



دانشگاه اصفهان

دانشکده علوم و فناوری های زیستی، گروه زیست شناسی سلولی مولکولی و میکروبیولوژی،
آزمایشگاه میکروبیولوژی



روش جداسازی ، شمارش و شناسایی استرپتوکوک های گروه D لانسفید :

مقدمه :

استرپتوکوک ها باکتری هایی هستند کروی شکل، گرم مثبت به قطر ۱-۱/۸ میکرون و تغییرات شکلی گاهی در اثر تغییرات محیط کشت دیده می شود. استرپتوکوک ها به طور مشخص در سطوح موازی تقسیم دو تایی پیدا می کنند و پس از تقسیم از هم جدا نمی شوند بلکه دنبال هم قرار گرفته و زنجیره ای را تشکیل می دهند.

چون این کوکوس ها اکثرا در روده وجود دارند به آن ها انتروکوک می گویند. این گروه مقاوم ترین استرپتوکوک ها نسبت به آنتی بیوتیک ها می باشد. برخی بتاهمولیتیک و عده ای نیز دارای همولیز آلفا یا گاما می باشند. دارای آنتی ژن گروه D می باشند.

استرپتوکوک های این گروه عبارتند از :

استرپتوکوکوس فکالیس، استرپتوکوکوس فسیوم و استرپتوکوکوس دورانس که در روده انسان و حیوانات خونگرم زندگی می کنند.

استرپتوکوکوس آویوم و استرپتوکوکوس گالینارم که در روده مرغ، خروس، جوجه و غیره وجود دارد.

استرپتوکوکوس بویس که در روده گاو و استرپتوکوکوس اکینوس که در روده اسب مشاهده می گردند.

➤ انتروکوک ها بر خلاف سایر استرپتوکوک ها قادرند در حرارت ۴۵ تا ۵۰ درجه سانتی گراد رشد نمایند.

➤ حرارت ۶۰ درجه نیز ساعت تحمل کنند.

➤ در حضور ۶/۵٪ کلورسدیم، رشد کنند.

➤ اغلب این باکتری ها در اثر پاستوریزاسیون از بین نرفته و بعضی از انواع آن ها می توانند در دمای کم حدود ۲ درجه سانتی گراد نیز رشد کند و بیش از کلی فرم ها نسبت به شرایط انجماد مقاوم می باشند.

➤ به عنوان عامل فساد در گوشت های مختلف، فراورده های لبنی، سبزیجات و مرباجات و مواد غذایی دیگر دخالت دارند. انتروکوک ها ممکن است گه گاهی باعث بروز مسمومیت های غذایی غیر متداول گردند.

مواد و وسایل مورد نیاز:

1. نمونه ماده غذایی (شیر)
 2. ارلن حاوی ۹۰ میلی لیتر محلول رینگر استریل یک چهارم غلظت
 3. لوله آزمایش حاوی ۹ میلی لیتر محلول رینگر استریل
 4. پی پت استریل
 5. محیط کشت KF استرپتوکوکوس آگار
 6. محیط کشت آگار مغذی به صورت اسلنت
 7. محیط کشت تریپتون . سوی برات
- 1 محیط کشت برین - هارت برات
 - 2 محیط کشت برین هارت برات + 6.5% NaCl
 - 3 بن ماری
 - 4 آب اکسیژنه ۳٪
 - 5 محلول های رنگ آمیزی گرم
 - 6 میله ی شیشه ای سرکج
 - 7 بشر حاوی الکل

روش آزمایش:

- ▶ جهت انجام آزمایش ابتدا به کمک پی پت استریل مقدار ۱۰ میلی لیتر از نمونه ماده غذایی (شیر) را به یک ارلن که حاوی ۹۰ میلی لیتر محلول رینگر است اضافه کنید.
- ▶ سپس به کمک لوله های آزمایش حاوی ۹ میلی لیتر محلول رینگر تهیه رقت را تا رقت مورد نظر ادامه دهید.
- ▶ سپس از یکی از رقت های تهیه شده مقدار ۰/۱ میلی لیتر را بر روی محیط KF استرپتوکوکوس آگار اضافه کرده و به کمک میله ی شیشه ای سرکج نمونه اضافه شده را بر روی محیط فوق پخش کنید.
- ▶ محیط را به مدت ۲۴ الی ۴۸ ساعت در داخل انکوباتور (گرمخانه) ۳۷ درجه سانتی گراد قرار دهید و سپس بعد از طی مدت زمان اتوگذاری اقدام به شمارش کلنی های باکتری استرپتوکوکوس بر روی محیط فوق کنید.

محیط کشت KF استرپتوکوکوس آگار برای تعیین شمارش استرپتوکوکوس های موجود در مواد غذایی به کار می رود.

دارای قند مالتوز و لاکتوز و همچنین معرف ۲-۳-۵ تری فنیل تترازولیوم کلراید ۰.۱/۰.۱٪ (T.T.C) می باشد. قند های مالتوز و لاکتوز توسط باکتری متابولیز شده و اسید تولید می شود که موجب تسریع رشد این باکتری ها می گردد.

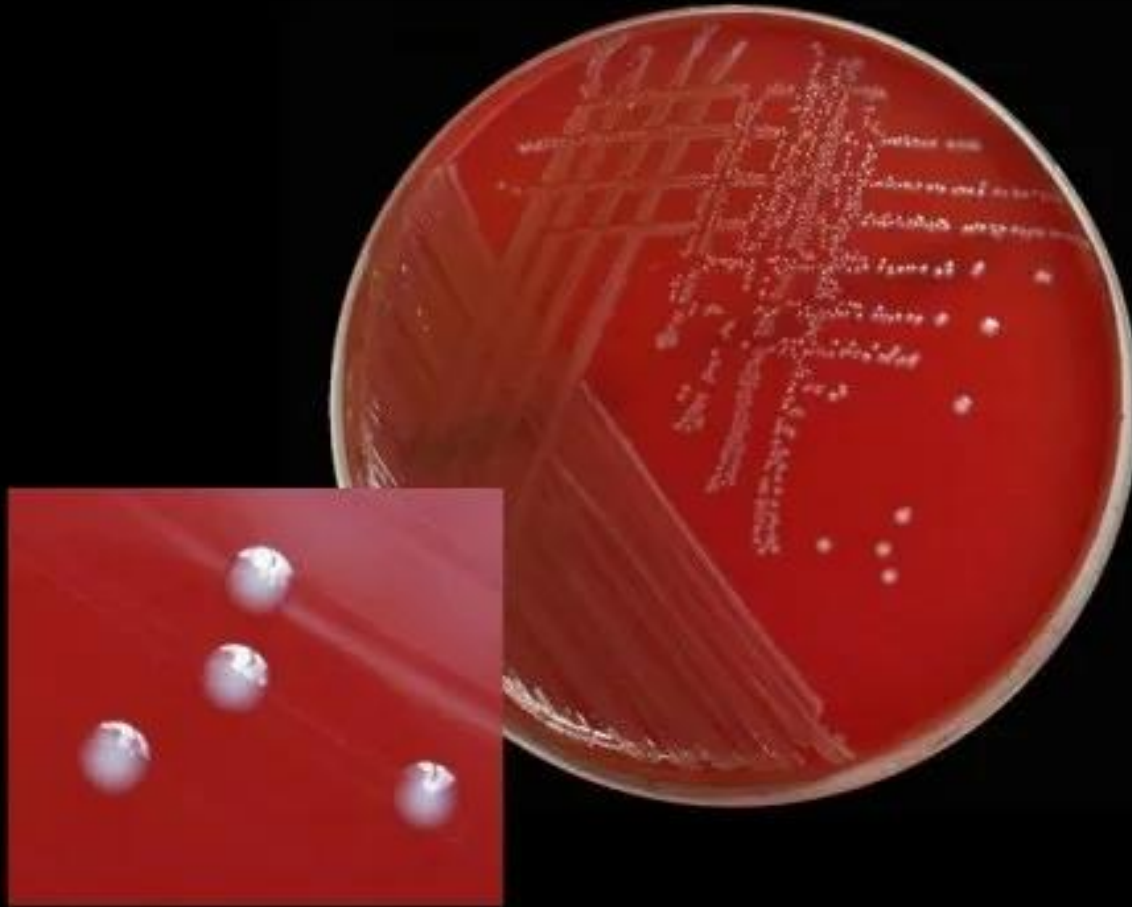
رشد میکروارگانیسم های نامطلوب تا حدی زیادی بوسیله سدیم آزید متوقف می شوند.

تشکیل اسید با اندیکاتور بر موکزول ارغوانی نشان داده می شود که رنگ آن زرد می شود. استرپتوکوک ها ماده T.T.C را احیا کرده و رنگ قرمز تولید می کنند. و به همین دلیل کلنی های قرمز رنگ بر روی محیط کشت دیده می شود.

با توجه به رقت مورد آزمایش تعداد کل باکتری های موجود در هر میلی لیتر از نمونه ماده غذایی را می توان بدست آورد.



تهیه کننده : سهیلا عباسی



Hem: N.

Enterococcus faecalis

تهیه کننده : سهیلا عباسی

➡ بعد از رشد کلنی باکتری ها بر روی محیط کشت از یکی از کلنی های رشد کرده اقدام به عمل رنگ آمیزی به روش گرم کنید. در صورتی که باکتری های کروی شکل گرم مثبت را در زیر میکروسکپ مشاهده کردید جهت شناسایی دقیق آن ها و تعیین استرپتوکوکوس ها گروه D لانسفید اقدام به انجام تست های شناسایی زیر کنید.

1. تست کاتالاز

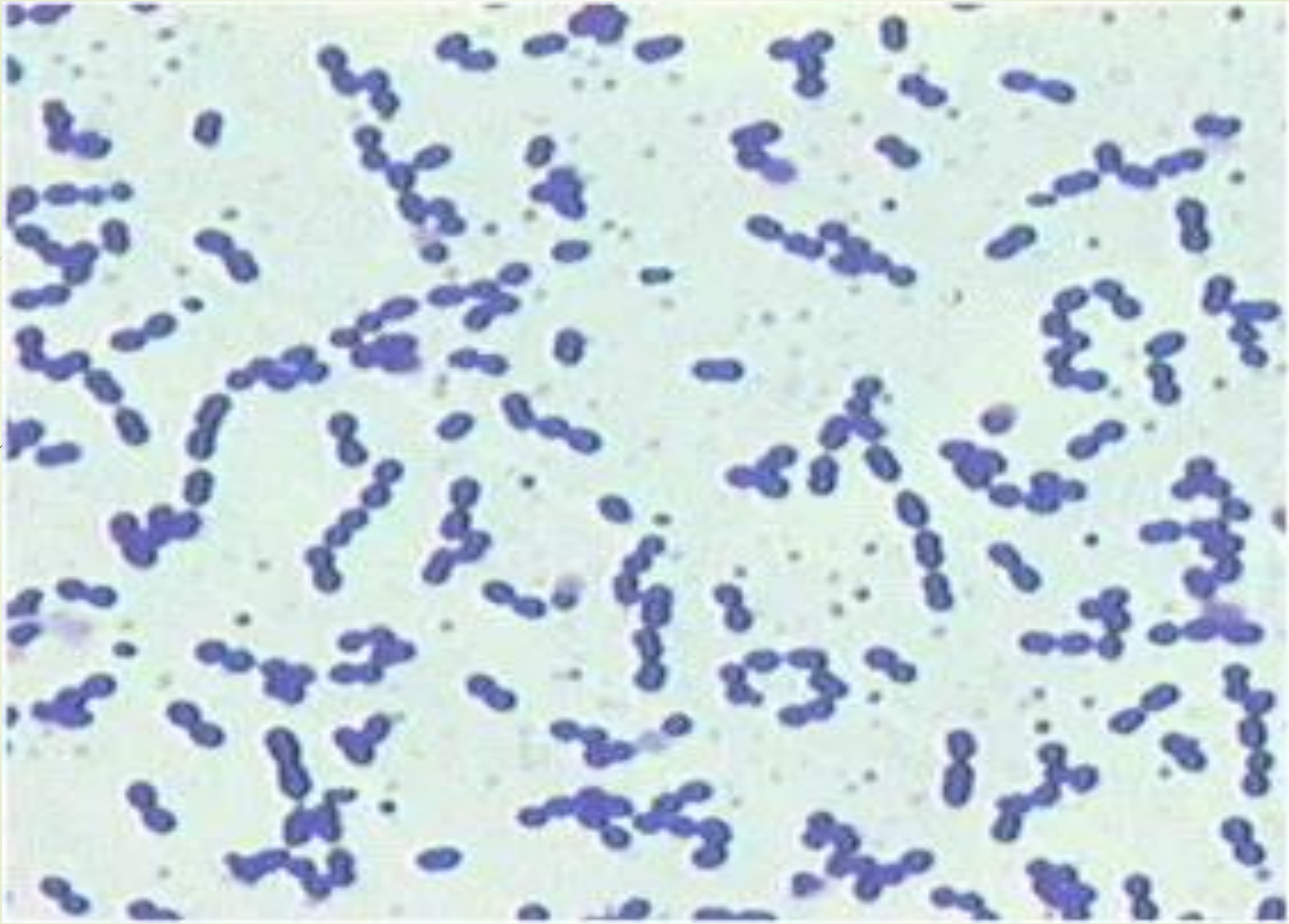
2. تست رشد در ۴۴ درجه سانتی گراد

3. تست رشد در محیط حاوی ۰.۵٪ نمک طعام

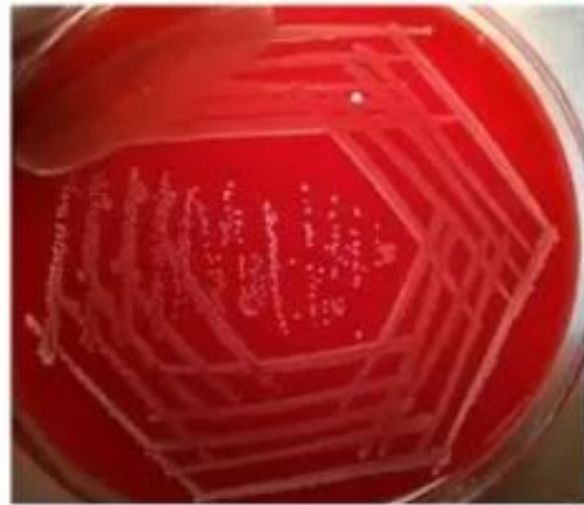
4. تست تحمل شوک حرارت

5. تست رشد در روی محیط کشت مک کانکی آگار

➡ جهت انجام آزمایشات فوق ابتدا به کشت باکتری بر روی محیط کشت آگار مغذی به صورت اسلنت کرده ، بعد از طی مدت زمان ۲۴ ساعت اتوگذاری در حرارت ۳۷ درجه سانتی گراد و رشد باکتری اقدام به انجام آزمایشات شناسایی کنید.



Enterococcus Identification



Pin point colony

Gram Stain: Gram positive cocci in chains



Catalase test: Negative

Streptococci

Bile Esculin Test: Positive



Group D

Growth in 6.5% NaCl (may also grow @ 10, 45 and even 60°C)

Enterococcus



Pyruvate Fermentation Test

Positive: *Enterococcus faecalis*

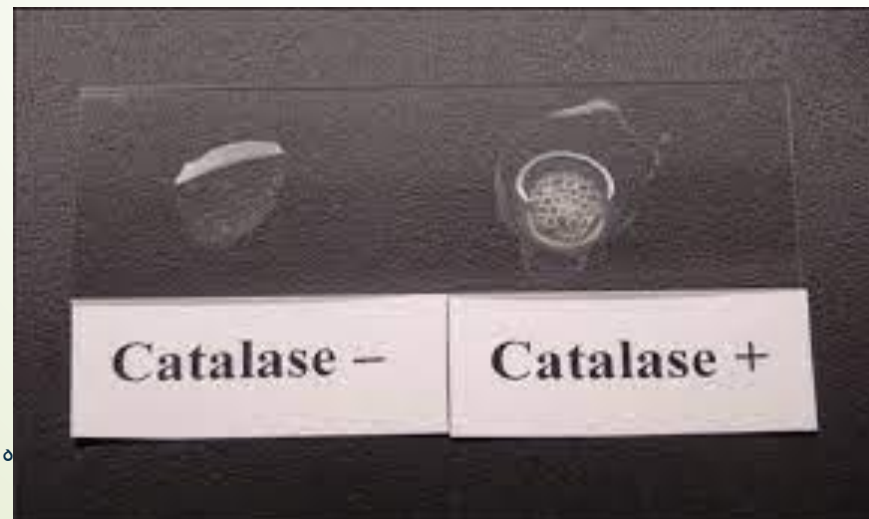
Negative: *Enterococcus faecium*

Flow chart for the identification of *Enterococcus*

1. تست کاتالاز :

➤ جهت انجام تست فوق ابتدا مورد آزمایش را به داخل لوله آزمایش حاوی محیط کش تریپتون سوی برات تلقیح کنید. لوله آزمایش را به مدت ۲۴ ساعت در داخل انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد قرار دهید و سپس مقدار ۱ میلی لیتر آب اکسیژنه ۳٪ به لوله فوق اضافه کنید.

➤ در صورت مشاهده حباب های ریز گاز ، نشان دهنده مثبت بودن واکنش کاتالاز می باشد و در غیر این صورت جواب آزمایش منفی است.



1. تست رشد در حرارت ۴۴ درجه سانتی گراد :

➤ مقدار یک الی دو کلنی از باکتری مورد آزمایش را به داخل محیط کشت برین هارت تلقیح کنید و سپس لوله ی آزمایش را به مدت ۲۴ الی ۴۸ ساعت در داخل بن ماری با حرارت ۴۴ درجه ی سانتی گراد قرار دهید.

➤ بعد از مدت زمان لازم با بررسی لوله ی آزمایش و تولید یا عدم تولید کدورت ناشی از رشد باکتری جواب آزمایش را بررسی کنید.



رہیہ کنندہ : سہیلا عباسی

1. تست رشد در محیط حاوی ۵/۶٪ نمک طعام :

جهت انجام تست فوق ابتدا چند کلنی از باکتری مورد آزمایش را به داخل محیط کشت حاوی نمک تلقیح کرده و سپس لوله محیط فوق را به مدت ۲۴ الی ۴۸ ساعت در داخل انکوباتور با حرارت ۳۷ درجه ی سانتی گراد قرار دهید.

بعد از طی مدت زمان لازم اتوگذاری جواب آزمایش را بر اساس تولید کدورت یا عدم کدورت بررسی کنید.

Streptococci and Enterococci

6.5% NaCl Growth

Positive

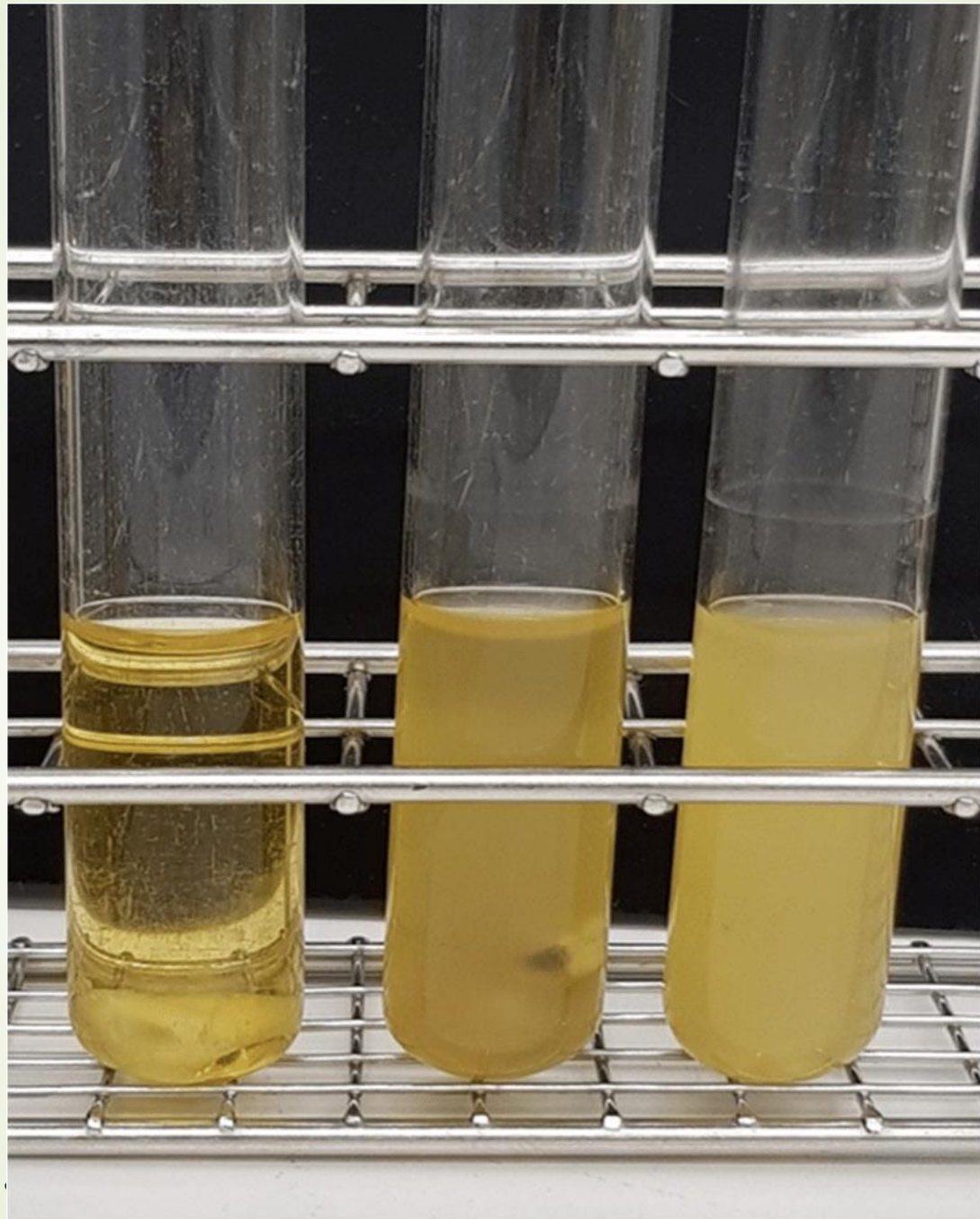
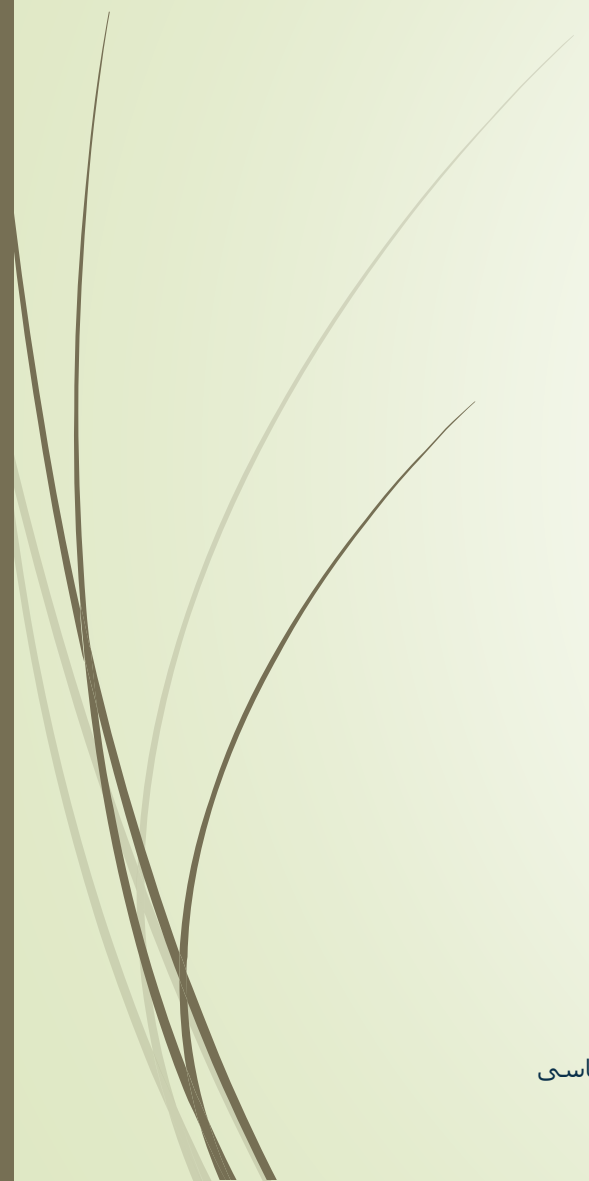


Negative



1. تست تحمل شوک حرارتی :

- جهت انجام آزمایش فوق ابتدا تعداد ۱ الی ۲ کلنی از باکتری مورد آزمایش را به داخل محیط کشت تریپتون سوی برات تلقیح کرده و سپس لوله آزمایش فوق را به مدت ۳۰ دقیقه در داخل بن ماری ۶۵ درجه سانتی گراد قرار دهید.
- سپس لوله را از داخل بن ماری خارج کنید و آن را به مدت ۲۴ الی ۴۸ ساعت در داخل انکوباتور (گرمخانه) با حرارت ۳۷ درجه سانتی گراد قرار دهید.
- در صورتی که در درون لوله آزمایش کدورت ناشی از رشد باکتری مشاهده نمودید، نشان دهنده تحمل حرارت فوق توسط باکتری می باشد که باکتری های استرپتوکوکوس گروه D لانسفید قادر به تحمل حرارت فوق به مدت ۳۰ دقیقه می باشند.



: سهیلا عباسی

1. تست رشد در محیط مک کانکی آگار :

تعداد ۱ الی ۲ کلنی باکتری مورد آزمایش را به روش استریک پلیت متد بر روی محیط مک کانکی آگار کشت داده و سپس محیط فوق را به مدت ۲۴ الی ۴۸ ساعت در داخل انکوباتور با حرارت ۳۷ درجه سانتی گراد اتوگذاری کنید.

بعد از طی مدت زمان فوق به بررسی رشد یا عدم رشد باکتری مورد آزمایش بر روی محیط فوق بپردازید.

γ -hemolytic Streptococci

Definitive test for *Enterococcus faecalis*

Growth on MacConkey's agar:

Results:



Growth of pink colonies

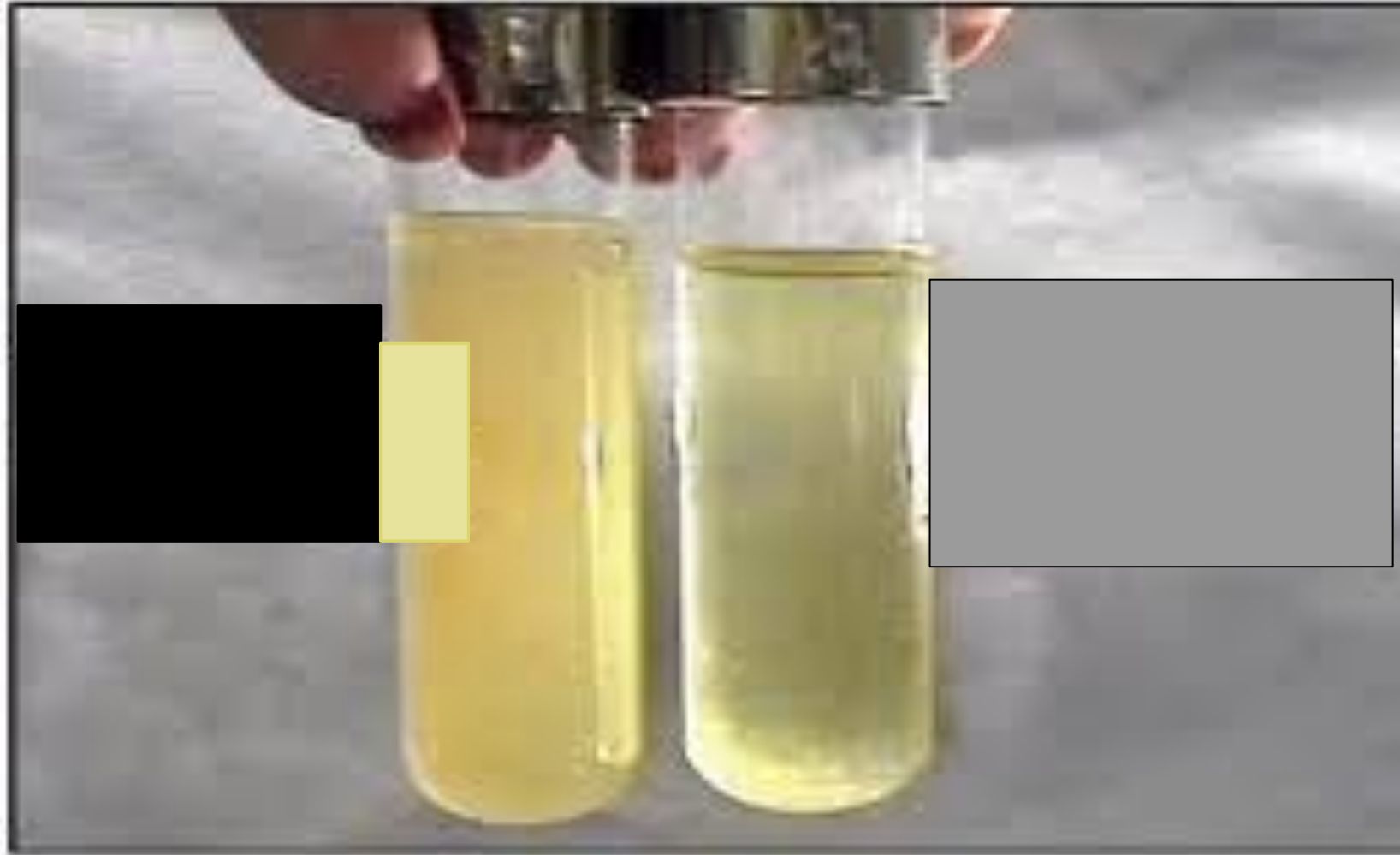
(*Enterococcus faecalis*)



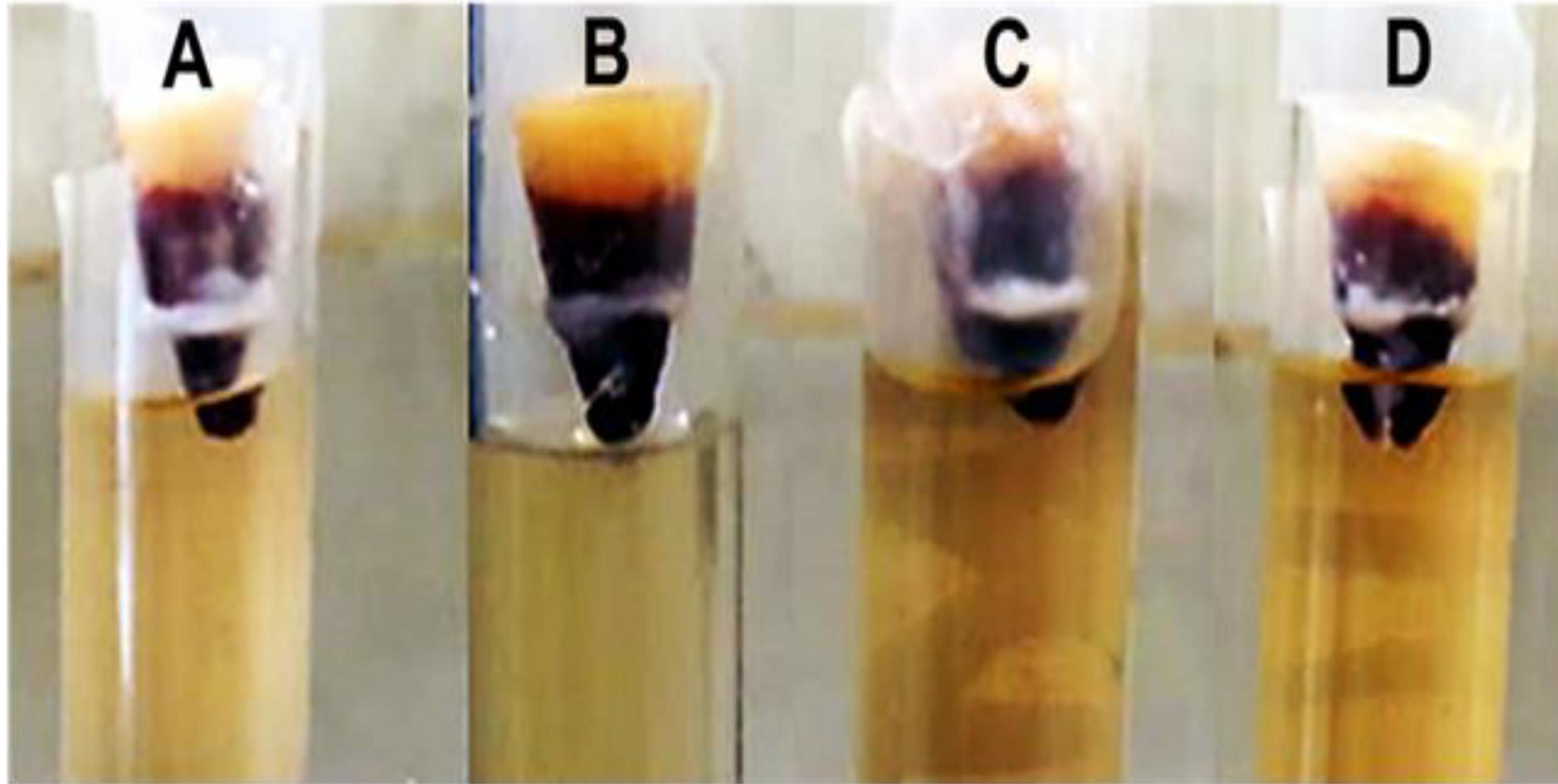
No Growth

Other Strain of Streptococci

Bile solubility test



تهیه کننده : سهیلا عباسی



تهیه کننده : سهیلا عباسی



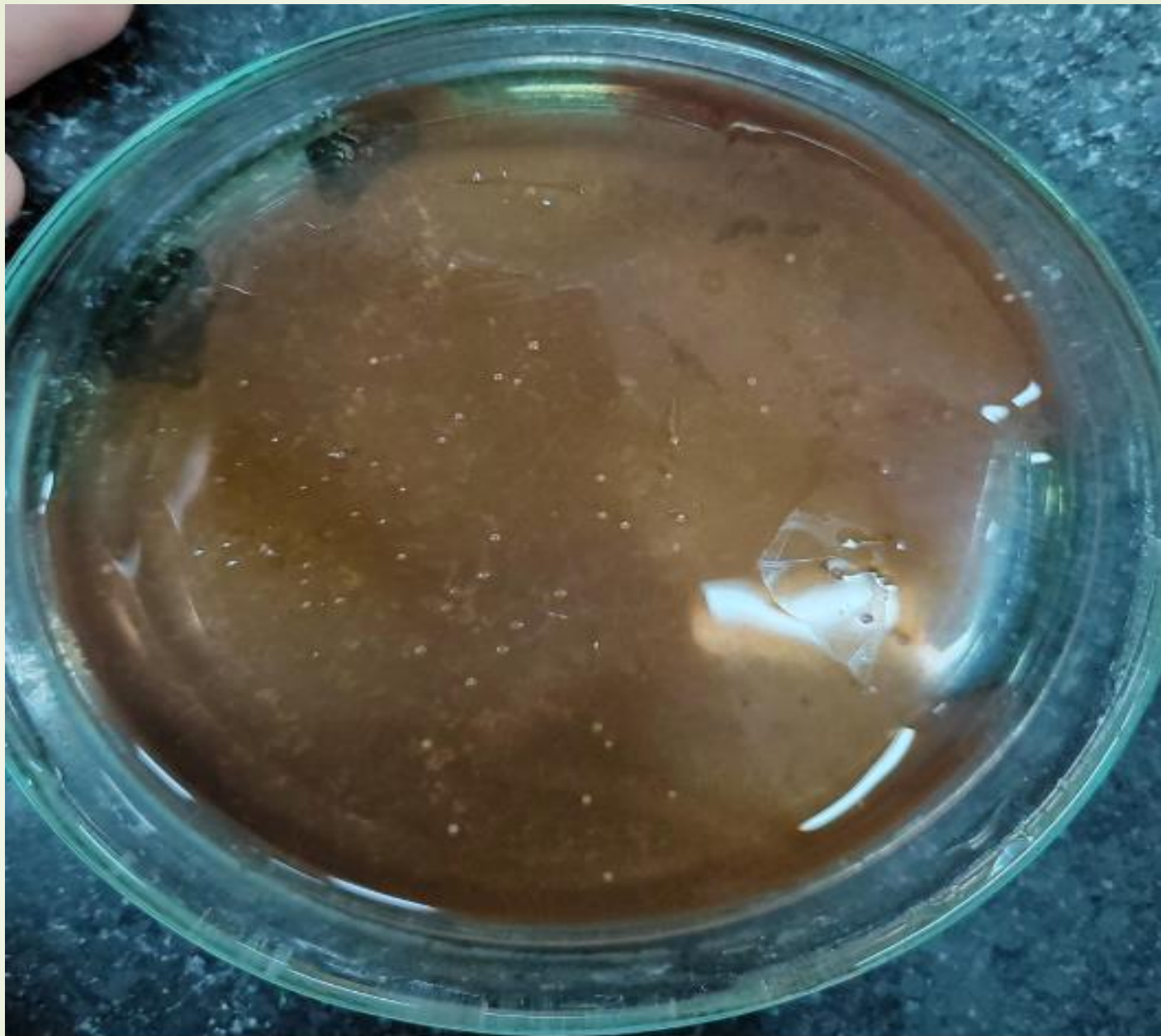
تهیه کننده : سهیلا عباسی

شیر نمونه (۱):

kf آماده	kf دستی	
$۲۴۷.۰۰۰.۰ = ۱.۰ * ۱.۰۰۰ * ۲۴۷$	-----	۰/۰۰۰۱
$۴۱.۰۰۰.۰۰ = ۱.۸۴ * ۱.۰ * ۴۱$	-----	۰/۰۰۰۱
$۶.۰۰۰.۰۰۰ = ۱.۸۵ * ۱.۰ * ۶$	-----	۰/۰۰۰۰۰۱
عدم رشد	-----	۰/۰۰۰۰۰۰۱

شیر نمونه (۲):

kf آماده	kf دستی	
غیر قابل شمارش	-----	۰/۰۰۰۱
غیر قابل شمارش	-----	۰/۰۰۰۰۱
$۱۳۷.۰۰۰.۰۰۰ = ۱.۸۵ * ۱.۰ * ۱۳۷$	$۶۸.۰۰۰.۰۰۰ = ۱.۸۵ * ۱.۰ * ۶۸$	۰/۰۰۰۰۰۱
$۷.۰۰۰.۰۰۰ = ۱.۸۶ * ۱.۰ * ۷$	-----	۰/۰۰۰۰۰۰۱



تهیه کننده : سهیلا عباسی

A bouquet of white roses with red berries and greenery, tied with a straw band, resting on a rock. The background is a soft, out-of-focus landscape.

Thank
you