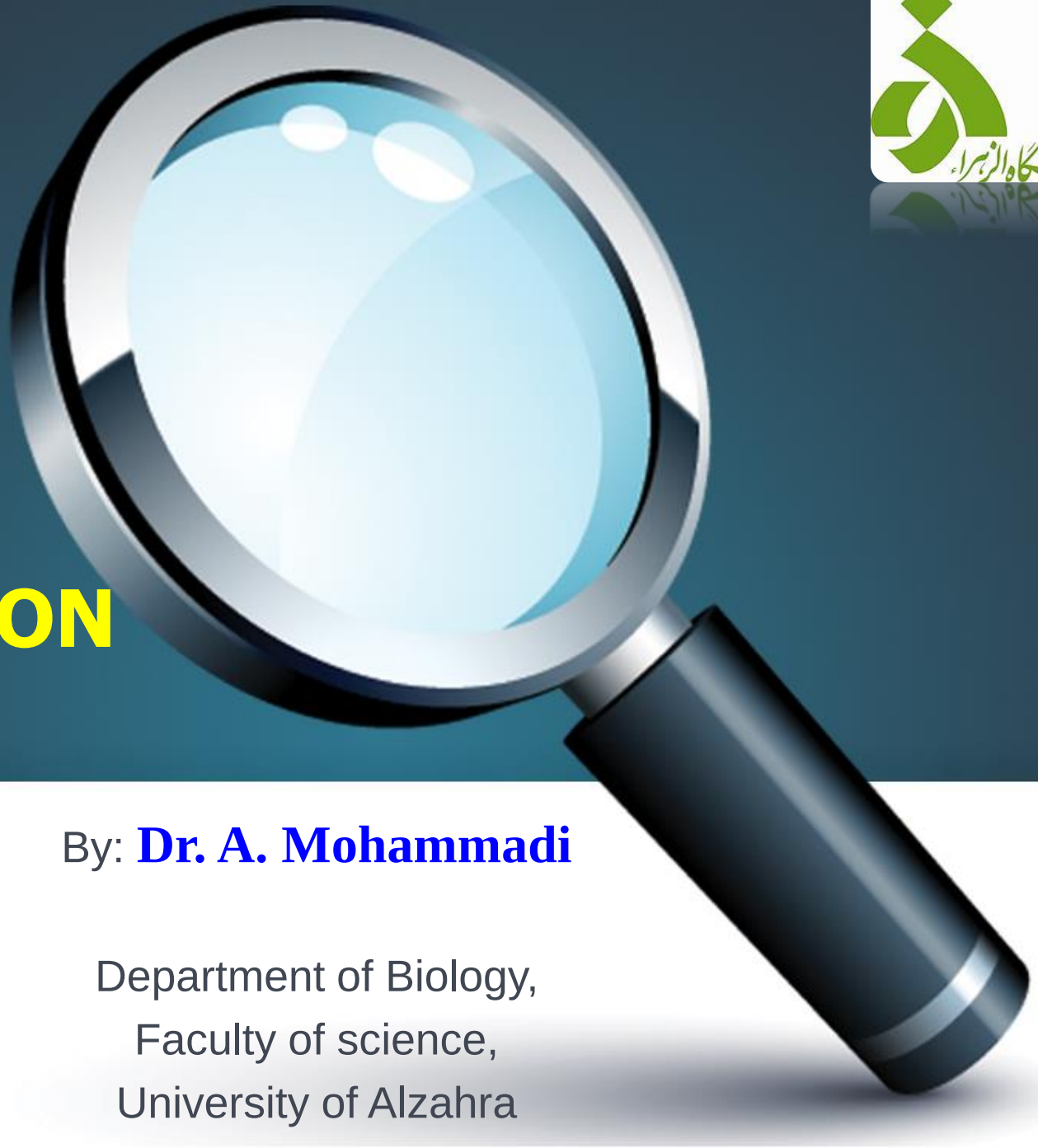
به نام خدا

GENERAL REVISION

MICROBIOLOGY LAB



By: **Dr. A. Mohammadi**

Department of Biology,
Faculty of science,
University of Alzahra

OF (**Oxidative Fermentative**)

تست اکسایش–تخمیر

کاربرد: تست اکسایش-تخمیر[1](OF) برای افتراق باکتری‌ها با توجه به قابلیت اکسید یا تخمیر برخی قندها استفاده می‌شود. این آزمایش به جدایی احتمالی اعضاء انتروباکتریاسه تخمیر کننده از سودوموناس و بوردتلا اکسید کننده و باکتری‌های غیر واکنشی همچون آلکالیژنز و موراکسلا[2] کمک می کند.

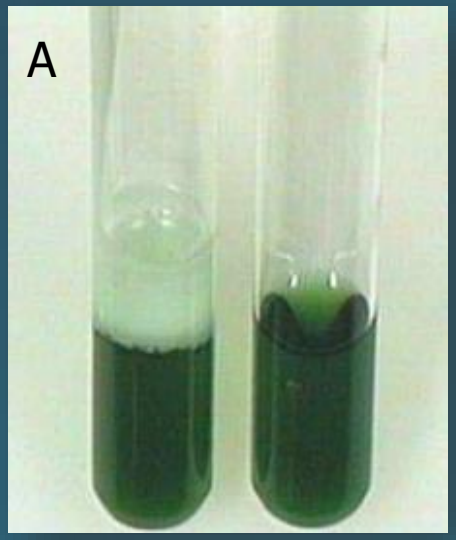
باکتری‌هایی که قادر به تخمیر کربوهیدرات و یا تخمیر و اکسیداسیون کربوهیدرات هستند در هر دو لوله (مسدود شده و باز)، اسیدهای آلی تولید کرده و هر دو لوله به رنگ زرد ظاهر می‌شوند. باکتری‌هایی که قادر به اکسیداسیون (تنفس هوازی) هستند تنها در لوله‌ای که برای هوا باز است، اسید تولید خواهند کرد. در چنین لوله‌ای رنگ زرد (تا حدی زرد) ظاهر خواهد شد درحالی‌که لوله مسدود شده با روغن، به رنگ سبز و یا آبی باقی خواهد ماند. تخمیرکنندگان کند یا ضعیف هر دو لوله را در قسمت بالا تا حدی زرد می‌کنند. باکتری‌هایی که توانایی مصرف قند را ندارند، یا رنگی تولید نمی‌کنند یا به دلیل تولید محصولات قلیایی ناشی از تجزیه اسیدآمینه، محیط را آبی می‌کنند.

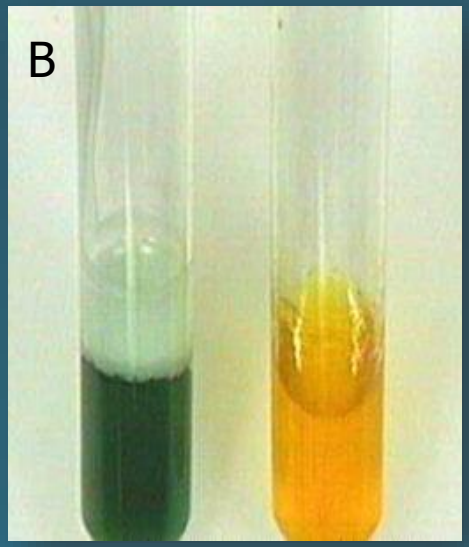
اگر در هر دو لوله (با پارافین و بدون پارافین) پس از ۴۸ -۲۴ ساعت کشت باکتری، رنگ سبز محیط کشت به رنگ زرد تبدیل گردد باکتری مورد نظر از نوع بی‌هوازی اختیاری می‌باشد چون باکتری توانسته است که در هردو شرایط با اکسیژن و بدون اکسیژن رشد کرده و گلوکز را شکسته و تبدیل به اسید نماید؛ اما اگر در لوله بدون پارافین اسید تولید شود باکتری تنها می‌تواند گلوکز را در شرایط هوازی بشکند بنابراین باکتری هوازی اجباری است، اگر تغییر رنگ (سبز به زرد) فقط در لوله مسدود شده مشاهده شود، باکتری بی‌هوازی اجباری است.

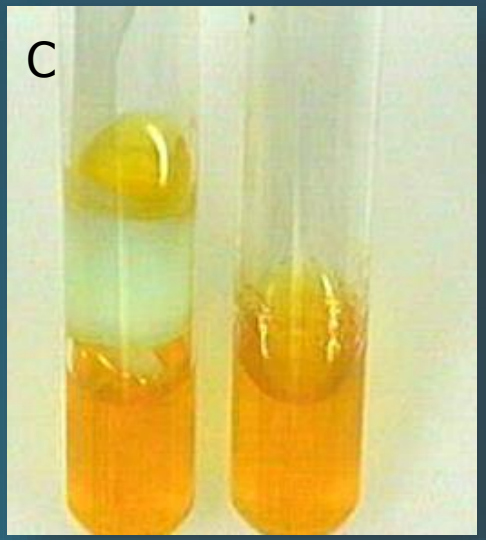
محیط OF هوگ و لیفسون[1] دارای نسبت بالایی از قند به پپتون[2] است تا احتمال اینکه محصولات قلیایی حاصله از مصرف پپتون بخواهد اسیدهای ضعیف تولید شده توسط اکسیداسیون کربوهیدرات را خنثی نماید، کاهش یابد. بُرمو تیمول بلو که در pH 6.0، زرد و در pH 7.1، سبز است به عنوان معرف pH به محیط افزوده شده است. غلظت کم آگار محیط موجب نیمه جامد شدن آن می‌شود تا بدین طریق بتوان تحرک باکتری را شناسایی کرد.

محیط با قند گلوکز، لاکتوز، ساکاروز، مالتوز، مانیتول، یا گزیلوز به صورت بدون شیب تهیه می‌شود. دو لوله از محیط کشت دارای قند خاص چندین بار با باکتری مورد آزمون به صورت عمقی تلقیح[3] می‌شود. پس از تلقیح، یکی از لوله‌ها با لایه‌ای از روغن معدنی استریل یا پارافین مذاب پوشانده و مسدود می‌شود تا شرایط رشد بی‌هوازی و تخمیر فراهم گردد (شکل). لوله دیگر را بدون پوشش و به صورت باز قرار می‌دهیم تا شرایط رشد هوازی و اکسیداسیون فراهم شود. (توجه: لوله‌های حاوی محیط OF بایستی پیش از تلقیح در آب جوش حرارت داده شده و سپس سرد شود. این کار باعث حذف اکسیژن از محیط و ایجاد یک محیط بی‌هوازی در تمام لوله‌ها می‌شود. لوله‌های پوشش داده شده با روغن بی‌هوازی باقی خواهد ماند، درحالی‌که لوله‌های بدون پوشش به دلیل ورود اکسیژن به آن‌ها، هوازی خواهند شد).

Oxidation Fermentation medium







A. Green in both tubes indicates that the organism cannot metabolize glucose.

B. Oxidative metabolism indicated by yellow in the aerobic tube and green in the anaerobic tube.

C. Both tubes yellow indicate fermentation only

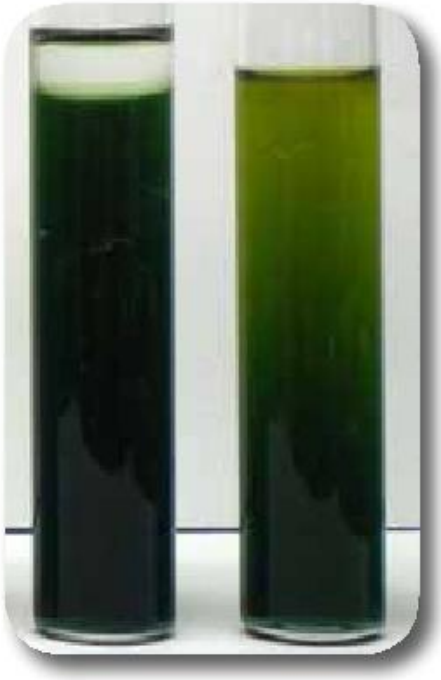
3 Quality Control Organisms[6]

Gram negative rods			
Positive control	Oxidation Fermentation	*Pseudomonas aeruginosa* *Escherichia coli*	NCTC 10662 NCTC 10418
Negative control	No action	*Acinetobacter lwoffii*	NCTC 5866
Gram positive cocci			
Positive control	Oxidation Fermentation	*Micrococcus luteus* *Staphylococcus aureus*	NCTC 2665 NCTC 6571
Negative control	No action	OF basal medium without carbohydrate	-

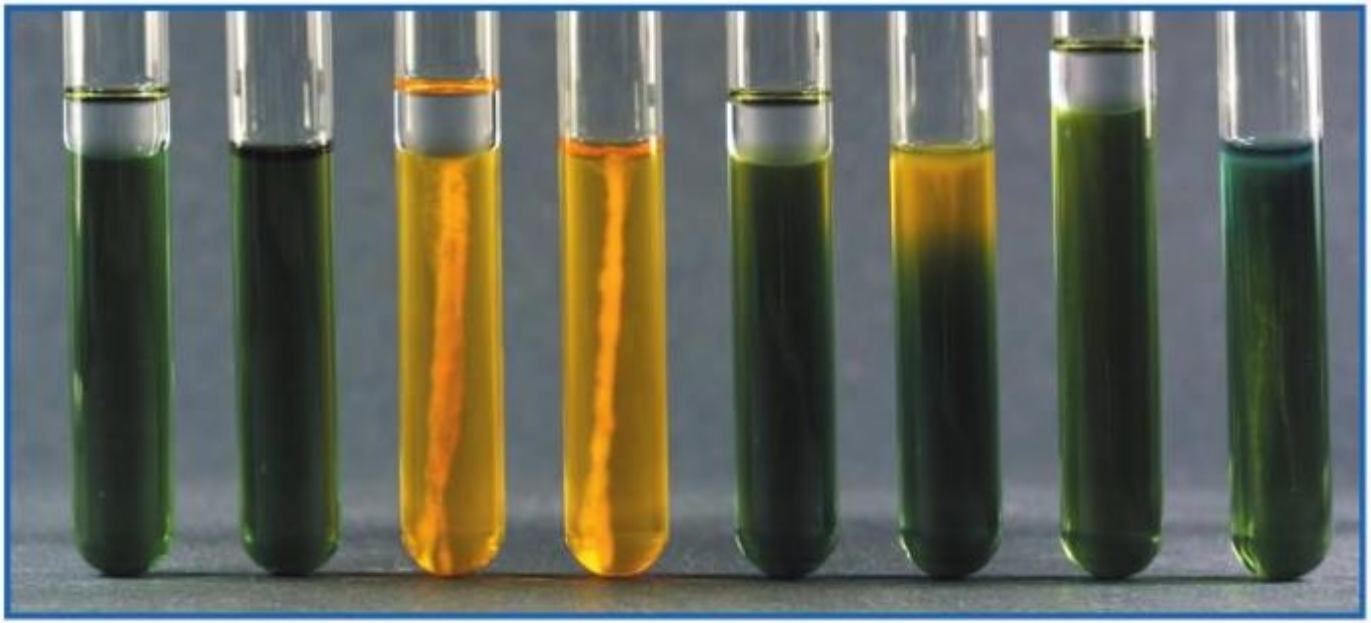
Note: Quality control should be carried out on every batch of medium.

Microorganism	Growth	Remarks
Enterococcus faecalis ATCC 29212	Poor	-
Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853	Good	O / F: + / -
Escherichia coli ATCC 25922	Good	O / F: + / + Yellow medium
Salmonella typhimurium ATCC 14028	Good	O / F: + / + Yellow medium

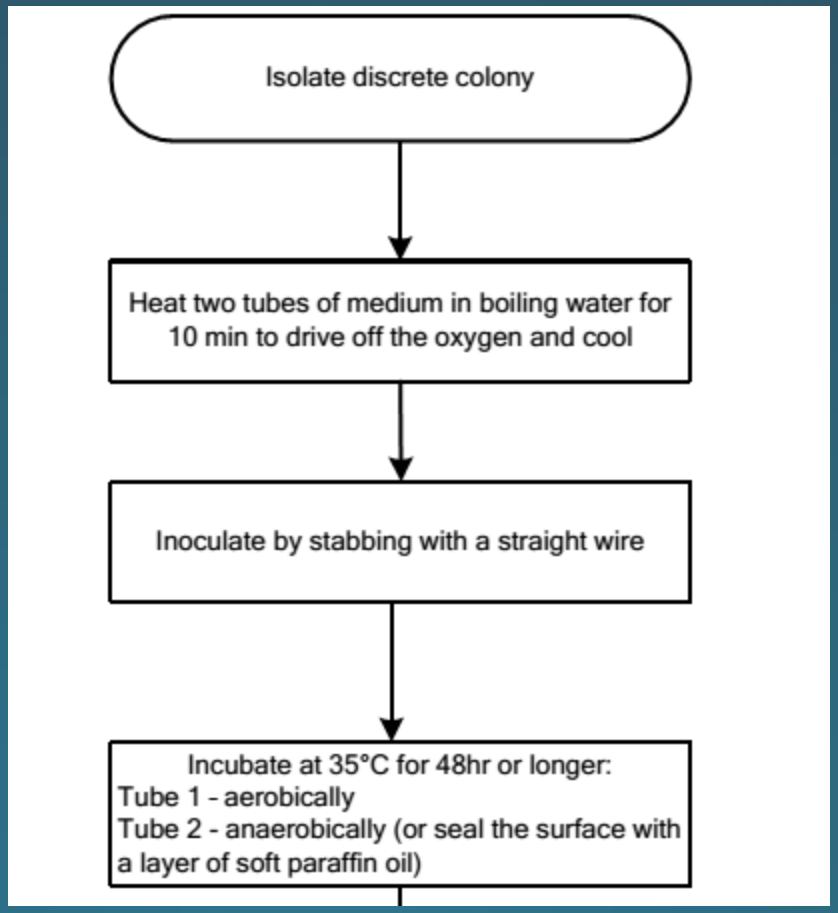
Left: *Escherichia coli* ATCC 25922
Right: *Salmonella typhimurium* ATCC 14028

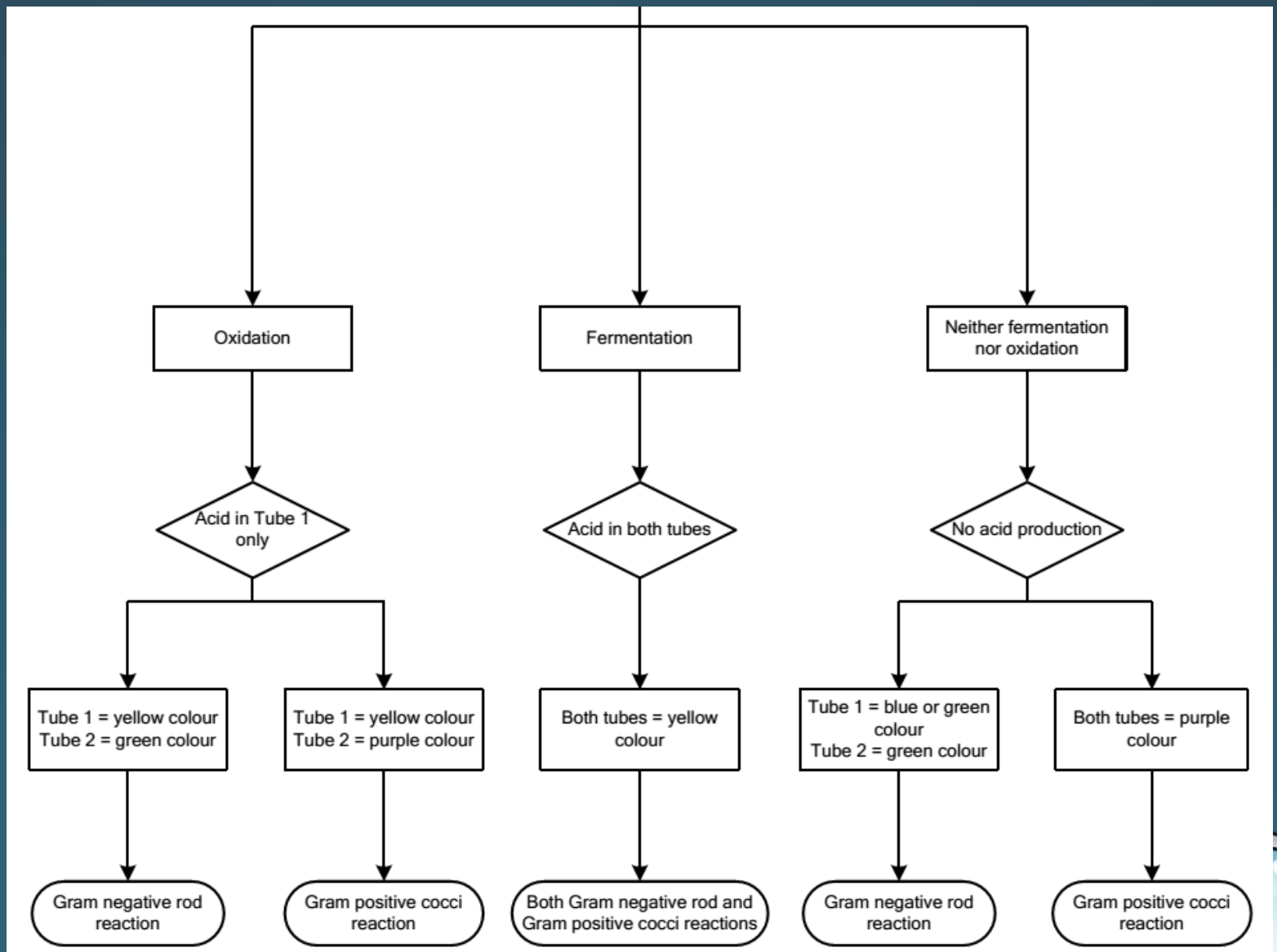


Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853



تست اکسایش-تخمیر: این جفت لوله‌ها نشان‌دهنده سه نتیجه احتمالی آزمایش اکسایش-تخمیر می‌باشند. هر جفت شامل یک لوله مسدود شده با پوششی از روغن معدنی و یک لوله بدون پوشش (باز) است. این پوشش با ممانعت از ورود اکسیژن هوا به محیط یک محیط نامناسب برای اکسیداسیون ایجاد می‌کند. نتیجه این است که یک باکتری تخمیرکننده هر دو لوله را زرد می‌کند درحالی‌که باکتری دیگر که فقط قادر به اکسیداسیون گلوکز است تنها می‌تواند قسمت اکسیژن‌دار لوله باز را زرد کند. باکتری که نتواند گلوکز را به هر طریقی مصرف کند تغییری در رنگ محیط ایجاد نمی‌کند یا اینکه به علت تولید محصولات قلیایی از تجزیه پروتئین آن را به رنگ سبز-آبی درمی‌آورد. از چپ به راست، اولین جفت از لوله‌ها به نمونه‌های کنترل تلقیح نشده اختصاص دارد. جفت دوم با میکروارگانیسمی تلقیح شده که قادر به هر دو واکنش اکسایش و تخمیر گلوکز (OF) است. متأسفانه، این شناسایی نمی‌تواند به سادگی با مشاهده چشمی لوله‌ها انجام شود، برای نمونه یک باکتری تخمیرکننده (F) دقیقاً همانند یک باکتری قادر به انجام هر دو واکنش اکسیداسیون و تخمیر (OF) است؛ بنابراین، هنگامی که هر دو لوله زرد هستند این‌گونه فرض می‌شود که باکتری یا (F) و یا (OF) است. جفت سوم از لوله‌ها با یک باکتری غیرتخمیرکننده گلوکز تلقیح شده است که تنها قادر به اکسیداسیون است. توجه داشته باشید که زردی تنها در قسمت اکسیژن‌دار لوله بدون پوشش ظاهر شده است. چهارمین جفت با میکروارگانیسمی تلقیح شده که قادر به مصرف گلوکز نیست. توجه داشته باشید که تشکیل رنگ آبی در قسمت اکسیژن‌دار لوله بدون پوشش نشان می‌دهد که باکتری غیرساکارولیتیک بوده[1] (N) و یک هوازی سخت است.


Isolate discrete colony
Heat two tubes of medium in boiling water for 10 min to drive off the oxygen and cool
Inoculate by stabbing with a straight wire
Incubate at 35°C for 48hr or longer:
Tube 1 - aerobically
Tube 2 - anaerobically (or seal the surface with a layer of soft paraffin oil)


Oxidation
Fermentation
Neither fermentation nor oxidation
Acid in Tube 1 only
Acid in both tubes
No acid production
Tube 1 = yellow colour
Tube 2 = green colour
Tube 1 = yellow colour
Tube 2 = purple colour
Both tubes = yellow colour
Tube 1 = blue or green colour
Tube 2 = green colour
Both tubes = purple colour
Gram negative rod reaction
Gram positive cocci reaction
Both Gram negative rod and Gram positive cocci reactions
Gram negative rod reaction
Gram positive cocci reaction

OF (**Oxidative Fermentative**)

کار عملی:

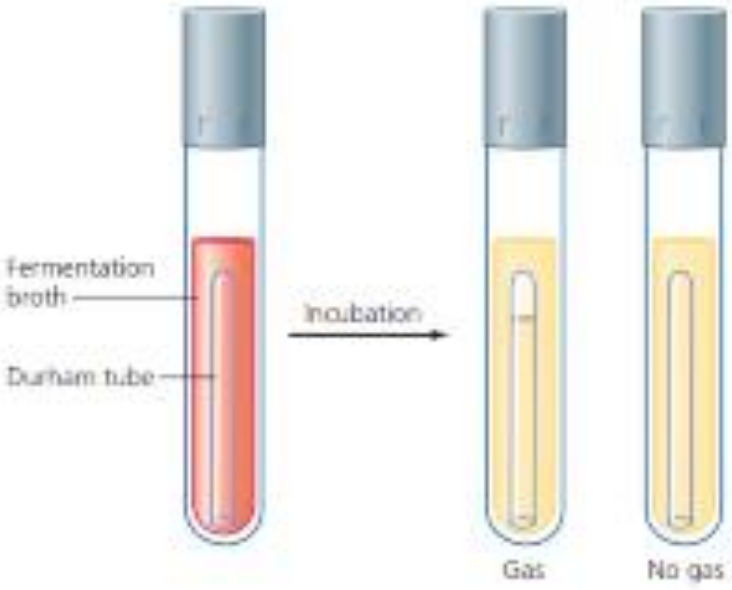
هشت لوله دارای محیط OF مورد نیاز خواهد بود؛ شش عدد برای تلقیح (برای هر باکتری، دو عدد) و دو عدد برای کنترل. یک لوله از هر جفت به منظور حفظ محیط بی‌هوازی و تخمیر با پوششی از روغن معدنی مسدود می‌شود. شما در این آزمایش نمی‌توانید حرکت باکتری‌ها را مشاهده کنید البته در مطالب بعدی با آزمایشی در خصوص حرکت باکتری آشنا خواهید شد. برای کسب بهترین نتایج بهتر است ماده تلقیح بیشتری برداشته و در هر لوله چندین بار تلقیح را انجام دهید. ضمن اینکه به به‌کارگیری پی‌پت‌های استریل برای افزودن روغن معدنی توجه داشته باشید.

OF (Oxidative Fermentative)

فنل رد براث

کاربرد: محیط فنل رد براث (PR) [1]جهت افتراق اعضاء انتروباکتریاسه و تمایز آن‌ها از سایر باکتری‌های گرم منفی کاربرد دارد.

توانایی تخمیری باکتری‌ها معیاری با ارزش برای شناسایی آن‌هاست. یک محیط پایه برای تعیین واکنش‌های تخمیری میکروارگانیسم‌ها باید بتواند رشد میکروب مورد آزمایش را تأمین کند و اجازه تخمیر کربوهیدرات‌ها را به میکروب بدهد. فنل رد (PR) براث یک محیط تست افتراقی دارای یک کربوهیدرات است. ضمن اینکه در این محیط، پپتون و فنل رِد به عنوان معرف pH قرار دارد. فنل رد در pH زیر ۶/۸ به رنگ زرد، pH بالای ۷/۴ به رنگ صورتی تا قرمز کم‌رنگ و در محدوده بین این دو pH به رنگ قرمز است. در طول آماده‌سازی این محیط، pH حدود ۷/۳ تنظیم می‌شود لذا قرمزرنگ است. در این محیط همچنین یک لوله دُرهام[۲] معکوس به عنوان شاخص تولید گاز به هر لوله افزوده می‌شود.



اسید تولیدشده از تخمیر کربوهیدرات، pH را به زیر محدوده خنثی برده و موجب زرد شدن محیط می‌شود البته در برخی موارد تولید اسید با تولید یک گاز (CO_2) همراه خواهد بود که به صورت حباب‌هایی دیده می‌شود (شکل). دِآمیناسیون اسیدآمینه پپتون موجب تولید آمونیاک (NH_3) و بالا رفتن pH و در نتیجه صورتی شدن براث می‌شود. همچنین گاز حاصل از تخمیر با کمک یک لوله کوچک وارونه به نام دُرهام به صورت یک حباب، شناسایی و جمع‌آوری می‌شود.

کشت‌هایی که قادر به تخمیر یک ماده کربوهیدراتی نیستند، رنگ معرف را تغییر نمی‌دهند و لوله‌ها به رنگ قرمز ظاهر خواهند شد؛ در چنین وضعیتی گاز تولید نخواهد شد. این یک واکنش منفی محسوب می‌شود.

Durham Sugar Tube Fermentation (Glucose, Lactose, Mannitol)

Contains: single carbohydrate peptone broth with durham tube for gas collection, Phenol red pH indicator: alkaline pH = red, acidic pH = yellow

Discriminates the ability to ferment a single carbohydrate (glucose, lactose, or mannitol) into acid products (e.g. pyruvic acid) or acid plus gas

Results: Red = inert, negative for fermentation of specified carbohydrate

Yellow = positive for fermentation of carbohydrate to acid products

Yellow with bubble = positive for fermentation of carbohydrate to acid + gas

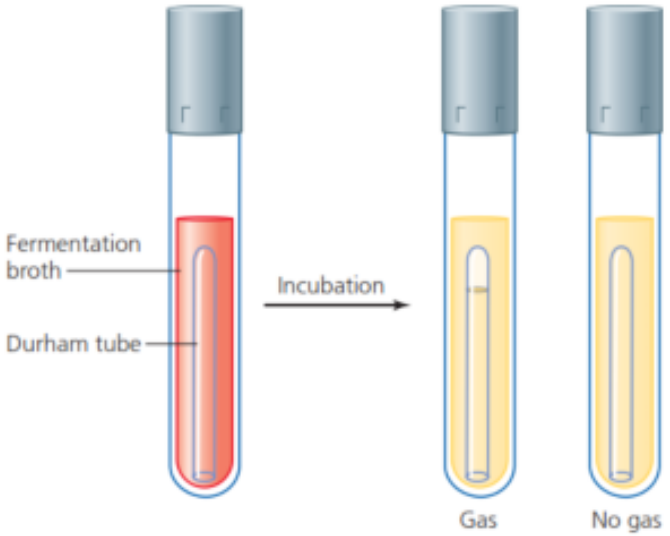
Durham Tubes
Tube on left is positive;
tube on right is negative.

نتایج فنل رد براث گلوکز: از چپ به راست، نتایج عبارت است از تولید اسید و گاز (A/G)، تولید اسید بدون گاز (A/-)، لوله تلقیح نشده کنترل برای مقایسه، بدون واکنش (-/-) و شرایط قلیایی در اثر تجزیه پپتون (K).

Negative

Acid plus gas

Acid



عدم تخمیر کربوهیدرات توسط برخی از موجودات نبایستی به عنوان عدم رشد آن‌ها تلقی شود. موجودات در چنین وضعیتی از دیگر مواد مغذی موجود در محیط به عنوان منابع انرژی استفاده می‌کنند. در میان این مواد مغذی، پپتون‌ها قرار دارند که در محیط نوترینت براث موجود هستند. پپتون‌ها توسط آنزیم‌های میکروبی به اسیدهای آمینه تجزیه می‌شوند که به نوبه خود توسط واکنش آنزیمی دآمیناسیون اکسیداتیو به اسیدهای کتوآمینو تبدیل می‌شوند. چنین ترکیباتی در مرحله بعد از طریق چرخه کربس برای تولید انرژی متابولیزه می‌شوند. این واکنش‌ها آمونیاک آزاد می‌کنند که موجب تجمع هیدروکسید آمونیوم (NH_4OH) و قلیایی شدن محیط می‌شوند. هنگامی که این اتفاق می‌افتد، فنل رِد در محیط در حال حاضر قلیایی به رنگ قرمز پُررنگ تبدیل می‌شود.

کار عملی:

در این آزمایش بایستی براث‌های PR را با چهار باکتری تلقیح کنید تا قابلیت تخمیر آن‌ها را مشخص کنید. با استفاده از جدول مربوطه می‌توانید نتایج را تجزیه و تحلیل کنید. توجه داشته باشید که برای مقایسه رنگ محیط کشت‌ها بایستی از محیط تلقیح نشده به عنوان کنترل استفاده کنید.

کار عملی ۱: تست OF

مواد و ابزار مورد نیاز:

- هشت لوله دارای OF گلوکز
- روغن معدنی استریل
- چندین پی‌پت استریل برای انتقال

کشت آگار شیب‌دار یا کشت مایع از باکتری‌های:

Escherichia coli

Pseudomonas aeruginosa (BSL-2)

Alcaligenes faecalis (BSL-2)

کار عملی ۱: تست OF

جلسه نخست:

۱) هشت لوله OF را بردارید. نام نمونه یا باکتری مورد آزمایش، نام خودتان و تاریخ را بر شش عدد آن (در سه جفت) درج کنید. دو لوله باقی‌مانده را کنترل برچسب‌گذاری کنید.

۲) هر کدام از لوله‌ها را با مقدار مناسبی از باکتری‌ها به صورت عمقی (تا حدود ۱ سانتی‌متری کف لوله) و چندین بار تلقیح کنید. نمونه‌های کنترل را تلقیح نکنید.

۳) در شرایط استریل، سطح یکی از جفت لوله‌های مورد آزمون و کنترل را با ۳-۴ میلی‌متر روغن استریل بپوشانید.

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

جلسه دوم:

۱) تغییرات رنگی هر یک از لوله‌ها را بررسی کنید ضمن اینکه آن‌ها را با نمونه‌های کنترل مقایسه کنید.

۲) نتایج به دست آمده را ثبت کنید.

کار عملی ۱: تفسیر نتایج

نتایج تست OF و تفسیر آن‌ها

جدول نتایج			
مسدود با روغن	لوله‌های باز	تفسیر	علامت
سبز یا آبی	هر مقدار زرد	اکسیداسیون	O
کاملاً زرد	کاملاً زرد	اکسیداسیون و تخمیر یا فقط تخمیر	O-F or F
کمی زرد در بالا	کمی زرد در بالا	اکسیداسیون و تخمیر آرام یا فقط تخمیر آرام	O-F or F
سبز یا آبی	سبز یا آبی	عدم متابولیسم قند؛ میکروارگانیسم قادر به هیدرولیز کربوهیدرات نیست.	N

افزودن لایه‌ای از روغن معدنی: در شرایط استریل روغن استریل را به محیط‌های ذکر شده اضافه کنید. ظروف را به صورت شیب‌دار نگه داشته و به آرامی ۳-۴ میلی‌متر روغن را اضافه کنید تا حباب ایجاد نشود. توجه داشته باشید که از پی‌پت استریل استفاده کنید.

کار عملی ۲: تست PR

مواد و ابزار مورد نیاز:

- پنج محیط فنل رد براث گلوکز همراه لوله دُرهام
- پنج محیط فنل رد براث لاکتوز همراه لوله دُرهام
- پنج محیط فنل رد براث سوکروز همراه لوله دُرهام
- پنج محیط فنل رد براث پایه همراه لوله دُرهام
- کشت‌های تازه از باکتری‌های:

Escherichia coli
Pseudomonas aeruginosa (BSL-2)
Proteus vulgaris (BSL-2)
Enterococcus faecalis (BSL-2)

کار عملی ۲: تست PR

جلسه نخست:

۱) پنج لوله از براث‌های ذکر شده را آماده کنید. نام نمونه یا باکتری مورد آزمایش، نام خودتان، نام محیط و تاریخ را بر چهار عدد آن درج کنید. لوله باقی‌مانده را کنترل برچسب‌گذاری کنید.

۲) یکی از لوله‌های هر براث را با باکتری مورد آزمون تلقیح کنید. نمونه‌های کنترل را تلقیح نکنید.

۳) تمام لوله‌ها را در دمای ۳۵ ± ۲ °C، به مدت ۴۸ ساعت گرمخانه‌گذاری کنید.

جلسه دوم:

با کمک لوله‌های کنترل تلقیح نشده و جدول مربوطه، تمام لوله‌ها را از نظر تغییرات رنگی بررسی و مقایسه کنید. نتایج به دست آمده را ثبت کنید.

کار عملی ۲: تفسیر تست PR

نتایج تست و تفسیر آن

نتایج	تفسیر	شناسایی
براث زرد، حباب در لوله	تخمیر با تولید محصولات پایانی گاز و اسید	A/G
براث زرد، نبود حباب در لوله	تخمیر با تولید محصول پایانی اسید، عدم تولید گاز	A/-
براث قرمز، نبود حباب در لوله	عدم تخمیر	-/-
براث صورتی، نبود حباب در لوله	تجزیه پپتون؛ محصولات پایانی قلیایی	K

Controls

Sugar	REACTION	
	Acid	***Acid w/Gas***
Dextrose	*S. aureus*	*E. coli*
Sucrose	*S. aureus*	*K. pneumoniae*
Lactose	*S. aureus*	*E. coli*

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