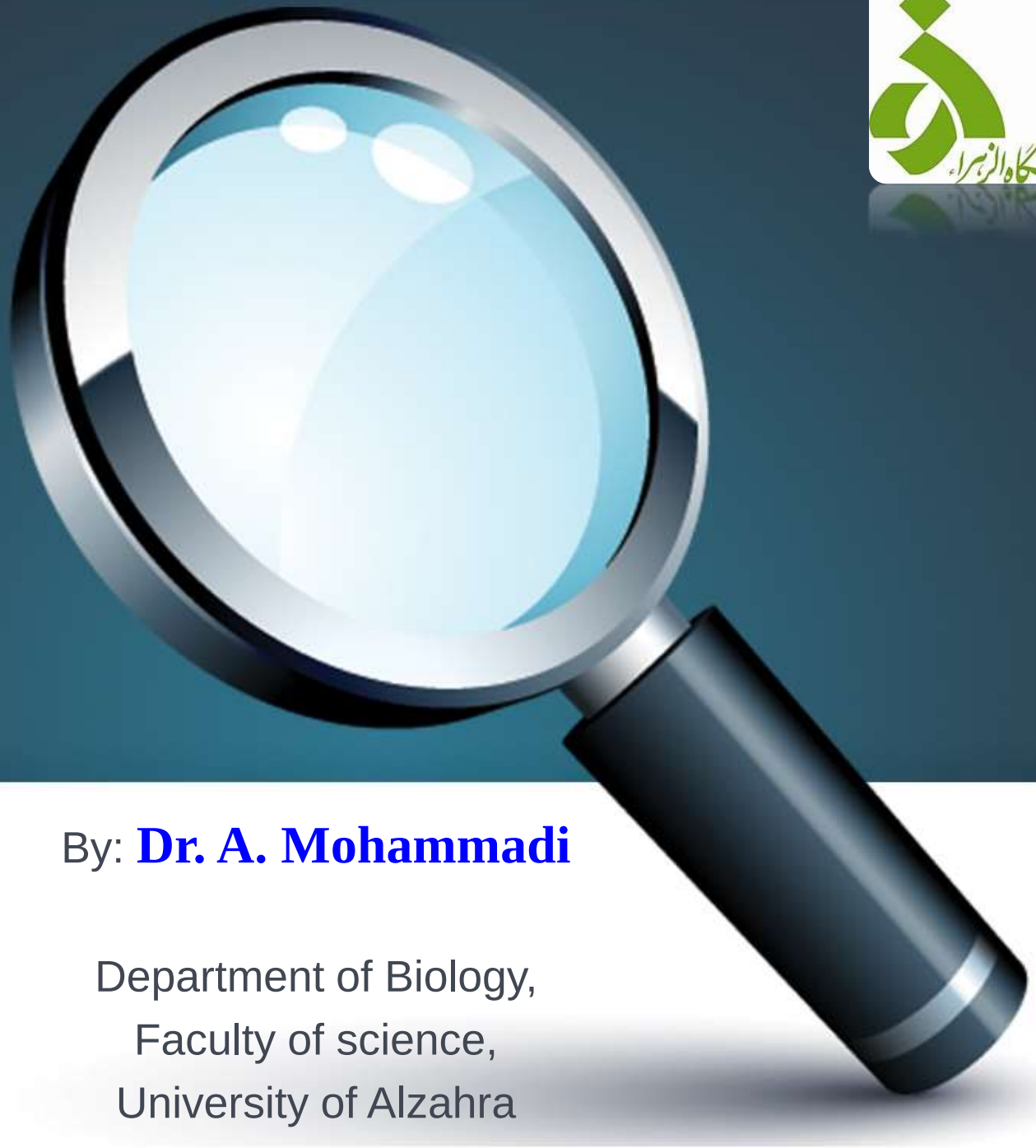
به نام خدا

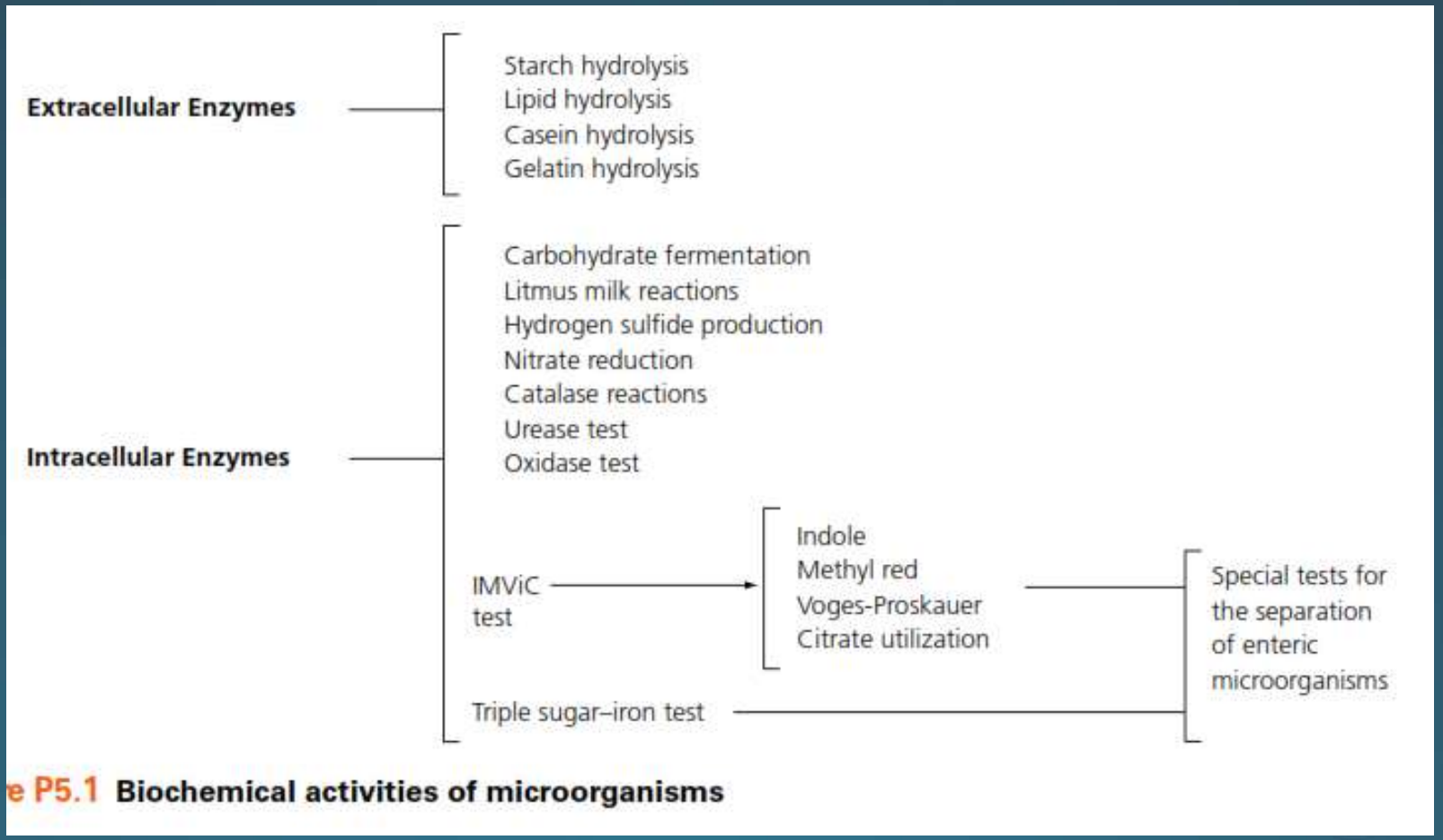
Hydrolase

MICROBIOLOGY LAB



By: **Dr. A. Mohammadi**

Department of Biology,
Faculty of science,
University of Alzahra



e P5.1 **Biochemical activities of microorganisms**

هیدرولیز نشاسته

کاربرد: محیط نشاسته آگار در ابتدا برای کشت باکتری نایسریا طراحی شده بود امّا بعدها به این منظور استفاده نشد بلکه با افزودن معرف‌های pH، برای جداسازی و شناسایی احتمالی گاردنرلا واژینالیس[1] بکار گرفته شد. این محیط همچنین در افتراق جنس‌های کلستریدیوم؛ باسیلوس، باکتروئید، فوزوباکتریوم و انتروکوکوس استفاده می‌شود.

Starch hydrolysis test

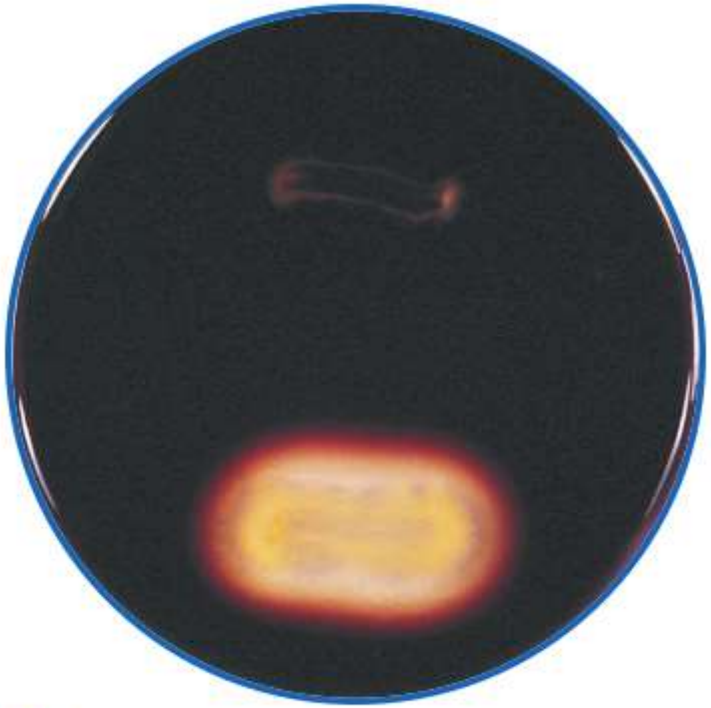
- هنگامی که میکروارگانیسم‌های دارای آنزیم‌های آلفا آمیلاز و الیگو-۱،۶-گلیکوزیداز به محیط نشاسته آگار وارد شوند می‌توانند نشاسته اطراف محیط خود را هیدرولیز کنند.

- با توجه به بی‌رنگ بودن نشاسته و زیرواحدهای آن در محیط کشت با کمک معرف یُد می‌توان آن‌ها را در اطراف رشد باکتری مشاهده کرد.

- وقتی که یُد با نشاسته واکنش می‌دهد رنگ آبی یا قهوه‌ای تیره ایجاد می‌شود لذا هیدرولیز میکروبی نشاسته به صورت هاله شفافی در اطراف کلنی باکتری مشخص می‌شود چرا که به علت مصرف باکتری، هیچ نشاسته‌ای در اطرافش وجود ندارد. در این حالت نتیجه¬ی هیدرولیز نشاسته، مثبت است.

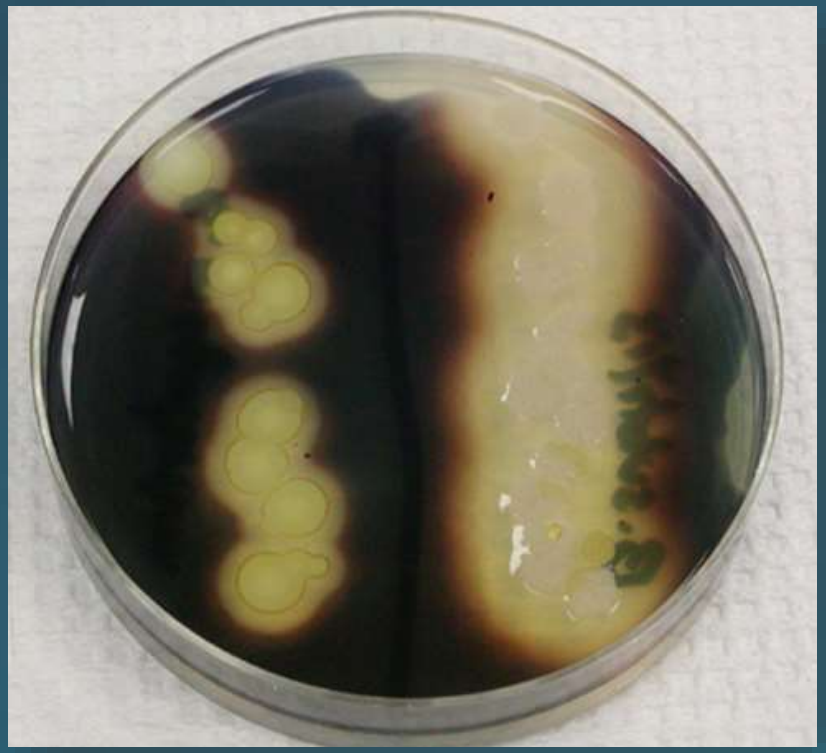
TABLE **5-12** Amylase Test Results and Interpretations

TABLE OF RESULTS		
Result	**Interpretation**	**Symbol**
Clearing around growth	Amylase is present	+
No clearing around growth	No amylase is present	–



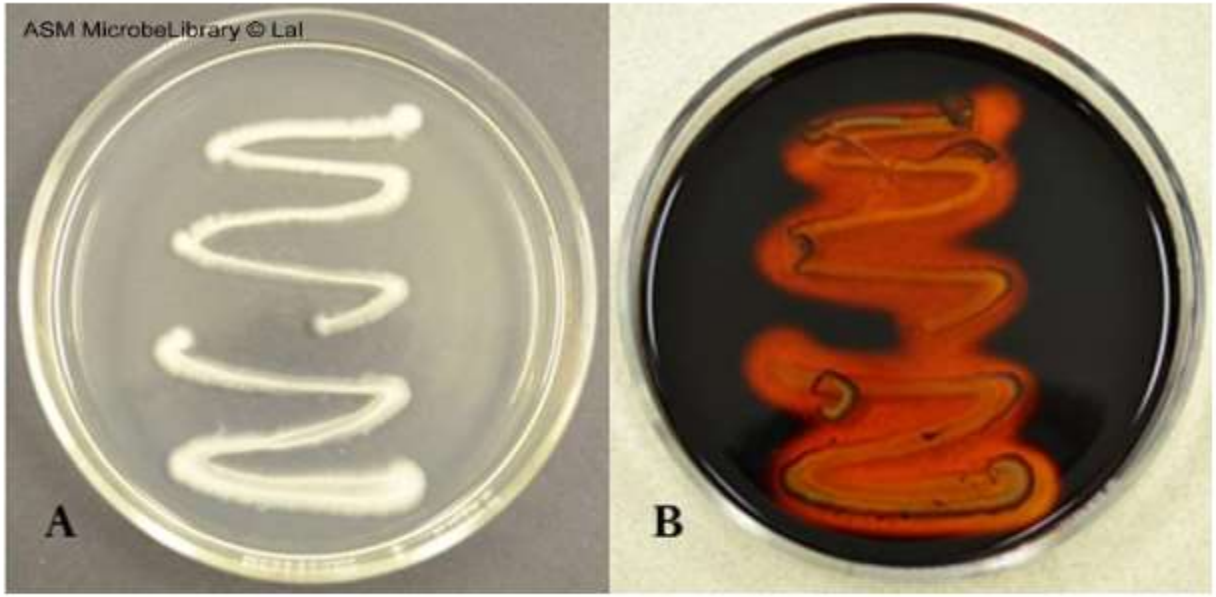
5-43 STARCH HYDROLYSIS TEST ✦ This is a Starch Agar plate with iodine added to detect amylase activity. The organism above shows no clearing and is negative (–). The organism below is surrounded by a halo of clearing and is positive (+).

Starch hydrolysis test

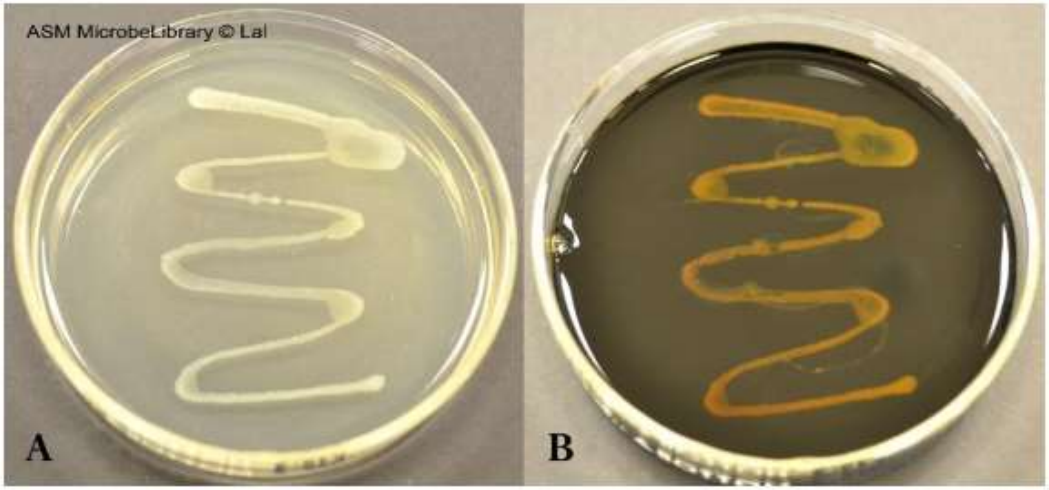


Positive

Negative



نتیجه تست هیدرولیز باسیلوس سوبتیلیس؛ پیش از افزودن یُد (چپ) و پس از افزودن یُد (راست). بعد از افزودن ید، تشکیل ناحیه شفاف نشان‌دهنده‌ی مثبت بودن نتیجه‌ی تست هیدرولیز است.



نتیجه تست هیدرولیز اشرشیا کلی؛ پیش از افزودن یُد (چپ) و پس از افزودن یُد (راست). بعد از افزودن ید، عدم تشکیل ناحیه شفاف نشان‌دهنده‌ی منفی بودن نتیجه‌ی تست هیدرولیز است.

تست هیدرولیز ژلاتین

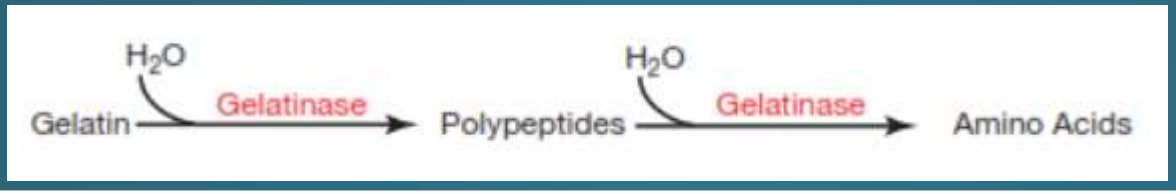
کاربرد: این تست برای شناسایی قابلیت یک میکروب در تولید آنزیم ژلاتیناز استفاده می‌شود. استافیلوکوکوس اورئوس که ژلاتیناز مثبت است می‌تواند از استافیلوکوکوس اپیدرمیس متمایز شود. گونه‌های سراشیا و پروتئوس اعضای مثبت انتروباکتریاسه هستند درحالی‌که اکثر اعضای این خانواده، ژلاتیناز منفی می‌باشند. باسیلوس آنتراسیس، باسیلوس سرئوس و دیگر اعضای این جنس و همچنین کلستریدیوم تتانی و کلستریدیوم پرفرنژنس، ژلاتیناز مثبت هستند.

Gelatin liquefaction test

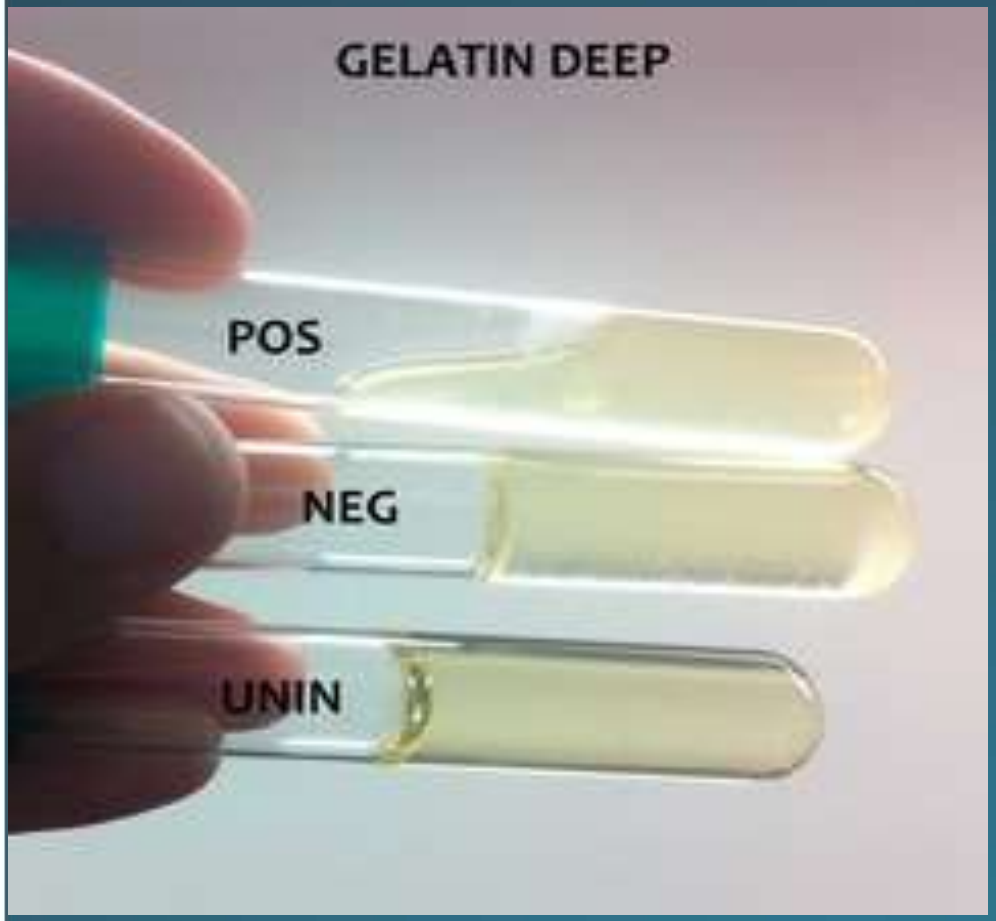
- استافیلوکوکوس اورئوس که ژلاتیناز مثبت است می‌تواند از استافیلوکوکوس اپیدرمیس متمایز شود. گونه‌های سراشیا و پروتئوس اعضای مثبت انتروباکتریاسه هستند درحالی‌که اکثر اعضای این خانواده، ژلاتیناز منفی می‌باشند. باسیلوس آنتراسیس، باسیلوس سرئوس و دیگر اعضای این جنس و همچنین کلستریدیوم تتانی و کلستریدیوم پرفرنژنس،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



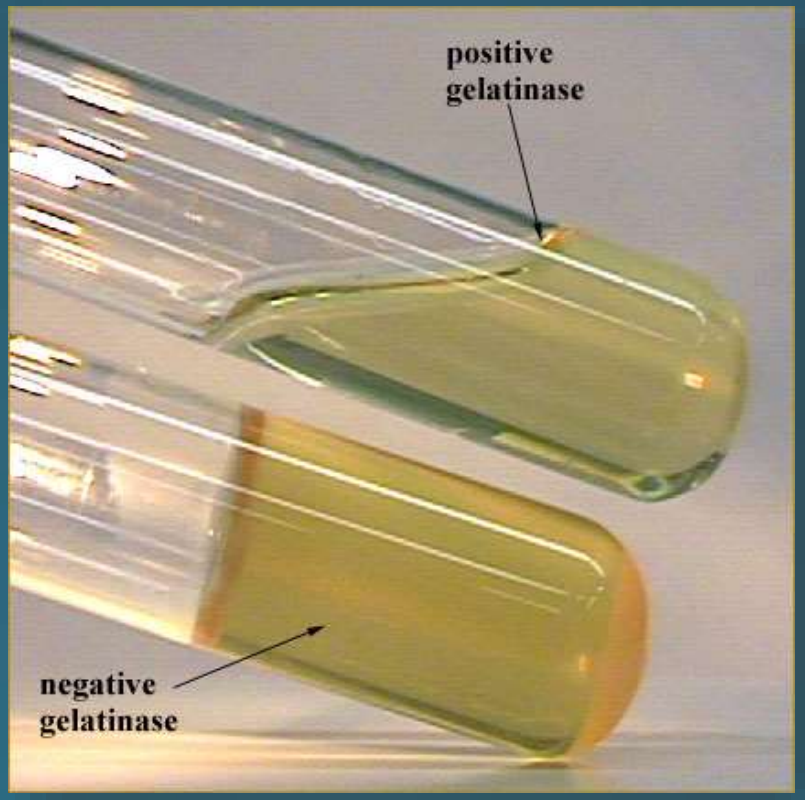
Gelatin liquefaction test



- 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 25 گرمخانه‌گذاری شود تا تأیید شود که مایع شدن محیط به دلیل گرما نبوده است.

Gelatin liquefaction test

Nutrient Gelatin

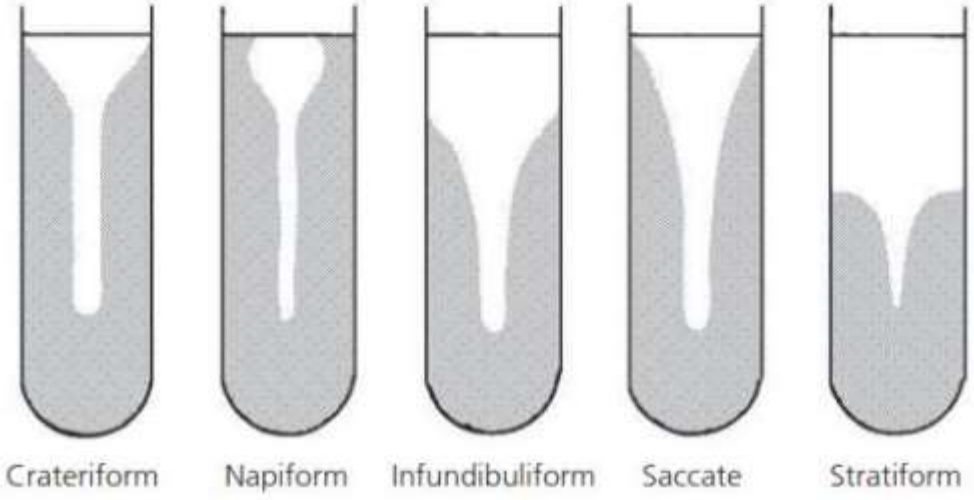


تنوع شکلی

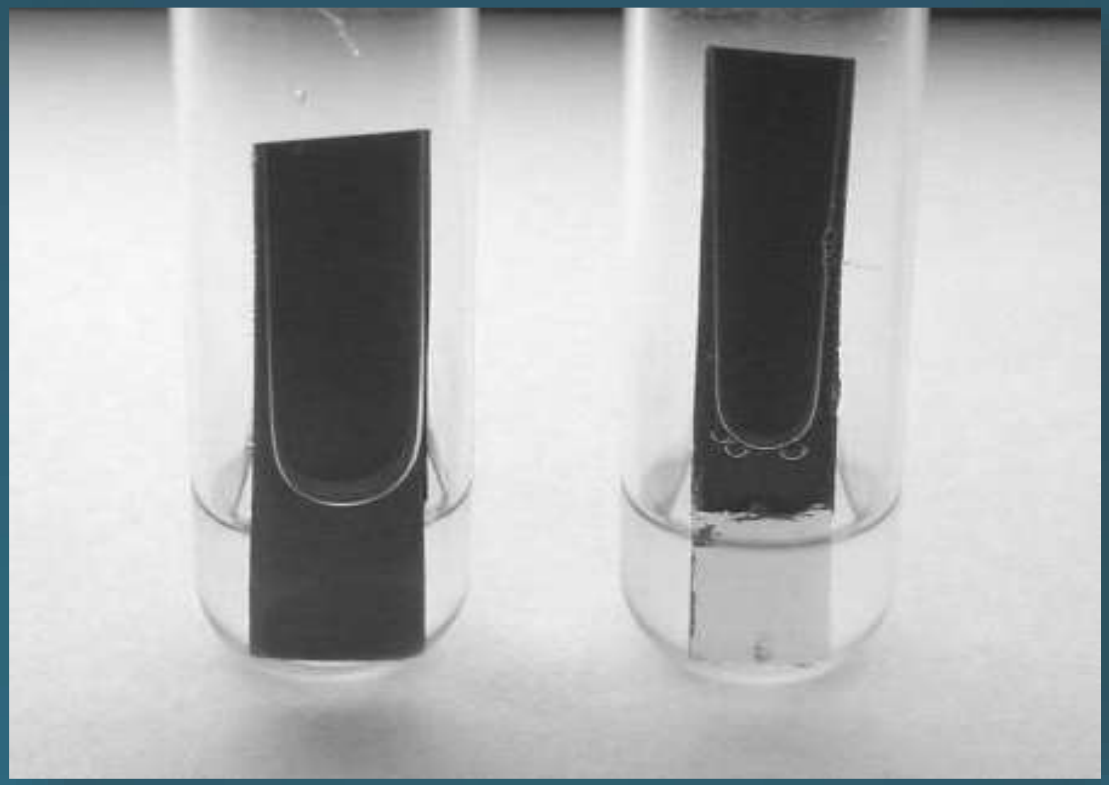
مایع سازی ژلاتین توسط میکروارگانیسم‌ها می‌تواند به اشکال مختلفی صورت گیرد. برای بیان این تفاوت‌ها از واژه‌های زیر استفاده می‌شود:

- *کاسه‌ای*: مایع سازی مشابه بشقاب
- *شلغمی*[۲]
- *قیفی*[۳]: قیف مانند و یا مخروط وارونه
- *کیسه‌ای*[۴]: کیسه‌مانند، لوله‌ای، استوانه‌ای
- *چینه‌ای*[۵]: طبقه مانند، مایع سازی به سمت دیواره در منطقه بالا

در تصویر زیر این تفاوت‌ها نشان داده شده است:



X- Ray or Gelatin Film test



The organism on the left does not hydrolyze gelatin and, therefore, no clearing of the gelatin film is seen. On the right, the portion of the strip submersed in the organism suspension has cleared, indicating gelatin hydrolysis.

هیدرولیز اوره

کاربرد: این تست برای افتراق میکروارگانیسم‌ها بر اساس توانایی‌شان در هیدرولیز اوره با کمک آنزیم اوره‌آز استفاده می‌شود. پاتوژن‌های دستگاه ادراری از جنس پروتئوس ممکن است به واسطه فعالیت سریع اوره‌آزی خود از دیگر باکتری‌های روده‌ای متمایز شوند.

Urease test

Negative

Positive

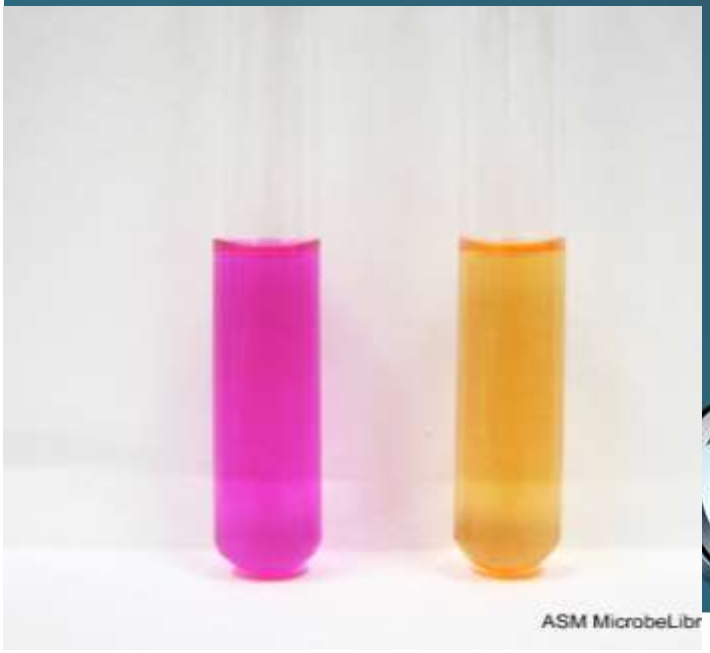
- پاتوژن‌های دستگاه ادراری از جنس پروتئوس ممکن است به واسطه فعالیت سریع اوره آزی خود از دیگر باکتری‌های روده‌ای متمایز شوند

TABLE OF RESULTS

Result			
24 hours	24 hours to 6 days	Interpretation	Symbol
All pink		Rapid urea hydrolysis; strong urease production	+
Partially pink	All pink or partially pink	Slow urea hydrolysis; weak urease production	w+
Orange or yellow	All pink or partially pink	Slow urea hydrolysis; weak urease production	w+
Orange or yellow	Orange or yellow	No urea hydrolysis; urease is absent	–

5-45 **Urease Agar Test Results** ✦ Urease agar tubes after a 24-hour incubation illustrate a rapid urea splitter (+) on the left and a urease-negative organism on the right. An uninoculated control is in the center.

در لوله‌های اوره براث، ایجاد رنگ قرمز نشان‌دهنده‌ی واکنش قلیایی و هیدرولیز اوره است



کار عملی ۱: تست هیدرولیز نشاسته

- یک پلیت نشاسته آگار
- محلول ید گرم (که در رنگ‌آمیزی گرم استفاده می‌شود)
- باکتری‌های پیشنهادی:

Escherichia coli
Bacillus cereus

جلسه نخست:

۱) محیط نشاسته آگار را با یک مارکر به سه قسمت مساوی تقسیم کنید. این کار را در کف پلیت انجام دهید.

۲) نام نمونه یا باکتری مورد آزمایش، نام خودتان و تاریخ را بر پلیت درج کنید.

۳) دو قسمت پلیت را با باکتری‌های مورد نظر به صورت لکه‌ای تلقیح کنید[1].

۴) پلیت را وارونه کرده و آن را به صورت هوازی در دمای $35 \pm 2\ ^{\circ}C$، به مدت ۴۸ ساعت گرمخانه‌گذاری کنید.

جلسه دوم:

۱) پلیت را از انکوباتور خارج کرده و پیش از افزودن یُد به موقعیت و ظاهر رشد توجه کنید.

۲) کلنی رشد و اطراف آن را با یُد بپوشانید. به مدت ۳۰ ثانیه تا یک دقیقه صبر کنید تا رنگ ایجاد شده، محل وجود نشاسته را در محیط نشان دهد. (معمولاً رشد در آگار مانع از تماس نشاسته و ید می‌شود به نحوی که در آن نقطه هیچ واکنش رنگی صورت نمی‌گیرد. گاهی اوقات کارآموزان مبتدی این عدم تغییر رنگ را به اشتباه به عنوان یک نتیجه مثبت ثبت می‌کنند؛ بنابراین، در هنگام بررسی آگار برای مشاهده هاله شفاف، به هاله اطراف رشد، نه در خود رشد نگاه کنید.)

کار عملی ۱: تفسیر نتایج

نتایج تست هیدرولیز نشاسته و تفسیر آن‌ها

جدول نتایج		
نتیجه	تفسیر	علامت
هاله شفاف اطراف رشد	حضور آمیلاز	+
عدم هاله شفاف در اطراف رشد	عدم حضور آمیلاز	–

نکات:

- اگر رنگ محلول یُد گرم به جای نارنجی-قهوه‌ای به زرد تبدیل شود نشان‌دهنده‌ی قدیمی بودن محلول است که باید با محلول تازه جایگزین شود.
- با قرار دادن یک ورق سفید زیر پلیت بهتر می‌توانید ناحیه مصرف نشاسته را مشاهده کنید.
- برای تشخیص رنگ، فوراً پلیت را بررسی کنید چرا که رنگ ایجاد شده به سرعت محو می‌شود.
- اگر در نظر دارید که پلیت را مجدداً تلقیح کنید هرگز آن را در ابتدا با معرف ید غوطه‌ور نکنید بلکه افزودن چند قطره یُد در اطراف ناحیه رشد کفایت می‌کند. بعداً اگر نیاز شد می‌توانید مجدداً آن را تلقیح کرده و تست را با افزودن یُد تکرار کنید. دو دلیل برای این کار وجود دارد: (۱) یُد، به عنوان یک ضدعفونی‌کننده، ممکن است رشدهای بعدی باکتری را متوقف کند و (۲) غوطه‌ورسازی ممکن است به جدا شدن کلنی باکتری از سطح آگار منجر شود.

کار عملی ۲: تست هیدرولیز ژلاتین

مواد و ابزار مورد نیاز:

- سه لوله ژلاتین غذایی (نوترینت ژلاتین)
- یخچال یا یک ظرف حاوی یخ
- کشت تازه از باکتری‌های:

Escherichia coli
Bacillus cereus

پس از آماده‌سازی محیط کشت، ۲ الی ۳ میلی‌لیتر آن را درون لوله‌های ۱۳ × ۱۰۰ میلی‌متری ریخته و آن را به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۱۲۱ °C اتوکلاو کنید. محیط‌ها را پس از اتوکلاو می‌توان در دمای ۲ تا ۸ °C ذخیره‌سازی کرد. دقت داشته باشید که لوله‌های دارای آلودگی میکروبی، تغییر رنگ، خشک یا سایر نشانه‌های فساد را در آزمون‌هایتان بکار نبرید.

جلسه نخست:

۱) سه لوله حاوی ژلاتین غذایی تهیه کنید. نام نمونه یا باکتری مورد آزمایش، نام خودتان و تاریخ را بر دو عدد آن درج کنید. لوله سوم را کنترل برچسب گذاری کنید.

۲) دو لوله را با مقدار زیادی از باکتری‌های مورد نظر به صورت عمقی تلقیح کنید. لوله کنترل را تلقیح نکنید.

۳) تمام لوله‌ها را در دمای ۲۵ °C، به مدت یک هفته گرمخانه‌گذاری کنید.

۴) روزانه لوله‌ها را از نظر مایع شدن بررسی کنید.

جلسه دوم:

۱) لوله کنترل را بررسی کنید. اگر ژلاتین جامد است، می‌توان نمونه تست را بررسی کرد. اگر نمونه کنترل مایع است، تمام نمونه‌ها را به مدت ۱۵ الی ۳۰ دقیقه در حمام آب یخ یا یخچال قرار دهید تا نمونه کنترل جامد شود.

۲) هنگامی که نمونه کنترل جامد شد، محیط‌های تلقیح شده را با کج کردن آهسته‌ی لوله‌ها از نظر ذوب شدن (مایع شدن) ژلاتین بررسی کنید.

۳) نتایج را ثبت کنید و با کمک جدول، تفسیر کنید.

کار عملی ۲: تفسیر نتایج

نتایج تست هیدرولیز ژلاتین و تفسیر آن‌ها

جدول نتایج		
نتیجه	تفسیر	علامت
مایع شدن ژلاتین (کنترل جامد)	حضور ژلاتیناز	+
ژلاتین جامد	عدم حضور ژلاتیناز	–

نکات:

- به دلیل کند بودن هیدرولیز ژلاتین برخی از باکتری‌ها (ژلاتین مثبت کند)، لوله‌های حاوی چنین باکتری‌هایی را برای مشاهده هیدرولیز کامل، چند روز بیشتر در گرمخانه نگه‌دارید.
- برخی از باکتری‌ها همچون پروتئوس ولگاریس برای مثبت شدن نتیجه تست نیاز به گرمخانه‌گذاری تا حدود ۱۴ روز دارند.
- در روش کشت عمقی بایستی توجه داشته باشید که برخی از باکتری‌های ژلاتین مثبت، آنزیم ژلاتیناز را کندتر تولید می‌کنند لذا برای کسب نتیجه بهتر به نکات زیر توجه داشته باشید:
  - به‌کارگیری مایه تلقیح بیشتر.
  - گرمخانه‌گذاری طولانی‌تر (۷ الی ۱۴ روز) لوله‌های مورد آزمون.
  - به‌کارگیری لوله‌های کوچک‌تر برای محیط ژلاتین غذایی (۱۳ در ۱۰۰ میلی‌متر).
  - استفاده از مقادیر کمتری از ژلاتین غذایی (۲ تا ۳ میلی‌لیتر در هر لوله).

کار عملی ۳: تست هیدرولیز اوره

مواد و ابزار مورد نیاز:

- چهار محیط اوره براث
- چهار محیط اوره آگار شیب‌دار
- کشت‌های تازه در محیط مایع یا بر روی آگار شیب‌دار از باکتری‌های:

Escherichia coli
Proteus vulgaris (BSL-2)
Klebsiella pneumoniae (BSL-2)

جلسه نخست:

۱) چهار لوله محیط کشت از هر دو فرم براث و آگار تهیه کنید.

۲) نام نمونه یا باکتری مورد آزمایش، نام خودتان و تاریخ را بر سه عدد آن درج کنید. لوله چهارم را کنترل برچسب گذاری کنید.

۳) سه لوله براث را با مقدار زیادی از باکتری‌های موردنظر تلقیح کنید. لوله کنترل را تلقیح نکنید.

۴) سه لوله آگار را به صورت خطی با باکتری‌های مورد نظر تلقیح کنید. سطح آگار را به صورت کامل با مقدار زیادی از باکتری بپوشانید. لوله کنترل را تلقیح نکنید.

۵) تمام لوله‌ها را به صورت هوازی در دمای $35 \pm 2\ ^{\circ}C$، به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری کنید. اگر بیش از ۲۴ ساعت از آزمایشگاه دور می‌شوید، به نحوی برنامه‌ریزی کنید تا در مدت ۲۴ ساعت نتایج را ثبت کنید یا اینکه به فردی بگویید تا نتایج را ثبت نماید. نتایج مثبت را می‌توان برای بررسی با تأخیر در یخچال قرار داد.

جلسه دوم:

۱) تمام لوله‌ها را از انکوباتور خارج کرده و آن‌ها را از نظر تغییرات رنگ بررسی کنید. نتایج تمام براث‌ها و همچنین نتایج مثبت سریع و کُند آگار را ثبت کنید. تمام براث‌ها و همچنین نمونه‌های آگار مثبت را در مکان مشخص برای استریل کردن قرار دهید.

۲) نمونه‌های آگار منفی را به انکوباتور بازگردانید. از آن‌ها انتظار داریم تا روز ششم رنگ صورتی ایجاد نمایند (لوله‌های منفی را پیش از گرمخانه‌گذاری تا ۶ روز نبایستی به عنوان نتیجه منفی در نظر گرفت.)

۳) نتایج روزانه را ثبت کنید و با کمک جدول تفسیر، نتایج را بررسی کنید.

کار عملی ۳: تفسیر نتایج

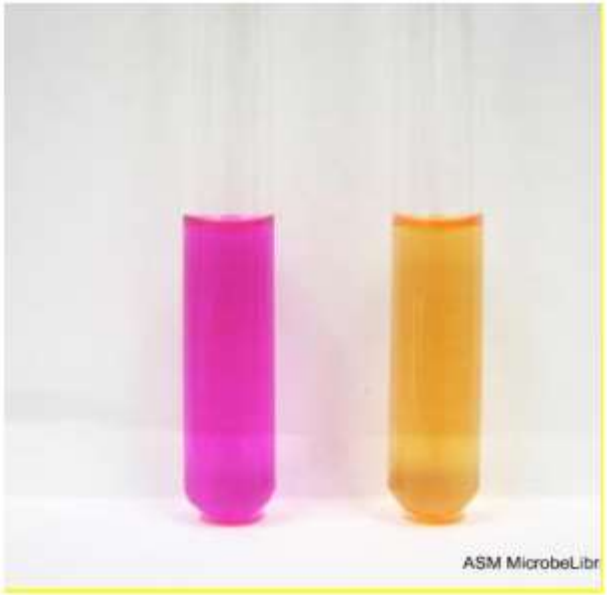
نتایج تست هیدرولیز اوره و تفسیر آن‌ها

جدول نتایج		
نتیجه	**تفسیر**	**علامت**
صورتی	هیدرولیز سریع اوره؛ تولید قدرتمند اوره‌آز	+
نارنجی یا زرد	عدم هیدرولیز اوره؛ باکتری اوره‌آز تولید نمی‌کند یا نمی‌تواند در براث زندگی کند.	–

در لوله‌های اوره براث، ایجاد رنگ قرمز نشان‌دهنده‌ی واکنش قلیایی و هیدرولیز اوره است. امّا در اوره آگار وضعیت به این صورت است که:

- سوش‌های اوره‌آز مثبت سریع: ایجاد رنگ قرمز در تمام محیط
- سوش‌های اوره‌آز مثبت ضعیف: ایجاد رنگ قرمز ابتدا فقط در سطح و به‌تدریج در عمق لوله
- سوش‌های اوره‌آز منفی: محیط کشت به رنگ اولیه خود باقی می‌ماند.

نتایج تست اوره‌آز آگار: لوله‌های اوره‌آز آگار شیب‌دار از چپ به راست عبارت‌اند از: کنترل، تلقیح شده با *Proteus mirabilis* (اوره‌آز مثبت سریع)، *Klebsiella pneumoniae* (اوره‌آز مثبت تأخیری) و اشرشیا کلی (اوره‌آز منفی). تمام لوله‌ها به مدت ۱۶ ساعت در دمای ۳۷ °C گرمخانه‌گذاری شدند.



نتایج تست اوره‌آز براث: لوله‌های اوره‌آز براث از چپ به راست با باکتری‌های *Proteus mirabilis* (اوره‌آز مثبت)، و اشرشیا کلی (اوره‌آز منفی) تلقیح شده‌اند. تمام لوله‌ها به مدت ۱۶ ساعت در دمای ۳۷ °C گرمخانه‌گذاری شدند.

نکات:

- کیت‌های اوره‌آز سریع به صورت تجاری در بازار موجود هستند.
- نتایج مطمئن همچنین با تلقیح ۰/۵ میلی‌لیتر از اوره براث با یک لوپ پر از باکتری عملی می‌باشد.
- به تفاوت محیط کشت اوره براث و اوره آگار توجه شود.
- میکروارگانیسم‌هایی که اوره را سریع هیدرولیز می کنند همانند پروتئوس ولگاریس، در مدت کمتر از ۱ یا ۲ ساعت واکنش مثبت می‌دهند و سویه‌هایی که کمتر فعال‌اند، به گرمخانه‌گذاری ۳ روز یا بیشتر نیاز دارند.
- باکتری هلیکوباکتر پیلوری که از نظر کلینیکی اهمیت دارد، نیز اوره‌آز مثبت 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