

به نام خدا



MICROBIOLOGY LAB

# Nutrient Utilization Tests

By: **Dr. A. Mohammadi**

Department of Biology,  
Faculty of science,  
University of Alzahra

# مصرف مواد غذایی

در این قسمت تست‌هایی را با استفاده از دو محیط سیمونز (سیمون) سترات<sup>۱</sup> و مالونات برات<sup>۲</sup> انجام می‌دهید. محیط‌های مورد استفاده بسیار اختصاصی می‌باشند تا بدین طریق بتوان میکروارگانیزم‌ها را بر اساس توانایی رشدشان در هنگام محدودیت یک ماده مغذی ضروری (به عنوان مثال، کربن یا نیتروژن) از هم متمایز کرد. به عنوان مثال، محیط سترات دارای سترات سدیم به عنوان تنها ترکیب حاوی کربن و یون آمونیوم به عنوان تنها منبع نیتروژن است. محیط مالونات برات شامل سه منبع کربن اما با مهار رقابتی یک آنزیم خاص مانع استفاده از همه آن‌ها می‌شود.



# 1-Citrate Test

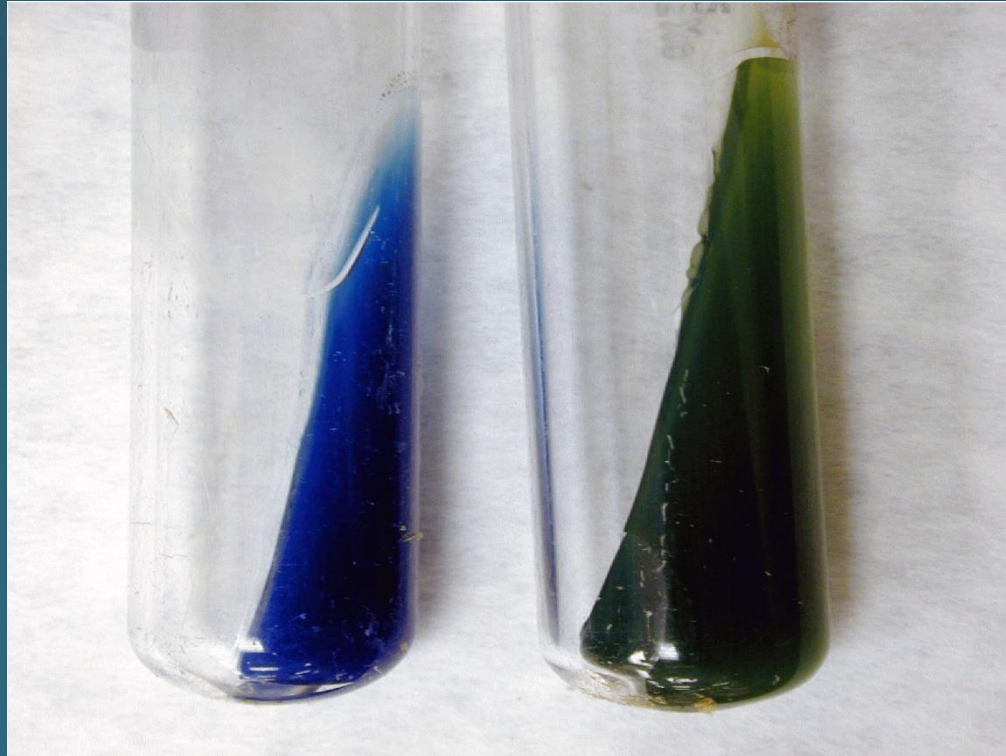
- تعیین توانایی یک میکروارگانیسم در مصرف سیتрат به عنوان تنها منبع کربن
- شناسایی و افتراق اعضای خانواده انتروباکتریاسه و همچنین افتراق آن‌ها از باکتری‌های میله‌ای گرم منفی.
- محیط سیمون سیترات آگار یک محیط اختصاصی است که دارای سیترات سدیم به عنوان تنها منبع کربن و فسفات آمونیوم (  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  ) به عنوان تنها منبع نیتروژن است.
- رنگ بُرمو تیمول بلو (BTB) به عنوان معرف pH عمل می‌کند که در pH 6.9، سبز رنگ و در pH 7.6، آبی رنگ است.

• باکتری‌هایی که می‌توانند در محیط باقی مانده و سیترات را مصرف کنند، همچنین فسفات آمونیوم را به آمونیاک (و هیدروکسید آمونیوم  $\text{NH}_4\text{OH}$ ) تبدیل می‌کنند که هر دو موجب قلیایی شدن محیط می‌شوند. با بالا رفتن pH محیط، رنگ محیط از سبز به آبی تغییر می‌یابد لذا تغییر رنگ محیط کشت به آبی حاکی از مثبت بودن تست سیترات است



# Citrate Utilization test

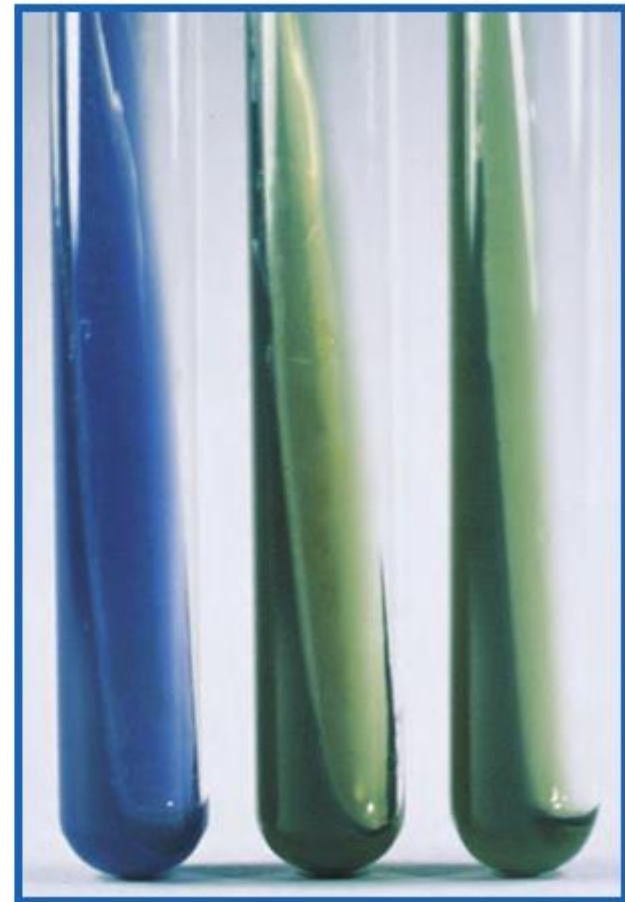
Positive



Negative



**5-30 CITRATE TEST RESULTS** ♦ These Simmons Citrate slants were inoculated with a citrate-positive (+) organism on the left and a citrate-negative (-) organism in the center. The slant on the right is uninoculated.



## TABLE OF RESULTS

Result	Interpretation	Symbol
Blue (even a small amount)	Citrate is utilized	+
No color change; growth	Citrate is utilized	+
No color change; no growth	Citrate is not utilized	-



## نکات:

- ایجاد رنگ آبی نشان‌دهنده واکنش مثبت است. گاهی ممکن است تغییر رنگ در محیط دیده نشود اما در مسیر خط کشت باکتری، رشد دیده شود که این حالت نیز مثبت در نظر گرفته می‌شود. بهتر است در این شرایط مجدداً با مقادیر کم باکتری، آزمایش را تکرار نمایید.
- مقدار تلقیح باکتری باید به میزان خیلی کم باشد زیرا در غیر این صورت ترکیبات آلی موجود در دیواره باکتری‌های در حال تخریب، کربن و نیتروژن زیادی آزاد کرده و می‌توانند واکنش مثبت کاذب حاصل نمایند.
- اگر پس از ۲۴ ساعت نتیجه‌ی منفی مشاهده گردید، ممکن است باکتری مذکور یک مصرف‌کننده کند سترات باشد لذا زمان بیشتری به آن اختصاص دهید. در برخی از نمونه‌ها این مدت بایستی حدود ۷ روز باشد.



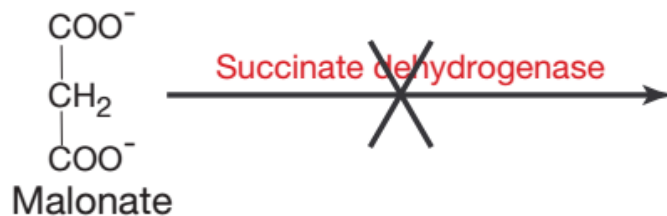
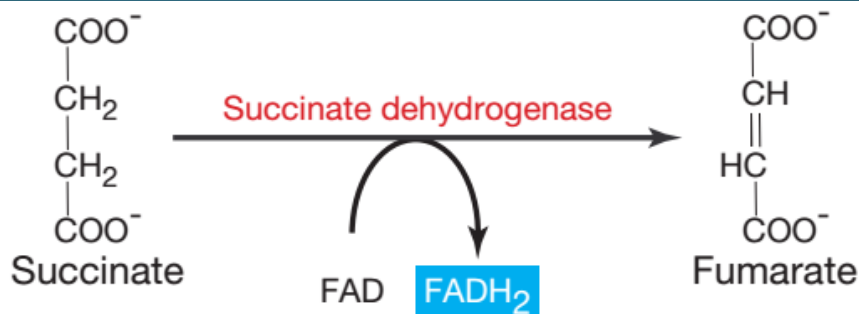
# 2- Malonate Test

**کاربرد:** تست مالونات در ابتدا برای افتراق اشرشیا (که در محیط رشد نمی کند) و انتروباکتر طراحی شد. در حال حاضر این تست به عنوان یک محیط افتراقی برای تشخیص و تمایز دیگر اعضای انتروباکتریاسه به ویژه سالمونلا بکار گرفته می شود.



یکی از واکنش‌های آنزیمی چرخه کربس، اکسیداسیون سوکسینات به فومارات است. در این واکنش که به حضور آنزیم سوکسینات دهیدروژناز نیاز است، کوآنزیم FAD به  $FADH_2$  احیاء می‌شود (واکنش بالا در شکل).

مالونات (اسید مالونیک) که به محیط کشت افزوده می‌شود، به حدی مشابه سوکسینات است که جایگزین آن در واکنش می‌شود (واکنش پایین در شکل). این **مهار رقابتی** سوکسینات دهیدروژناز همراه با ساخت بعدی سوکسینات در سلول، موجب توقف چرخه کربس و مرگ باکتری می‌شود مگر آنکه آن بتواند مالونات را به عنوان تنها منبع کربن باقی مانده مصرف یا تخمیر کند.



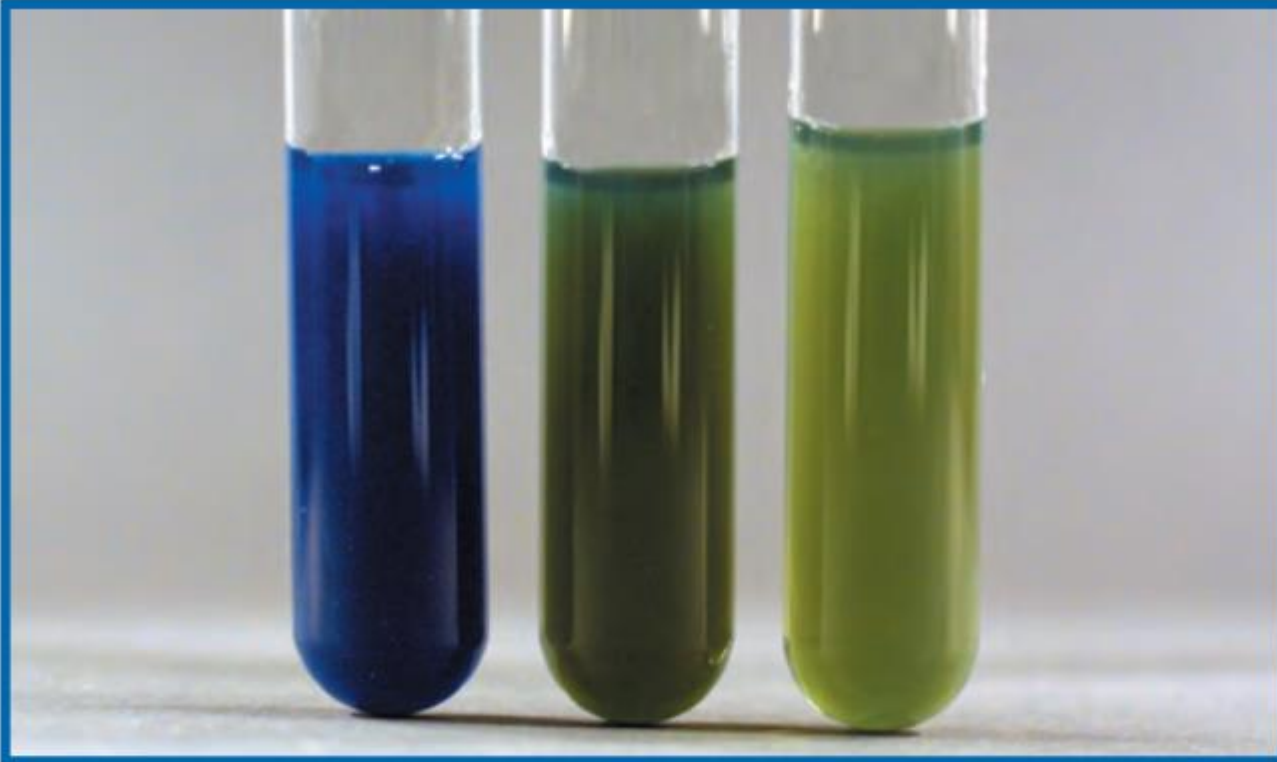


# محیط سدیم مالونات

9

مالونات برات محیطی برای شناسایی این رخداد است. این محیط دارای غلظت بالایی از مالونات سدیم (منبع کربن اولیه)، عصاره مخمر (مواد مغذی) و مقدار خیلی کمی گلوکز برای باکتری‌هایی است که به کندی پاسخ می‌دهند. بافرهایی نیز برای تثبیت pH در ۶/۷ به محیط افزوده شده است. رنگ

- رنگ بُرمو تیمول بلو نیز به عنوان معرف pH به محیط اضافه شده که در محیط تلقیح نشده، **سبز رنگ** است.
- ارگانیس‌هایی که قادر نیستند از مالونات به عنوان منبع کربن استفاده کنند اما موفق به مصرف مقدار کمی از گلوکز می‌شوند، ممکن است محیط را کمی زرد کنند یا اینکه رنگی تولید نکنند. این وقایع حاکی از **منفی بودن** تست است.
- ارگانیس‌هایی که رنگ آبی تیره تولید می‌کنند، قادرند مالونات را به عنوان منبع کربن استفاده کنند و لذا محیط را قلیایی می‌کنند.
- اگر باکتری‌ها بتوانند از مالونات به عنوان منبع کربن استفاده کنند، پس می‌توانند محصولات قلیایی تولید کنند که دلیل افزایش pH و تغییر رنگ محیط از سبز به آبی تیره است. ظهور آبی تیره حاکی از **مثبت بودن** تست است.



**5-32 MALONATE TEST RESULTS** ♦ Malonate broths illustrating malonate-positive (+) on the left, an uninoculated control in the center, and malonate-negative (–) on the right.



به نام خدا



MICROBIOLOGY LAB

# Decarboxylation & Deamination Tests

By: **Dr. A. Mohammadi**

Department of Biology,  
Faculty of science,  
University of Alzahra

# دِ کربو کسِیلاسیون و دِ آمیناسیون

تست‌های دِ کربو کسِیلاسیون و دِ آمیناسیون جهت افتراق اعضای انتروباکتریاسه و تمایز آن‌ها از دیگر میله‌ای‌های گرم منفی طراحی شده است. بسیاری از اعضای انتروباکتریاسه، یک یا چند آنزیم تولید می‌کنند که قادر به شکستن اسیدهای آمینه هستند. آنزیم‌هایی که گروه کربو کسِیل یک اسید آمینه

هر آنزیم دِ کربو کسِیلاز و دِ آمیناز مختص یک سوبسترای ویژه است. آنزیم دِ کربو کسِیلاز واکنش‌هایی را کاتالیز می‌کند که محصولات قلیایی تولید می‌کنند؛ بنابراین، ما با فراهم‌سازی محیط پایه، افزودن یک اسید آمینه مشخص و یک معرف pH قلیایی می‌توانیم توانایی یک ارگانیزم در تولید دِ کربو کسِیلاز خاص را تشخیص دهیم. تشخیص یک ارگانیزم در محیط دِ آمیناسیون نیز به همین صورت است لیکن به افزودن یک معرف شیمیایی برای ایجاد یک نتیجه قابل خواندن نیز احتیاج است.



# 3-Decarboxylation Tests

**کاربرد:** محیط دکربوکسیلاز می تواند دارای هر یک از اسیدهای آمینه باشد. معمولاً از این محیط برای تشخیص افتراقی انتروباکتریاسه ها و تمایز آنها از دیگر میله ای های گرم منفی استفاده می شود.

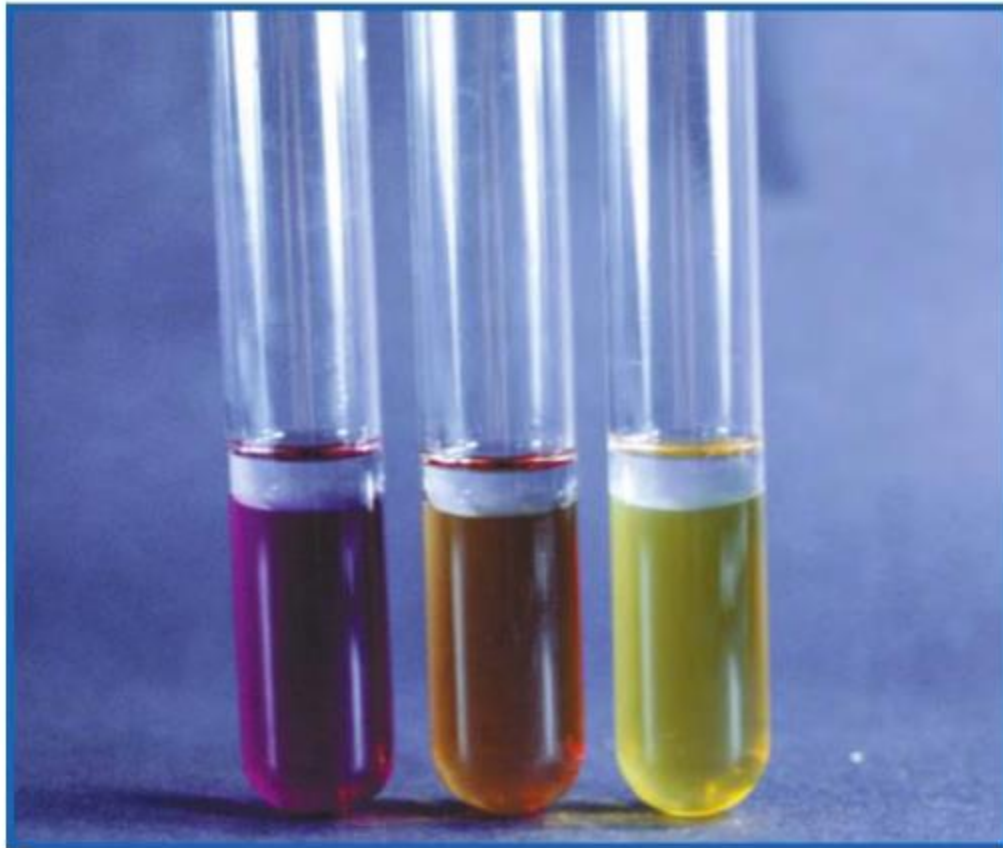
محیط مولر دکربوکسیلاز پایه دارای پپتون، گلوکز، معرف بنفش برم کروزول<sup>۱</sup> و کوآنزیم فسفات پیریدوکسال<sup>۲</sup> است. معرف برم کروزول در pH 6.8 به بالا به رنگ بنفش و در pH زیر ۵/۲، زردرنگ است. محیط پایه با توجه به دکربوکسیلاز مورد نظر می تواند دارای یک اسید آمینه اختصاصی باشد.

سطح محیط کشت پس از تلقیح با روغن معدنی مسدود می شود تا با ممانعت از ورود اکسیژن خارجی، شرایط تخمیر فراهم شود.



آنزیم‌های دکربوکسیلاز، اسیدهای آمینه را در محیط کشت دکربوکسیله نموده و آمین تولید می‌کنند. این عمل با تجمع محصولات نهایی قلیایی موجب بنفش رنگ شدن محیط می‌شود. اگر باکتری یک تخمیرکننده گلوکز (مثل تمام اعضای انتروباکتریاسه) باشد اما دکربوکسیلاز مناسبی تولید نکند، محیط زرد رنگ شده و به همان رنگ باقی می‌ماند اما اگر دکربوکسیلاز مربوطه تولید شود با دکربوکسیلاسیون اسید آمینه و ایجاد آمین، pH محیط کشت افزایش می‌یابد و تغییر رنگ زرد به بنفش (ارغوانی) را مشاهده خواهیم کرد. اگر باکتری گلوکز را تخمیر نکند هیچ تغییر رنگی در محیط ظاهر نمی‌شود. ظهور رنگ بنفش حاکی از مثبت بودن و ظهور هر رنگ دیگر حاکی از منفی بودن تست است.





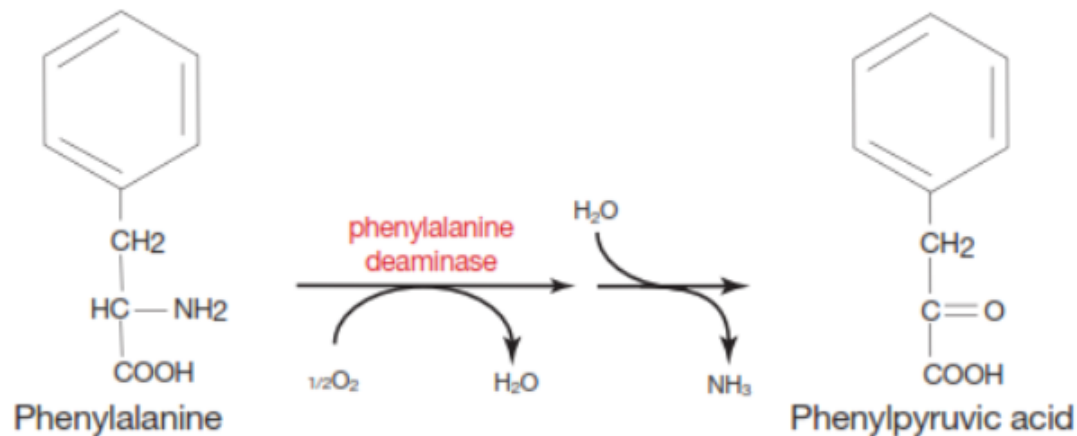
نتایج تست دکربوکسیلاسیون.  
در تصویر، نتیجه تست یک باکتری  
دکربوکسیلاز لیزین مثبت (لوله سمت  
چپ)، یک کنترل در وسط و یک  
باکتری دکربوکسیلاز لیزین منفی  
(لوله راست) را مشاهده می‌کنید. به  
تغییرات رنگی توجه کنید. چنین  
تغییراتی را در محیط‌های  
دکربوکسیلاز آرژینین و آرژینین هم  
می‌بینید.



# 4- Phenylalanine Deaminase Test

**کاربرد:** محیط فنیل آلانین دآمیناز برای تشخیص افتراقی جنس‌های مورگانلا، پروتئوس و پروویدنسیا از دیگر اعضای انتروباکتریاسه‌ها استفاده می‌شود.

میکروارگانیسم‌های تولید کننده آنزیم فنیل آلانین دآمیناز<sup>1</sup> می‌توانند از طریق توانایی شان در حذف گروه آمین ( $\text{NH}_2$ ) از اسید آمینه فنیل آلانین شناسایی شوند. این واکنش با شکست یک مولکول آب موجب تولید آمونیاک و اسید فنیل پیروویک می‌شود. بر این اساس فعالیت دآمیناز از طریق حضور اسید فنیل پیروویک مشخص می‌شود.



دآمیناسیون فنیل آلانین؛ دآمیناسیون یعنی حذف گروه آمین از یک اسید آمینه.

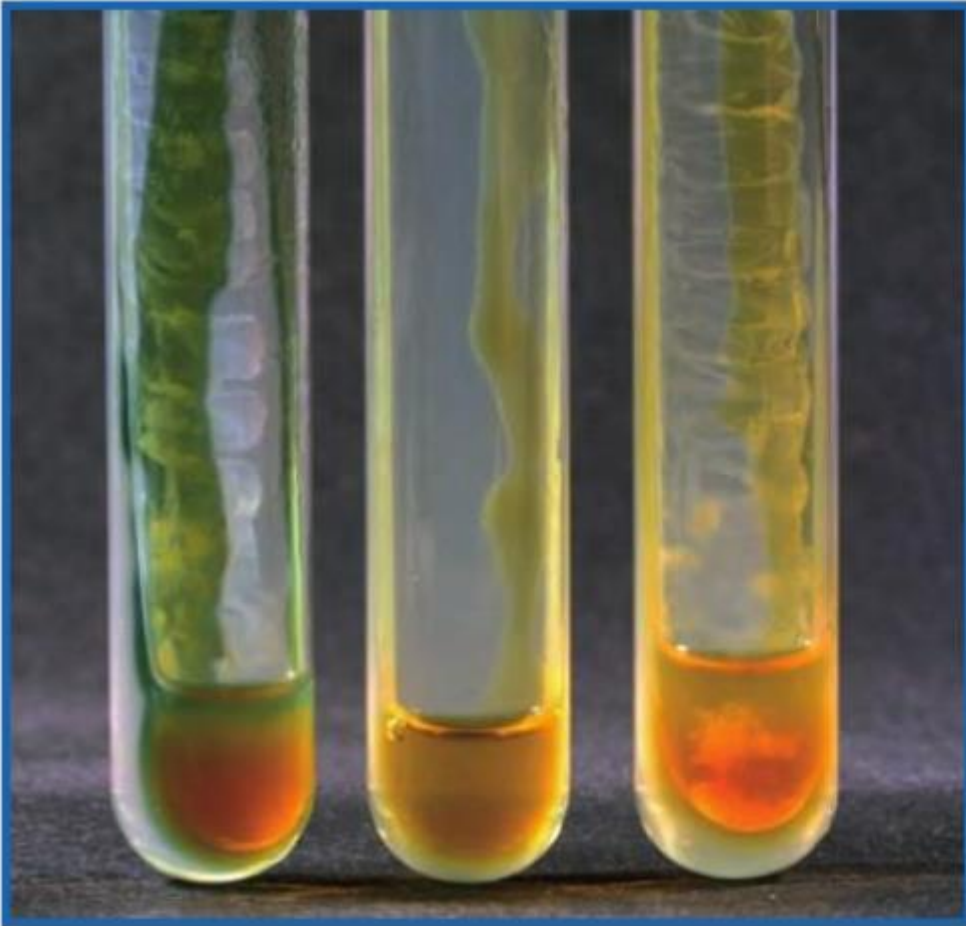


محیط فنیل آلانین آگار منبع خوبی برای فنیل آلانین است. یک معرف دارای کلرید فریک ( $\text{FeCl}_3$ ) بعد از گرمخانه گذاری به محیط افزوده می شود. معمولاً اسید فنیل پیروویک با کلرید آهن واکنش داده و تقریباً بلافاصله یک رنگ سبز تیره ایجاد می شود (شکل). تشکیل رنگ سبز حاکی از حضور اسید فنیل پیروویک و متعاقباً حضور آنزیم فنیل آلانین دآمیناز است. ظهور رنگ زرد نیز حکایت از منفی بودن تست دارد.



**واکنش معرف تست:** اسید فنیل پیروویک حاصله از دآمین شدن فنیل آلانین با کلرید آهن واکنش داده و با ایجاد رنگ سبز، مثبت بودن تست را مشخص می کند. توجه داشته باشید که نتیجه را فوراً ببینید چرا که ممکن است رنگ ظاهر شده سریع محو شود.





نتایج تست فنیل آلانین دآمیناز: به رنگ ایجاد شده در هر لوله در اثر کلرید فریک توجه کنید. در تصویر نتیجه تست یک باکتری فنیل آلانین دآمیناز مثبت (لوله سمت چپ)، یک کنترل در وسط و یک باکتری فنیل آلانین دآمیناز منفی (لوله راست) را مشاهده می کنید.



# کار عملی ۱: سیترات

مواد و ابزار مورد نیاز:

- سه لوله سیمون سیترات شیب دار
- محیط کشت براث تازه از باکتری‌های:

*Enterobacter aerogenes*  
*Escherichia coli*



## مراحل انجام کار:

### جلسه نخست:

- ۱) سه لوله حاوی سیمون سترات آگار شیب دار آماده کنید. نام نمونه یا باکتری مورد آزمایش، نام خودتان و تاریخ را بر دو عدد آن درج کنید. لوله سوم را کنترل برجسب گذاری کنید.
- ۲) مقدار کمی از باکتری موردنظر را با کمک یک سوزن استریل مخصوص کشت به محیط تلقیح کنید. لوله کنترل را تلقیح نکنید.
- ۳) تمام لوله‌ها را در دمای  $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ، به مدت ۴۸ ساعت گرمخانه گذاری کنید.



# کار عملی ۱: تفسیر نتایج

جلسه دوم:

- هر یک از لوله‌ها را از نظر تغییرات رنگ یا رشد بررسی کنید.
- نتایج به دست آمده را ثبت کنید. با کمک جدول تفسیر، نتایج را بررسی کنید.

نتایج تست سیمون سترات و تفسیر آنها

جدول نتایج		
نتیجه	تفسیر	علامت
آبی (حتی مقدار کمی)	مصرف سترات	+
عدم تغییر رنگ؛ وجود رشد	مصرف سترات	+
عدم تغییر رنگ؛ عدم رشد	عدم مصرف سترات	-



# کار عملی ۲: مالونات

مواد و ابزار مورد نیاز:

- سه لوله مالونات براث
- محیط کشت براث تازه از باکتری‌های:

*Enterobacter aerogenes*

*Escherichia coli*



## مراحل انجام کار:

### جلسه نخست:

- ۱) سه لوله حاوی مالونات برات آماده کنید. نام نمونه یا باکتری مورد آزمایش، نام خودتان و تاریخ را بر دو عدد آن درج کنید. لوله سوم را کنترل برجسب گذاری کنید.
- ۲) دو لوله را با باکتری موردنظر تلقیح کنید. لوله کنترل را تلقیح نکنید.
- ۳) تمام لوله‌ها را در دمای  $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ، به مدت ۴۸ ساعت گرمخانه گذاری کنید.



# کار عملی ۲: تفسیر نتایج

جلسه دوم:

- (۱) هر یک از لوله‌ها را از نظر تغییرات رنگ بررسی کنید.
- (۲) نتایج به دست آمده را ثبت کنید. با کمک جدول تفسیر، نتایج را بررسی کنید.

نتایج تست مالونات و تفسیر آنها

جدول نتایج		
علامت	تفسیر	نتیجه
+	مصرف مالونات	آبی تیره
-	عدم مصرف مالونات	عدم تغییر رنگ؛ یا کمی زرد





# کار عملی ۳: سیترات

## مواد و ابزار مورد نیاز:

- چهار محیط دکربو کسילاز براث لیزین
- چهار محیط دکربو کسيلاز براث ارنیتین
- چهار محیط دکربو کسيلاز براث آرژینین
- چهار محیط دکربو کسيلاز پایه (فاقد اسید آمینه)
- روغن معدنی استریل
- چند پی پت استریل
- محیط کشت براث تازه از باکتری‌های:

*Salmonella typhimurium* (BSL-2)

*Enterobacter aerogenes*

*Proteus vulgaris* (BSL-2)



## مراحل انجام کار:

### جلسه نخست:

- (۱) چهار لوله از هر یک از محیط‌های دکربوکسیلاز را آماده کنید. نام نمونه یا باکتری مورد آزمایش، نام خودتان و تاریخ را بر سه عدد از آن‌ها درج کنید. لوله چهارم را کنترل برچسب‌گذاری کنید.
- (۲) محیط کشت‌ها را با باکتری‌های موردنظر تلقیح کنید. لوله کنترل را تلقیح نکنید.
- (۳) با استفاده از پی‌پت پاستور استریل و در شرایط استریل یک لایه به ضخامت ۳-۴ میلی‌متر روغن معدنی را به بالای تمام لوله‌ها اضافه کنید.
- (۴) تمام لوله‌ها را در دمای  $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ، به مدت یک هفته گرمخانه‌گذاری کنید.



# کار عملی ۳: تفسیر نتایج

جلسه دوم:

- هر یک از لوله‌ها را از انکوباتور خارج کرده و از نظر تغییرات رنگ مورد بررسی قرار دهید.
- نتایج به دست آمده را ثبت کنید. با کمک جدول تفسیر، نتایج را بررسی کنید.

نتایج تست دکربوکیلاز و تفسیر آن‌ها

جدول نتایج		
علامت	تفسیر	نتیجه
-	عدم دکربوکیلاسیون	عدم تغییر رنگ
-	تخمیر؛ عدم دکربوکیلاسیون	زرد رنگ
+	دکربوکیلاسیون؛ باکتری آنزیم عدم دکربوکیلاز خاص تولید می‌کند.	بنفش (حتی اندکی)



# کار عملی ۴: فنیل آلانین

## مواد و ابزار مورد نیاز:

- سه لوله فنیل آلانین آگار شیب دار
- محلول ۱۲٪ کلرید فریک ( $\text{FeCl}_3$ )
- محیط کشت برات تازه از باکتری‌های:

*Escherichia coli*

*Proteus vulgaris* (BSL-2)



# کار عملی ۴: تفسیر نتایج

مراحل انجام کار:

جلسه نخست:

- (۱) سه محیط فنیل آلانین آگار شیب‌دار را آماده کنید. نام نمونه یا باکتری مورد آزمایش، نام خودتان و تاریخ را بر دو عدد از آن‌ها درج کنید. لوله سوم را کنترل برچسب گذاری کنید.
- (۲) دو لوله را با مقدار زیادی از باکتری مورد نظر تلقیح کنید. لوله کنترل را تلقیح نکنید.
- (۳) تمام لوله‌ها را در دمای  $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ، به مدت ۱۸ الی ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری کنید.



- (۱) پس از گرمخانه گذاری، چند قطره محلول ۱۲٪ کلرید فریک را به هر لوله افزوده و تغییرات رنگ را به سرعت بررسی کنید. ممکن است رنگ ظاهر شده به سرعت ناپدید شود.
- (۲) نتایج به دست آمده را ثبت کنید. با کمک جدول تفسیر، نتایج را بررسی کنید.

### نتایج تست فنیل آلانین دآمیناز و تفسیر آنها

#### جدول نتایج

نتیجه	تفسیر	علامت
رنگ سبز	حضور فنیل آلانین دآمیناز	+
عدم تغییر رنگ؛ یا کمی زرد	عدم حضور فنیل آلانین دآمیناز	-

ظهور بلافاصله رنگ سبز بعد از ریختن معرف، بیانگر مثبت بودن این تست است. رنگ سبز با گذشت حدود ۱۰ دقیقه کم رنگ تر می شود که با افزودن مقادیر اضافی معرف، دوباره رنگ سبز ایجاد می شود. بعضی گونه ها به قدری سریع فنیل آلانین را دآمین می کنند که بعد از ۴ ساعت انکوباسیون محیط کشت، نیز تست مثبت می شود.



# 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

