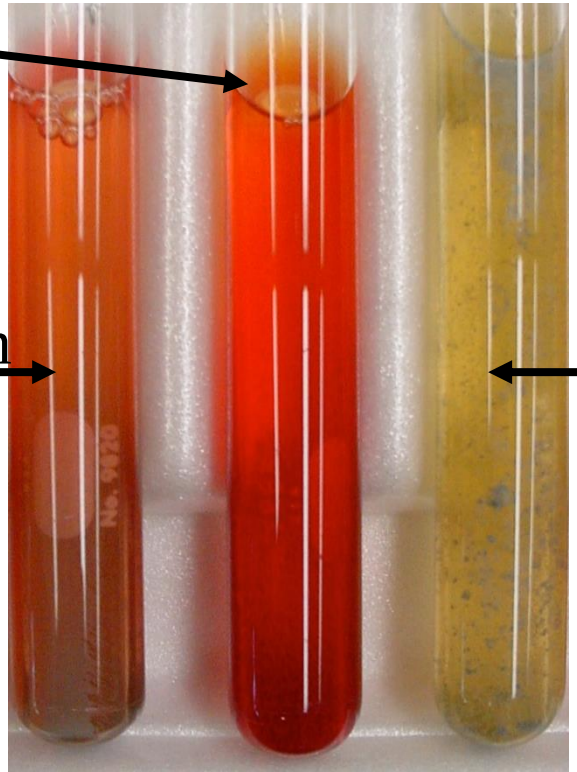


© The McGraw-Hill Companies/Auburn University Photographic Service

add zinc to negative tubes

Nitrate to nitrite

No reduction



Complete reduction

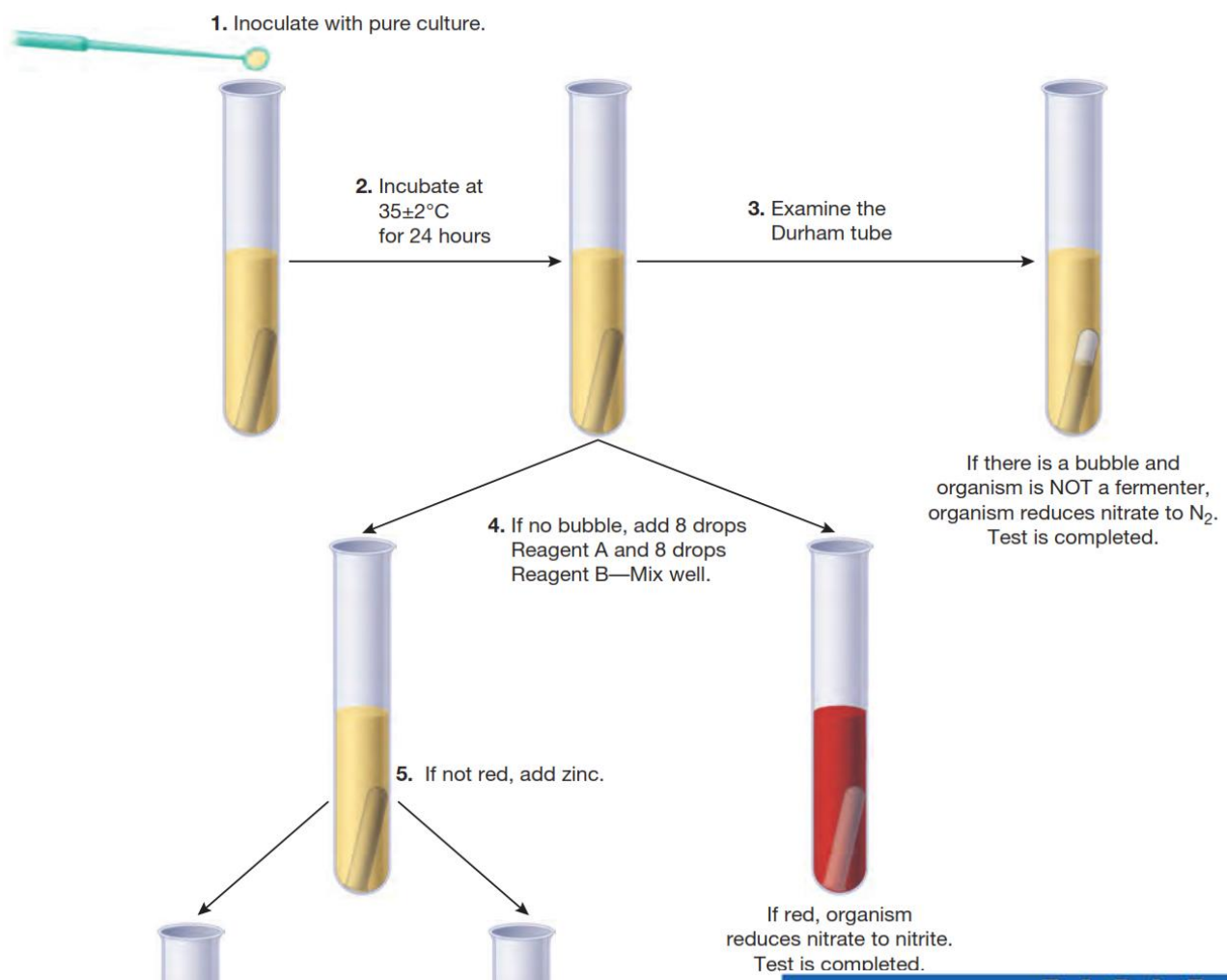


TABLE OF RESULTS

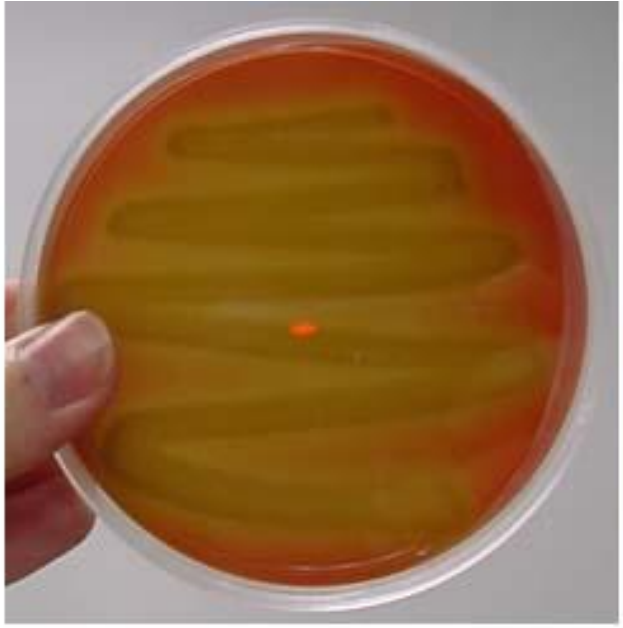
Result	Interpretation	Symbol
Gas (Nonfermenter)	Denitrification—production of nitrogen gas ($NO_3 \rightarrow NO_2 \rightarrow N_2$)	+
Gas (Fermenter, or status is unknown)	Source of gas is unknown; requires addition of reagents	
Red color (after addition of reagents A and B)	Nitrate reduction to nitrite ($NO_3 \rightarrow NO_2$)	+
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	–

۴–محیط آگار خون دار (بلاد آگار)

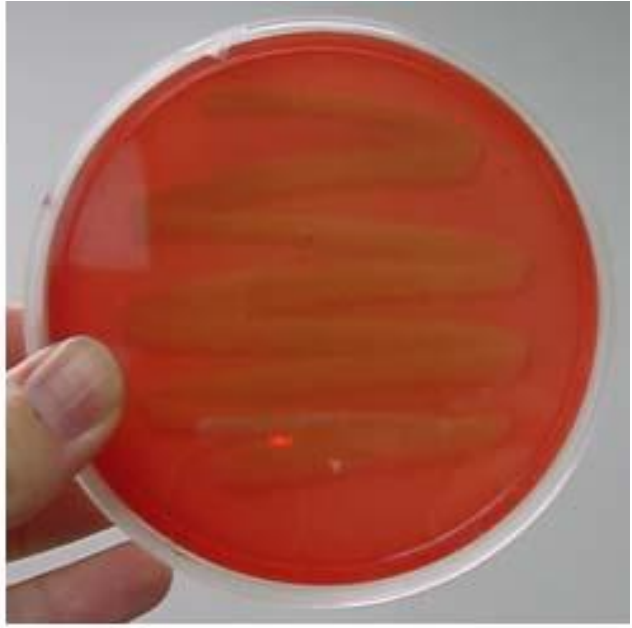
کاربرد: محیط آگار خون‌دار (بلاد آگار) برای جداسازی و کشت بسیاری از انواع باکتری‌های مشکل‌پسند کاربرد دارد. این محیط جهت افتراق و تمایز باکتری‌های دارای ویژگی‌های همولیتیک به ویژه در جنس‌های استرپتوکوکوس، انتروکوکوس و آئروکوکوس[۲] نیز استفاده می‌شود.

چندین گونه از کوکسی‌های گرم مثبت، اگزوتوکسینی به نام همولیزین تولید می‌کنند که قادر به تخریب سلول‌های قرمز خون (RBC[۱]) و هموگلوبین هستند. محیط آگار خون‌دار گاهی اوقات، محیط آگار خون گوسفندی[۲] نیز نامیده می‌شود که دلیل آن استفاده‌ی ۵٪ خون گوسفند در محیط پایه‌ی TSA است که اجازه متمایز کردن باکتری‌های قادر به همولیز RBC ها را می‌دهد.

Beta Hemolysis



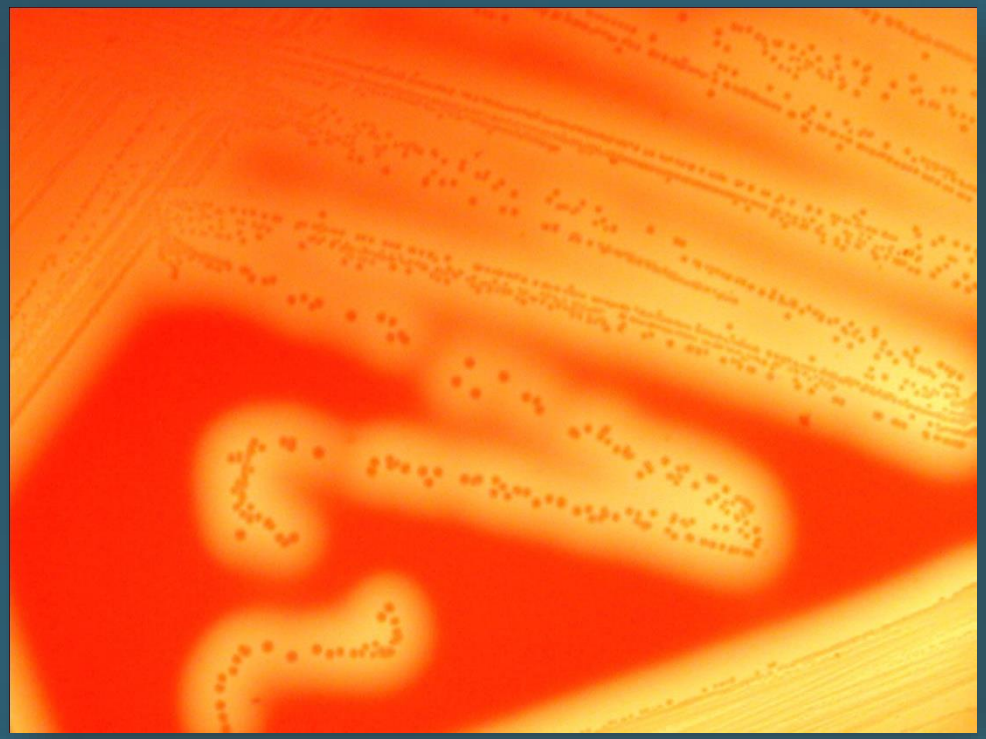
Alpha Hemolysis

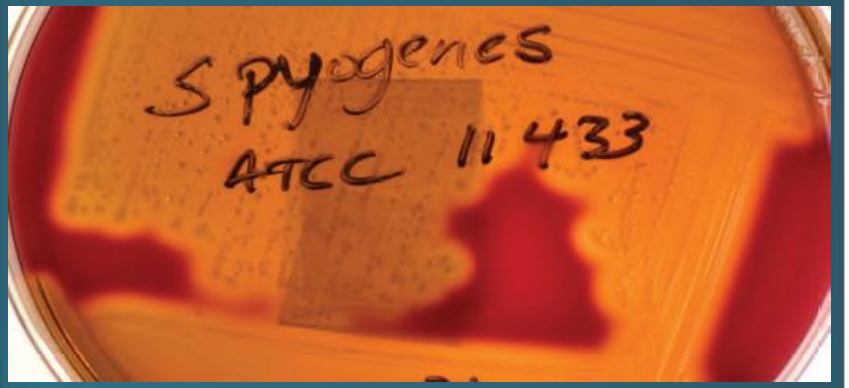


Gamma Hemolysis

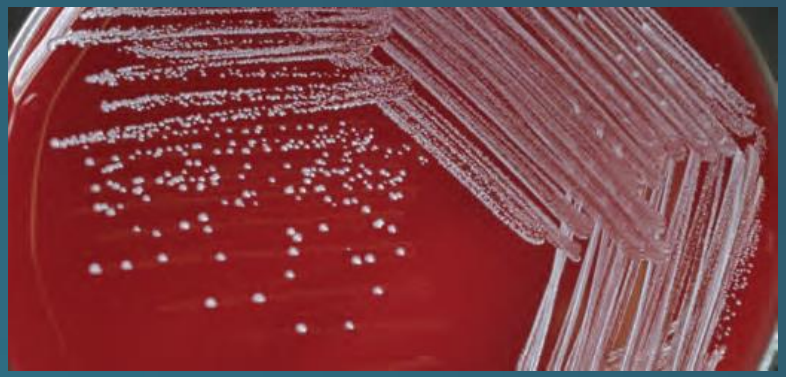
بتاهمولیز که تخریب کامل RBC ها و هموگلوبین می‌باشد، منجر به شفاف شدن محیط اطراف کلنی‌های می‌شود (شکل). آلفاهمولیز به شکل تخریب ناقص RBCها است و تغییر رنگ متمایل به سبز آگار اطراف کلنی‌ها ایجاد می کند (شکل). گاما همولیز در واقع همولیز نیست و به شکل رشد معمولی و ساده باکتری بدون تغییر در محیط ظاهر می‌شود (شکل)

Beta hemolysis refers to a clear, colorless zone surrounding the colony, where a complete lysis of the red blood cells by the hemolysins has occurred.



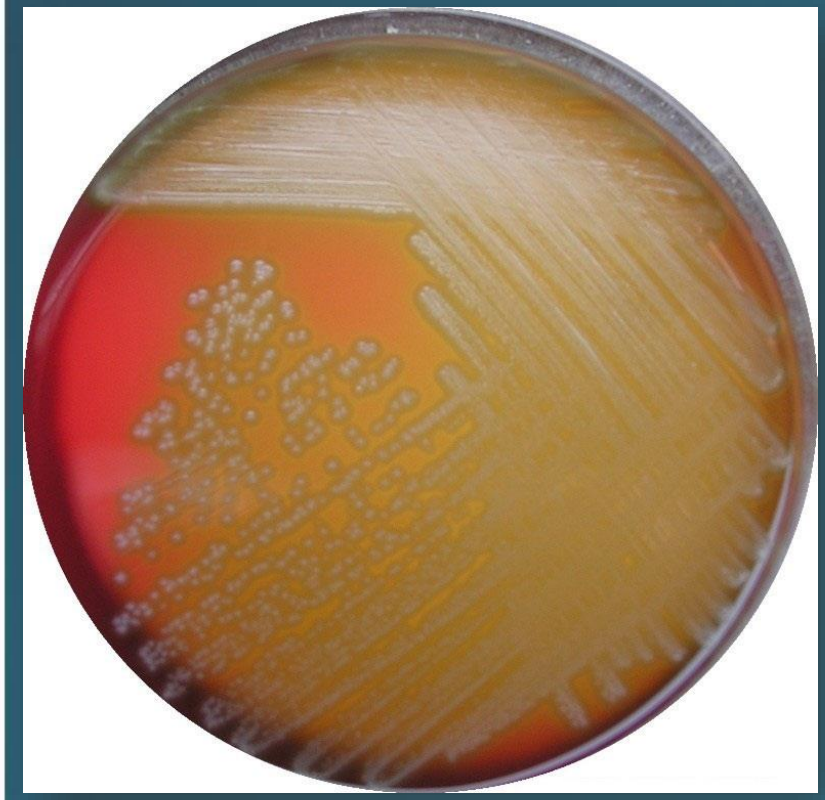


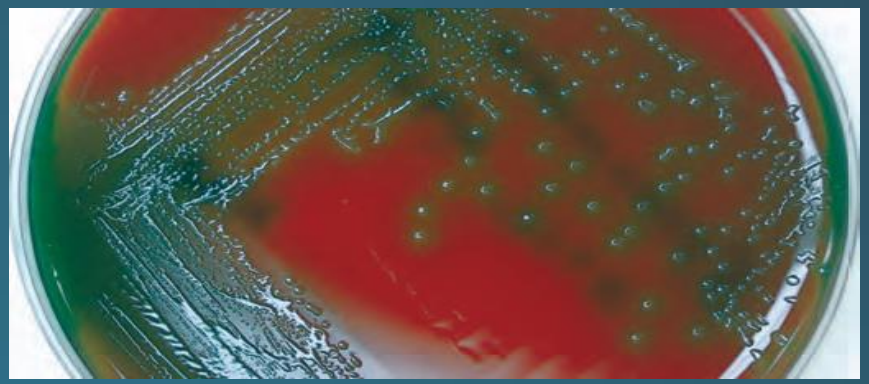
Gamma hemolysis refers to no hemolysis or discoloration of the agar surrounding the colony.



شکل) **۷ همولیز** ✦ پلیت دارای کشت خطی استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس روی محیط آگار خون گوسفندی هیچ همولیزی را نشان نمی‌دهد.

Alpha hemolysis appears as a zone of partial hemolysis surrounding the colony, often accompanied by a **greenish** or **brown** discoloration due to oxidation of hemoglobin to met-hemoglobin by hydrogen peroxide





شکل) **α همولیز**. پلیت کشت خطی استرپتوکوکوس پنومونیه نشان‌دهنده‌ی همولیز آلفا است. ناحیه متمایل به سبز اطراف کلنی‌ها به دلیل لیز ناقص سلول‌های قرمز خونی ایجاد می‌شود.

کار عملی ۱: کاتالاز

مواد و ابزار مورد نیاز

- پراکسید هیدروژن (محلول ۳ درصد) (این ماده باید در شیشه‌های قهوه‌ای یا تیره‌رنگ و در یخچال نگهداری شود)
- چند پی‌پت
- لام‌های میکروسکوپی
- محیط نوترینت آگار شیب‌دار
- کشت‌های تازه از باکتری‌های:

Staphylococcus epidermidis
Enterococcus faecalis (BSL-2)

الف) روش قطره‌ای یا اسلایدی:

۱) مقدار زیادی از کشت باکتری را با یک اپلیکاتور چوبی به سطح لام شیشه‌ای منتقل کنید. توجه داشته باشید که فروبردن لوپ فلزی به پراکسید هیدروژن به دلیل تجزیه‌ی غیراختصاصی H_2O_2 می‌تواند نتیجه مثبت کاذب ایجاد کند. البته گفته می‌شود که این مورد برای لوپ‌های ساخته شده از نیکل-کروم صادق نیست.

۲) در شرایط استریل، یک یا دو قطره H_2O_2 را به کلنی روی لام اضافه کنید و بلافاصله ایجاد حباب روی لام را بررسی نمایید. نتیجه را به صورت مثبت یا منفی گزارش کنید. ایجاد حباب‌های سریع و ماندگار با حالت جوش زدن (کف) نشانگر مثبت بودن تست است. برای بررسی دقیق‌تر یک نمونه ناشناخته بهتر است از یک نمونه کنترل مثبت استفاده کنید.

۳) نتیجه‌ی منفی در صورتی است که هیچ حبابی ظاهر نشود و یا فقط چند حباب پراکنده ایجاد شود. در چنین حالتی (نتیجه منفی) بهتر است لام را با کمک یک میکروسکوپ بررسی کنید.

۴) نتایج به دست آمده را ثبت کنید.

ج) روش لوله‌ای (تیوب):

۱) چهار تا پنج قطره از محلول ۳ درصد پراکسید هیدروژن را به یک لوله‌ی آزمایش کوچک (12 x 75-mm) اضافه کنید.

۲) با استفاده از یک اپلیکاتور چوبی، مقداری کمی از ارگانیسم موجود در کلنی ۱۸ تا ۲۴ ساعته را برداشته و آن را درون لوله آزمایش قرار می‌دهیم.

۳) لوله‌ها را در مقابل زمینه‌ی تاریک قرار داده و تشکیل حباب در انتهای اپلیکاتور چوبی را مورد بررسی قرار می‌دهیم.

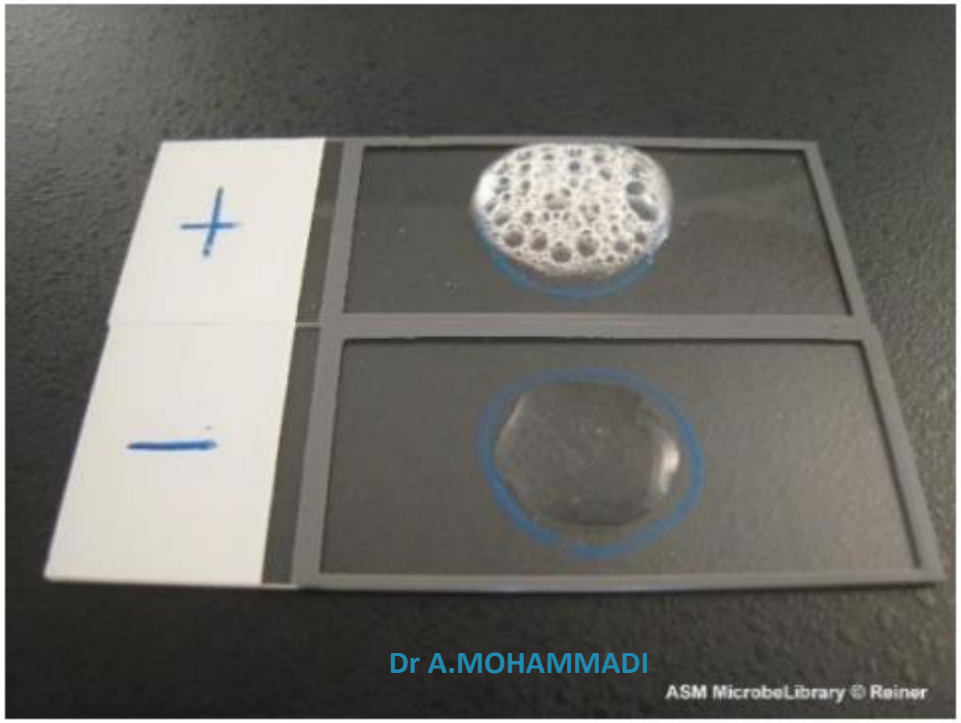
۴) نتیجه‌ی مثبت هنگامی است که حباب به صورت سریع ایجاد می‌شود. نتیجه‌ی منفی هم زمانی است که هیچ حبابی تشکیل نگردد (عدم وجود آنزیم کاتالاز).

۵) نتایج به دست آمده را ثبت کنید.

کار عملی ۱: تفسیر نتایج

نتایج آزمون کاتالاز و تفسیر آن

نتایج	تفسیر	شناسایی
وجود حباب	حضور کاتالاز	+
نبود حباب	عدم حضور کاتالاز	-



کار عملی ۲: اکسیداز

مواد و ابزار مورد نیاز:

- یکی از موارد:

۱) معرف کواکس: محلول ۱ درصد تترا متیل پارا فنیلن دی آمین دی هیدروکلرید در آب.

۲) معرف گوردون و مک لئود: محلول ۱ درصد دی متیل پارا فنیلن دی آمین دی هیدروکلرید در آب.

۳) تست اکسیداز گبای و هادلی: محلول ۱ درصد آلفا نفتول در ۹۵ درصد اتانول و ۱ درصد اکسالات پارا آمینو دی متیل آنیلین.

توجه: هر سه مورد به علت ناپایدار بودن بایستی در بطری‌های تیره و در یخچال و در کمتر از ۱ هفته نگهداری شود. البته معرف‌های اکسیداز در فرم تجاری، همچنین به صورت آمپول آماده، قطره‌چکان، دیسک‌های آغشته، نوارهای تست و یا کاغذهای اشباع شده از محلول قابل تهیه می‌باشند.

- اپلیکاتور چوبی یا لوپ پلاستیکی یا پلاتینیوم
- کاغذ صافی
- کشت‌های تازه (۲۴-۱۸ ساعته) از باکتری‌های:

Escherichia coli

Pseudomonas aeruginosa *Moraxella catarrhalis (BSL-2)*

الف) روش کاغذ صافی

۱) یک قطعه کوچک از کاغذ صافی را در محلول ۱٪ معرف کواکس[۳] غوطه‌ور کرده و اجازه دهید خشک شود.

۲) یک کلنی از کشت تازه (۱۸- تا ۲۴ ساعته) باکتری مورد نظر را با کمک لوپ برداشته و بر روی کاغذ صافی آغشته به معرف بمالید.

۳) تغییرات رنگ را بررسی کنید.

ب) روش کاغذ صافی لکه‌ای

۱) یک کلنی از کشت تازه (۱۸- تا ۲۴ ساعته) باکتری مورد نظر را با کمک لوپ به تکه‌ی کوچکی از کاغذ صافی منتقل کنید.

۲) ۱ یا ۲ قطره از ۱٪ معرف کواکس را بر روی کلنی منتقل شده قرار دهید.

۳) تغییرات رنگ را بررسی کنید.

کار عملی ۲: تفسیر نتایج

۴) میکروارگانیسم‌هایی اکسیداز مثبت هستند که در عرض ۵ تا ۱۰ ثانیه رنگ ارغوانی تیره (آبی-بنفش) ایجاد می‌شود (زمان بسیار مهم است). میکروارگانیسم‌های اکسیداز منفی در عرض ۱۰ ثانیه هیچ‌گونه تغییر رنگی را نشان نداده یا اینکه تغییر رنگ را پس از گذشت بیش از ۲ دقیقه نشان می‌دهند. میکروارگانیسم‌های اکسیداز مثبت تأخیری این تغییر رنگ به بنفش را در مدت ۶۰ تا ۹۰ ثانیه نشان می‌دهند در چنین مواردی بایستی تست‌های بیشتری انجام شود زیرا احتمالاً متعلق به خانواده انتروباکتریاسه نمی‌باشند.

کار عملی ۳: نیترات

مواد و ابزار مورد نیاز:

- چهار نیترات براث
- معرف‌های A و B تست نیترات
- پودر روی
- محیط کشت براث تازه از باکتری‌های:

Erwinia amylovora
(جایگزین: *Enterococcus faecalis*)

Escherichia coli
Pseudomonas aeruginosa (BSL-2)

مراحل انجام کار:

جلسه نخست:

۱) چهار 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.

۲) سه لوله براث را با باکتری‌های مورد آزمون تلقیح کنید. لوله کنترل را تلقیح نکنید.

۳) تمام لوله‌ها را در دمای $35 \pm 2\ ^{\circ}C$، به مدت ۲۴ الی ۴۸ ساعت گرمخانه‌گذاری کنید.

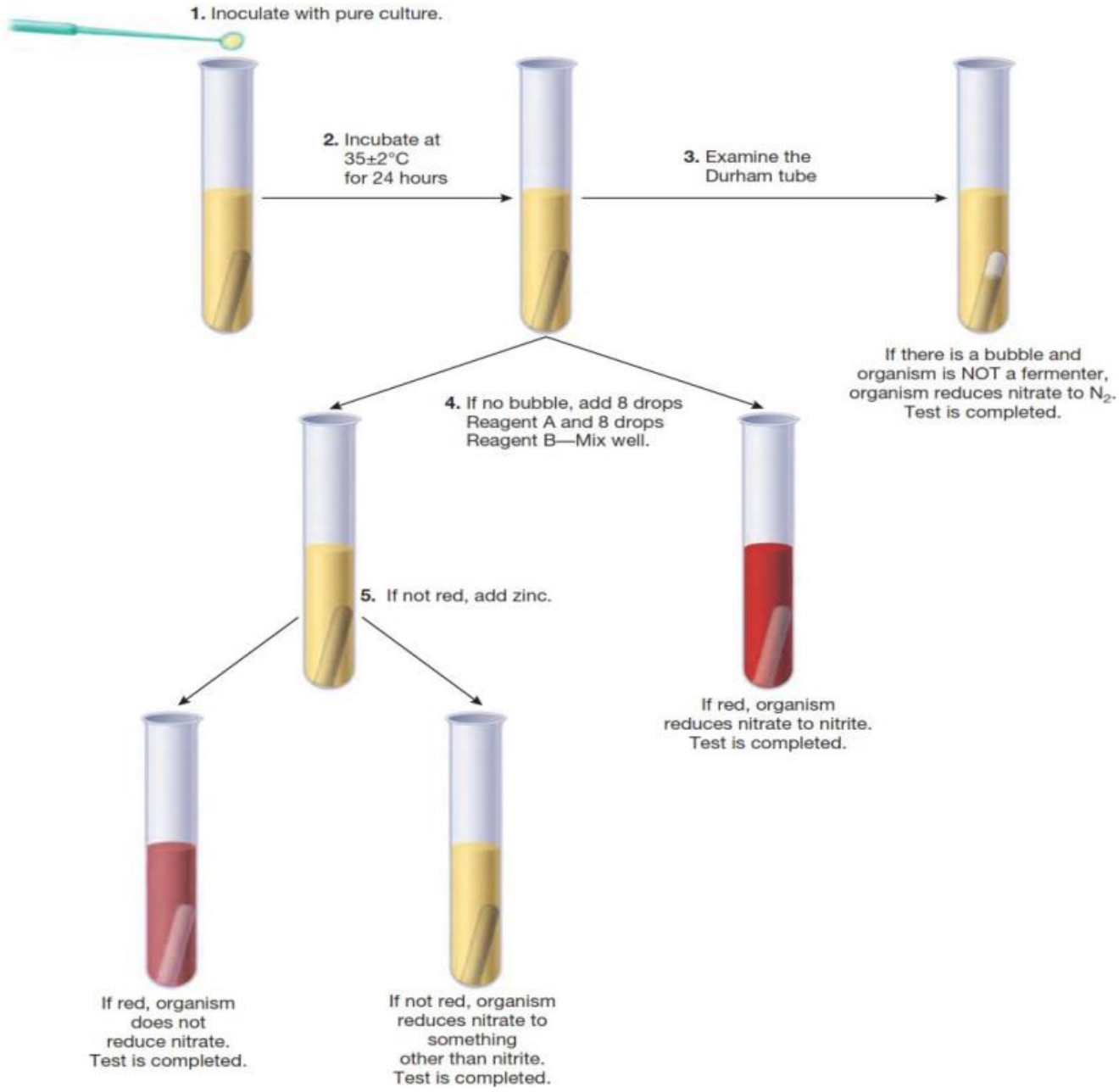
جلسه دوم:

۱) 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.

۲) در صورت عدم وجود حباب، ۸ قطره (حدود ۰/۵ 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.

۳) 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 هیچ گونه 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.

۴) نتایج این مرحله را نیز ثبت کنید.


1. Inoculate with pure culture.
2. Incubate at 35±2°C for 24 hours
3. Examine the Durham tube
If there is a bubble and organism is NOT a fermenter, organism reduces nitrate to N_2. Test is completed.
4. If no bubble, add 8 drops Reagent A and 8 drops Reagent B—Mix well.
5. If not red, add zinc.
If red, organism reduces nitrate to nitrite. Test is completed.
If red, organism does not reduce nitrate. Test is completed.
If not red, organism reduces nitrate to something other than nitrite. Test is completed.

کار عملی ۳: تفسیر نتایج

نتایج تست احیای نیترات و تفسیر آن

نتایج	تفسیر	شناسایی
گاز (غیرتخمیرکننده)	دِنیتریفیکاسیون و تولید گاز نیتروژن	+
گاز (تخمیرکننده یا وضعیت نامشخص)	منشاء گاز نامشخص؛ بایستی معرف‌ها افزوده شوند.	
رنگ قرمز (پس از افزودن معرف A و B)	احیاء نیترات به نیتریت	+
عدم تغییر رنگ (پس از افزودن معرف A و B)	تست ناقص؛ بایستی پودر روی افزوده شود	
عدم تغییر رنگ (پس از افزودن روی)	احیاء نیترات به ترکیبات نیتروژنی غیرگازی	+
رنگ قرمز (پس از افزودن پودر روی)	عدم احیاء نیترات	–

کار عملی ۴: بلاد آگار

- **تقسیم یک بلاد آگار به ۳ ناحیه**
- **کشت خطی ۳ باکتری** استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس، استرپتوکوکوس پیوژنز، استرپتوکوکوس پنومونیه

۲) با استفاده از نور و جدول مربوطه، تغییرات رنگی و شفافیت اطراف کلنی‌ها را مشاهده کنید. این مشاهدات با استفاده از دستگاه شمارنده‌ی کلنی (کلنی کانتر) یا نگه‌داری پلیت در مقابل نور انجام می‌شود. نتایج خود را در نمودار آماده‌شده در دفتر نتایج ثبت کنید.

جدول) نتایج آگار خون‌دار و تفسیر آن

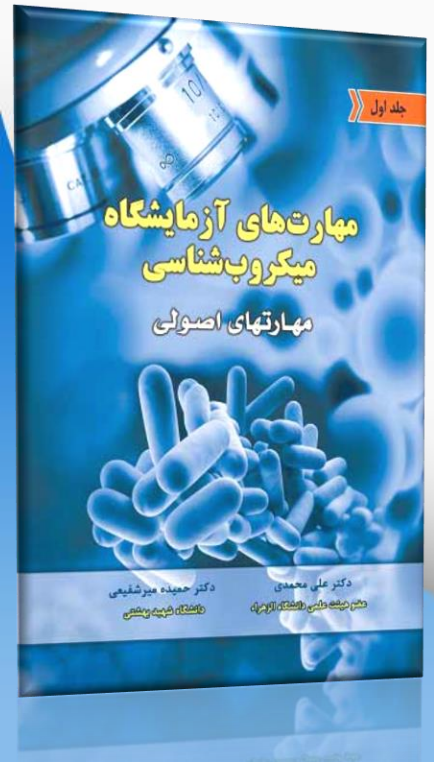
نتیجه	تفسیر	علامت
شفافیت اطراف کلنی رشد	همولیز کامل RBCs توسط باکتری	بتاهمولیز
رنگ سبز اطراف کلنی رشد	همولیز ناقص و جزئی RBCs توسط باکتری	آلفاهمولیز
عدم تغییر در محیط	عدم همولیز RBCsها توسط باکتری	بدون (گاما) همولیز

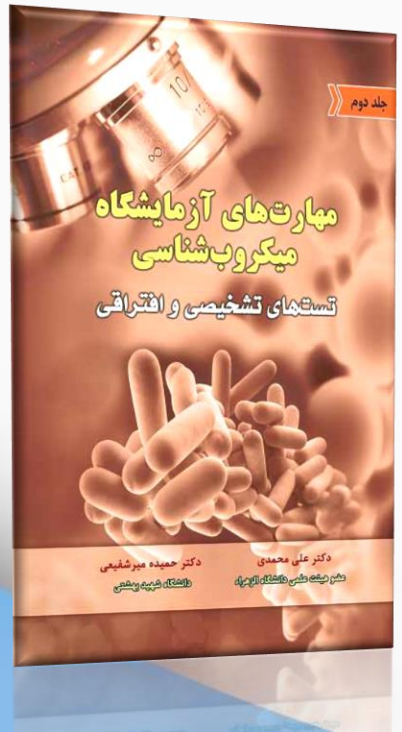
منبع:

- **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