



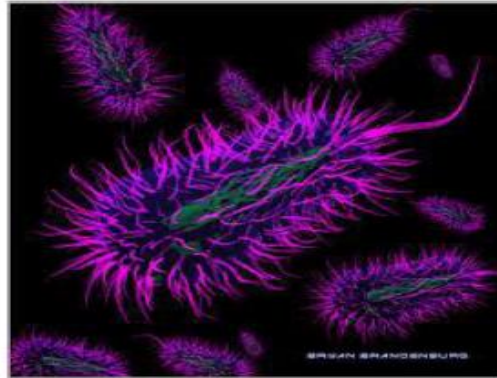
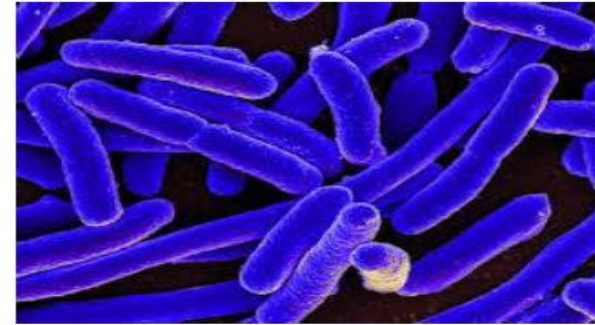
دانشگاه اصفهان

دانشکده علوم و فناوری‌های زیستی، گروه زیست‌شناسی  
سلولی و مولکولی، آزمایشگاه میکروبیولوژی

# آزمایشگاه باکتری شناسایی ۲

آشنایی با خصوصیات کلی، رنگ آمیزی و مشاهده باکتری های خانواده انتروباکتریاسه  
به روش ماکروسکوپی و میکروسکوپی

# ENTEROBACTERIACEAE



## ویژگی های باکتری های گروه انتروباکتریاسه

- انتروباکتریاسه گروه بزرگی از باکتری های گرم منفی بدون اسپور می باشند.
- این باکتری ها در خاک، آب و گیاهان یافت می شوند و عده ای فلور طبیعی روده انسان و حیوانات می باشند.
- این باکتری ها هوازی یا هوازی بی هوازی اختیاری هستند. تعدادی از اعضای این گروه متحرک، تعدادی کپسول دار و عده ای دارای **slime layer** می باشند.
- باکتری های روده ای طیف گسترده ای از قند ها را تخمیر می کنند. بر روی محیط های معمولی آزمایشگاهی مانند نوترینت آگار خون دار رشد می کنند

## انتروباکتریاسه دارای ۳ ویژگی مشترک می باشند :

- اکسیداز منفی
- توانایی تبدیل نیترات به نیتريت
- توانایی تخمیر قند گلوکز

- شکل کلنی آنها شبیه یگدیگر می باشد. برای تشخیص آنها از یکدیگر می توان از محیط های اختصاصی و خصوصیات بیوشیمیایی و در حله آخر از خواص آنتی ژنی استفاده کرد.
- در آزمایشگاه تشخیص طبی مبنای تقسیم بندی و افتراق این خانواده بر اساس تخمیر قند لاکتوز گذاشته شده است.
- محیط های اختصاصی این خانواده دارای مهار کننده هایی مانند نمکهای صفراوی و یا رنگ هایی مانند ائوزین متیلن بلو، کریستال ویوله و بریلیانت گرین می باشند، که از رشد باکتری های گرم مثبت جلوگیری می کنند.
- از محیط های افتراقی و انتخابی مورد استفاده می توان به محیط کشت ائوزین متیلن بلو (EMB) و مک کانکی (Mac conkey) اشاره کرد. در این دو محیط فقط قند لاکتوز وجود دارد و در صورتی که باکتری قادر به تخمیر قند لاکتوز و تولید اسید باشد، معرف موجود در محیط (نوترال رد) قرمز رنگ می شود. در نتیجه کلنی باکتری های لاکتوز مثبت اشیریشیا کلی و انتروباکتر قرمز رنگ و کلنی باکتری های لاکتوز منفی مثل سالمونلا و شیگلا بی رنگ می باشد.

• به دلیل اینکه اکثر نمونه های بالینی با باکتری های دیگر مخلوط هستند برای جداسازی آنها از محیط های انتخابی استفاده می نمایند.

• رنگ های بریلیانت گرین یا کریستال ویوله و نمک های صفرآوی مانند دزاکسی کلات سدیم در این محیط ها از رشد باکتری های گرم مثبت و برخی از باسیل های گرم منفی غیر بیماریزای روده ای ممانعت به عمل می آوردند .

• بر اساس غلظت این عوامل، محیط های فوق الذکر را به ۳ گروه تقسیم بندی می نمایند :

• ۱ - محیط های **Low selective** مانند مک کانکی ( Mac ) یا ائوزین متیلن بلو ( EMB ) یا دزوکسی کلات آگار (DC)

• ۲ - محیط های **Moderate selective** مانند سالمونلا شیگلا آگار ( SS )، دزوکسی کلات سیترات آگار ( DCC )، هکتون انتریکا آگار ( HE ) و زایلوز لیزین دزوکسی کلات آگار ( XLD )

• ۳ - محیط های **High selective** مانند بریلیانت گرین آگار ( BG ) یا بیسموت سولفیت آگار ( BS )

• اکثر این محیط های انتخابی، افتراقی نیز هستند و باسیلهای گرم منفی روده ای را بر اساس تخمیر قند لاکتوز جدا می کنند.

• از محیط های مورد استفاده برای تشخیص انتروباکتریاسه، محیط کشت **kligler Iron Agar (KIA)** و **Triple Sugar Iron Agar(TSI)** می باشد.

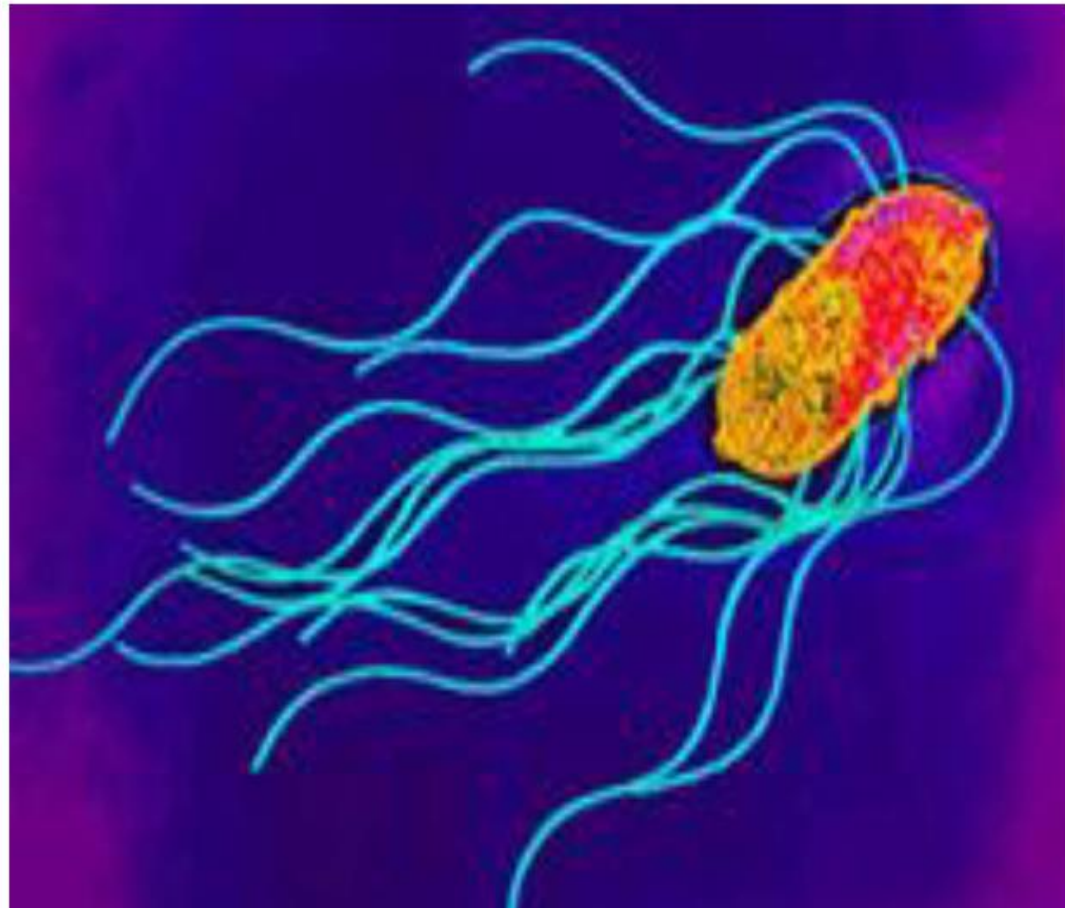
# Characters of *Enterobacteriaceae*

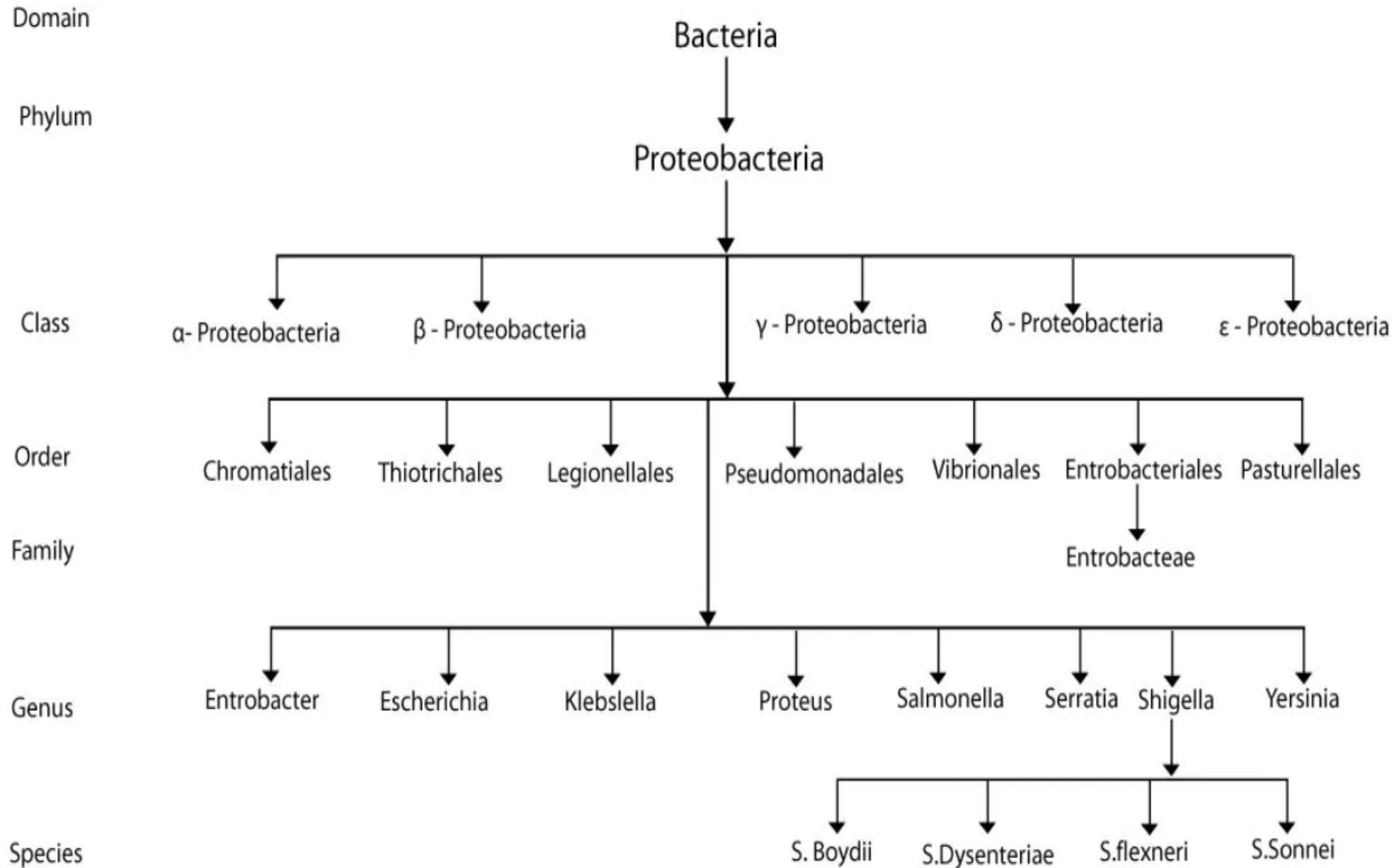
- All *Enterobacteriaceae*
  - Gram-negative rods
  - Ferment glucose with acid production
  - Reduce nitrates into nitrites
  - Oxidase negative
- Facultative anaerobic
- Motile **except** *Shigella* and *Klebsiella*
- Non-capsulated except *Klebsiella*
- Non-fastidious
- Grow on bile containing media (MacConkey agar)



# Most Enterobacteriaceae are motil (exception: Kelebsiella, shigella, yersinia)

- Motile with peritrichous flagella





# Enterobacteriaceae

## Taxonomical

- **Tribe I Escherichia**

Genus – 1 Escherichia,  
2 Edwardsville  
3 Citrobacter  
4 Salmonella  
5 Shigella

# Enterobacteriaceae.

- Tribe II; Klebsiella

- Genus
1. Klebsiella
  2. Enterobacter,
  3. Hafnia
  - 4 Serratia

Tribe III ; Proteeae

- Genus
- 1, Proteus
  - 2, Morganella
  - 3 . Providencia

# Classification of Enterobacteriaceae ( Contd )

Clip slide

- Tribe IV;  
Erwinieae  
Genus 1.  
Erwinia





# Basic Classification

- I Lactose fermenters E.coli, Escherichia  
Klebsiella,
- II Late Lactose fermenters, Shigella  
sonnei,
- III Non Lactose fermenters, Salmonella  
Shigella,

Commonly tested with MacConkey medium  
Many are commensals Lactose fermenters  
Also called as coli forms , Enteric Bacilli

# MacConkey agar plate (MC)

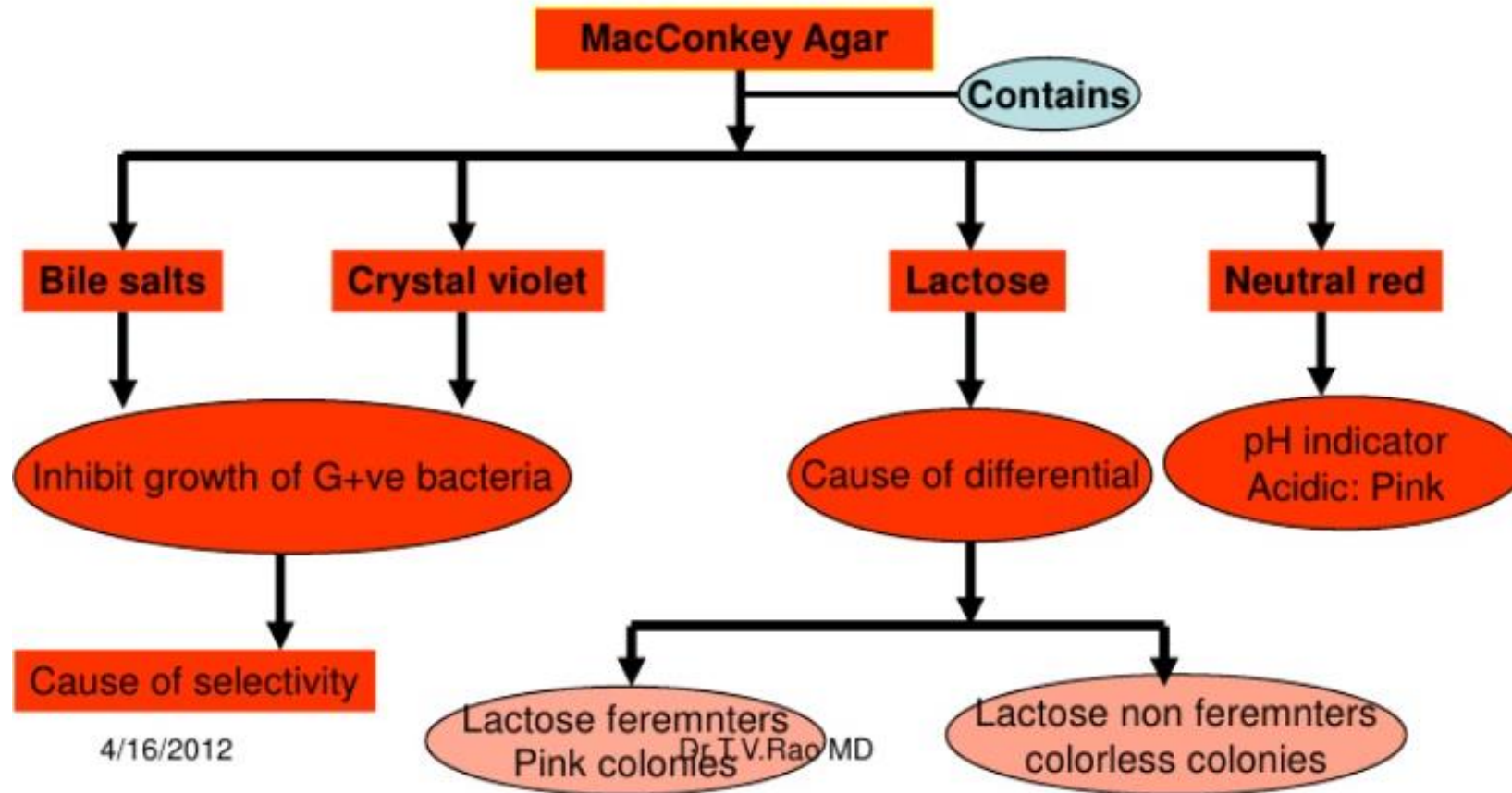
**Use :** For the selective isolation, cultivation and differentiation of coliforms and enteric pathogens based on the ability to ferment lactose. Lactose-fermenting organisms appear as red to pink colonies. Lactose-nonfermenting organisms appear as colorless or transparent colonies



رنگ ارغوانی کلنی های باکتری های لاکتوز مثبت مربوط به واکنش اسیدی است که در نتیجه تخمیر قند لاکتوز در مجاورت املاح صفراوی و جذب نوترال رد حاصل شده است

## Differentiation between LF & NLF by Growth on MacConkey agar

➤ MacConkey agar is selective & differential medium for *Enterobacteriaceae*





## Identification of *Enterobacteriaceae*

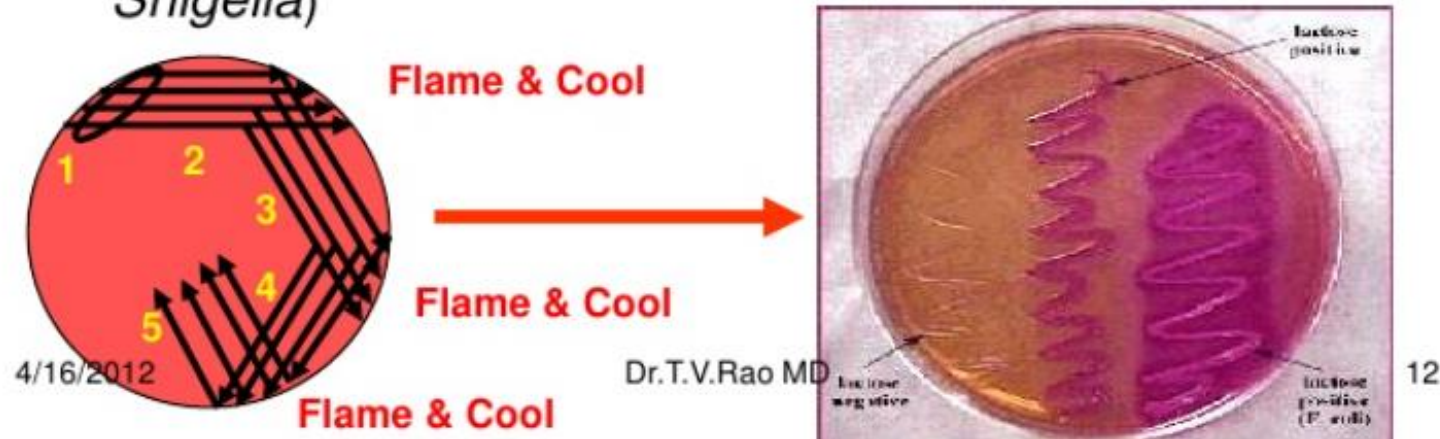
### Differentiation between LF & NLF by Growth on MacConkey agar

- **Method:**

- MacConkey agar is inoculated with tested organism using streak plate technique
- Incubate the plate in incubator at 37 C/24 hrs

- **Results:**

- LF organism appears as pink colonies (e.g. *E. coli*)
- NLF organism appears as colorless colonies (e.g. *Shigella*)

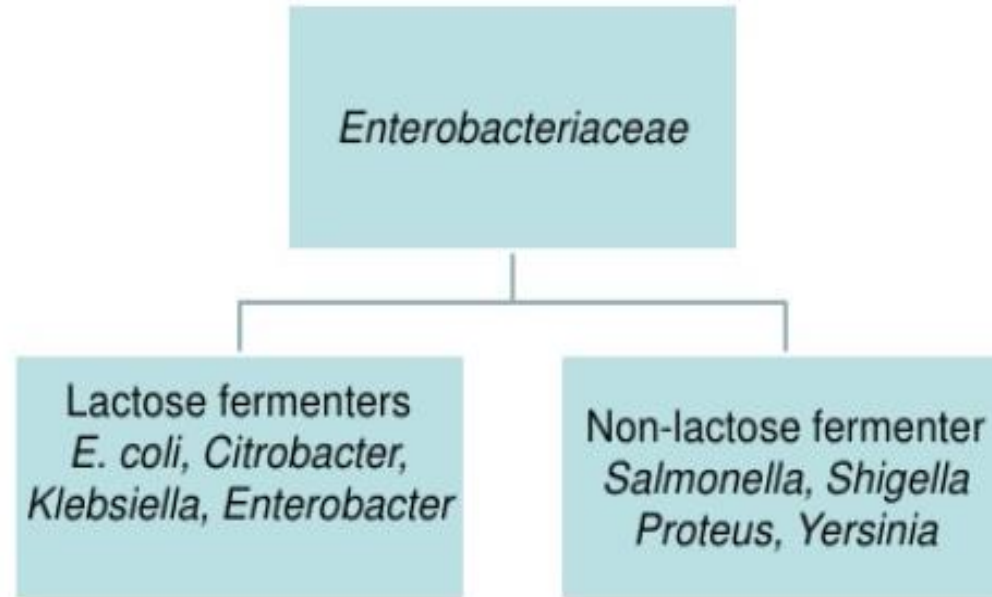


# کلبسیلا بر روی محیط مکانکی



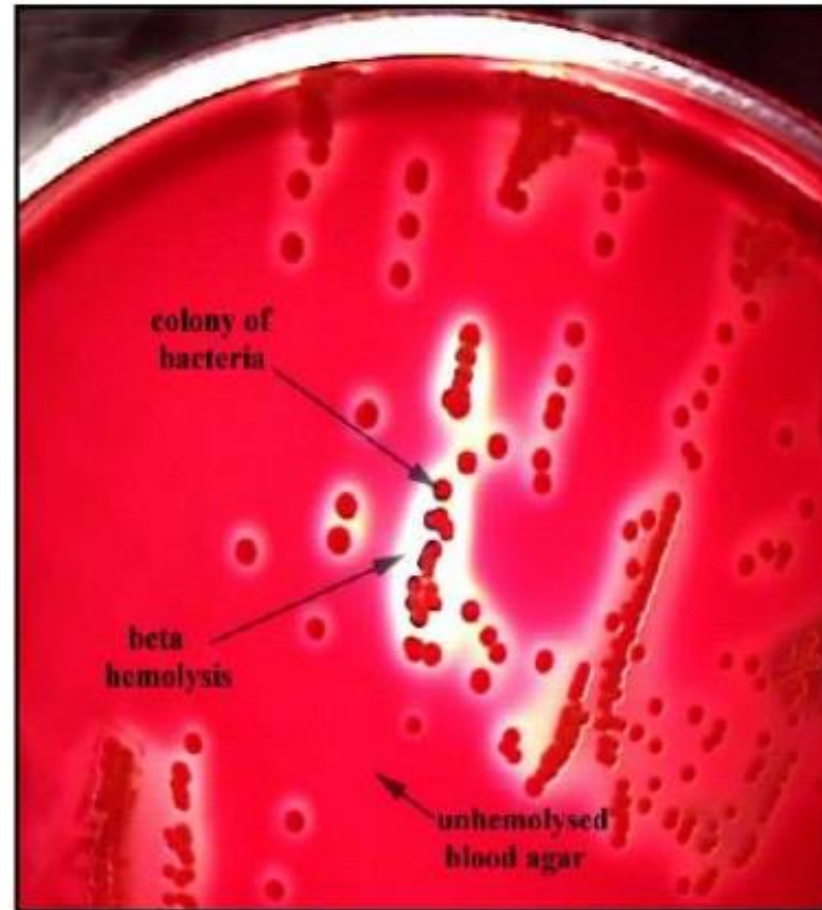
تهیه کننده: سهیلا عباسی

# Classification of *Enterobacteriaceae*



- There are several selective and differential media used to isolate distinguishes between LF & LNF
- The most important media are:
  - MacConkey agar
  - Eosin Methylene Blue (EMB) agar
  - Salmonella Shigella (SS) agar
  - In addition to Triple Sugar Iron (TSI) agar

- Many pathogenic strains are haemolytic on blood agar.



# Enterobacteriaceae

Most motile with peritrichous flagella

*Shigella* and *Klebsiella* are nonmotile

Many genera

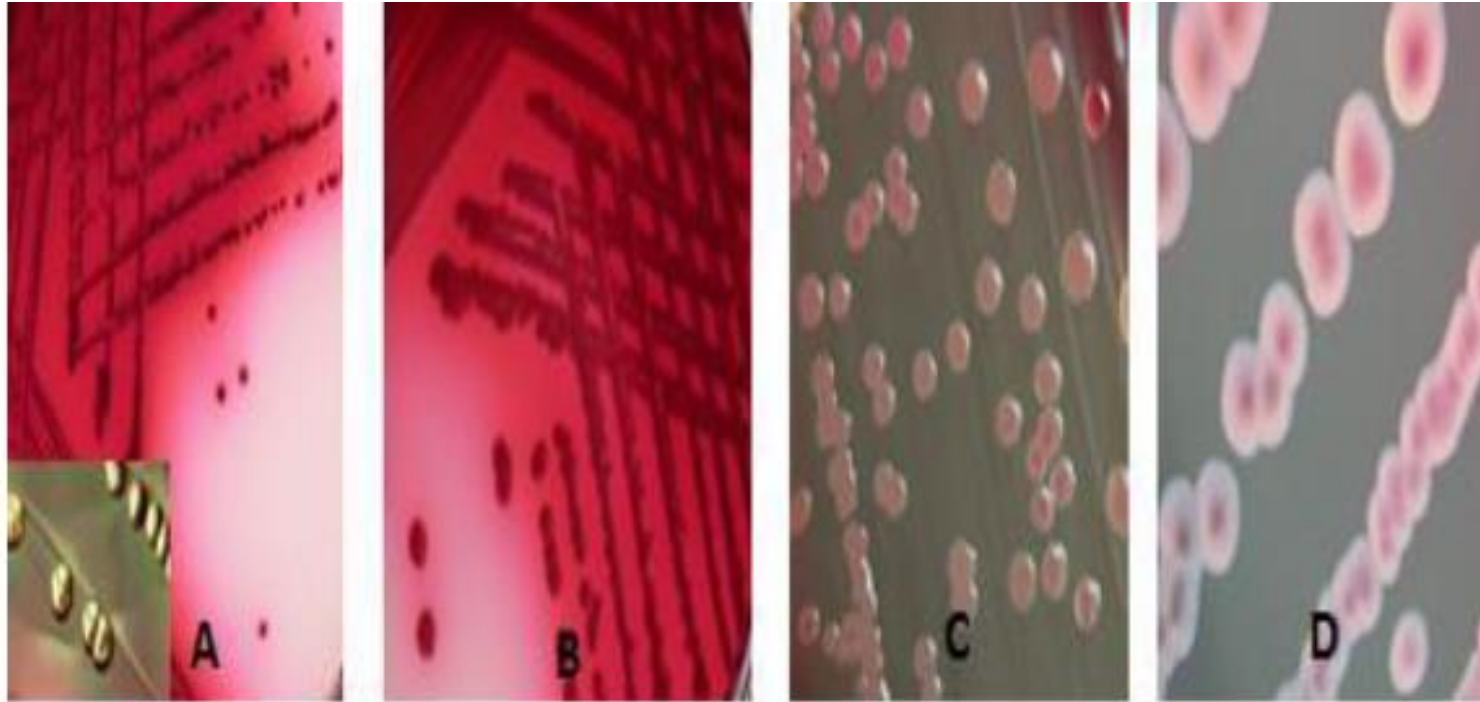
*Escherichia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Klebsiella*, *Proteus*,  
*Enterobacter*, *Yersinia*, etc.

Some strains opportunistic pathogens

Some strains true pathogens

*Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia*, some strains of *E. coli*



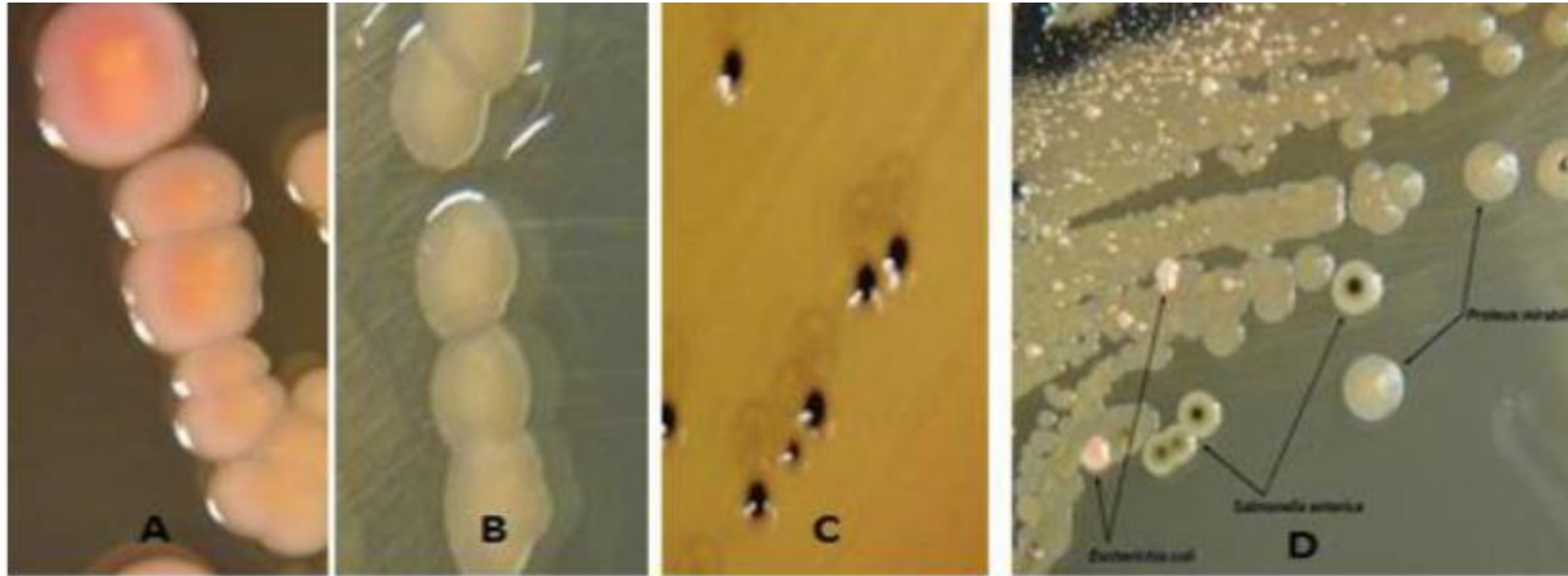


A - Lactose positive colonies of *Escherichia coli* on Endo agar, metallic sheen.

B - Lactose positive colonies of *Klebsiella pneumoniae* on Endo agar.

C - Lactose negative colonies of *Shigella flexneri* on Endo agar.

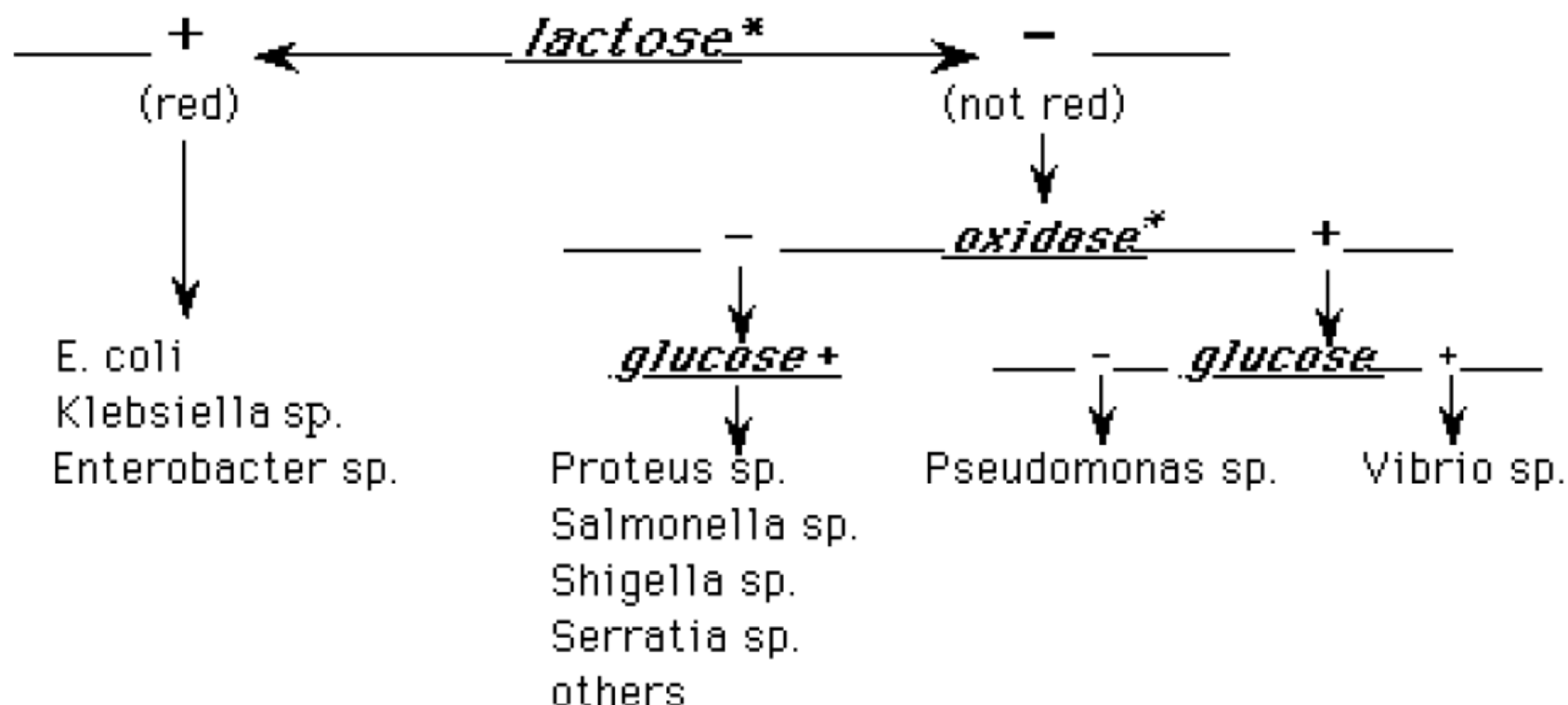
D - Lactose negative colonies of *Salmonella enterica* on Endo agar.



- A - *Klebsiella pneumoniae* on Deoxycholate Citrate Agar - lactose positive.**
- B - *Proteus mirabilis* on Deoxycholate Citrate Agar - lactose negative.**
- C - *Salmonella enterica* subsp. *enterica* on Deoxycholate Citrate Agar – lactose positive, H<sub>2</sub>S positive.**
- D - Lactose negative, H<sub>2</sub>S positive colonies of *Salmonella enterica* (DCA).  
Lactose negative colonies of *Proteus mirabilis* (DCA).  
Lactose positive colonies of *Escherichia coli* (DCA).**

# Identification of Gram Negative Rods Growth on MacConkey agar

Enterics sp.\*



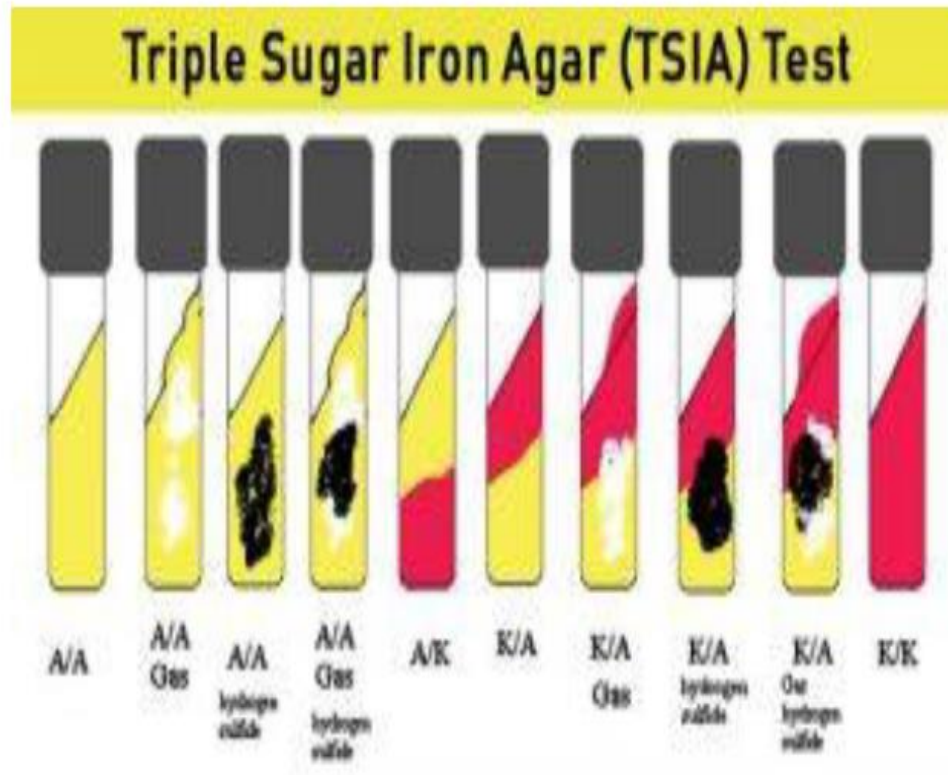
confirm with

*DSIA\* Enterotube\* capsule\**



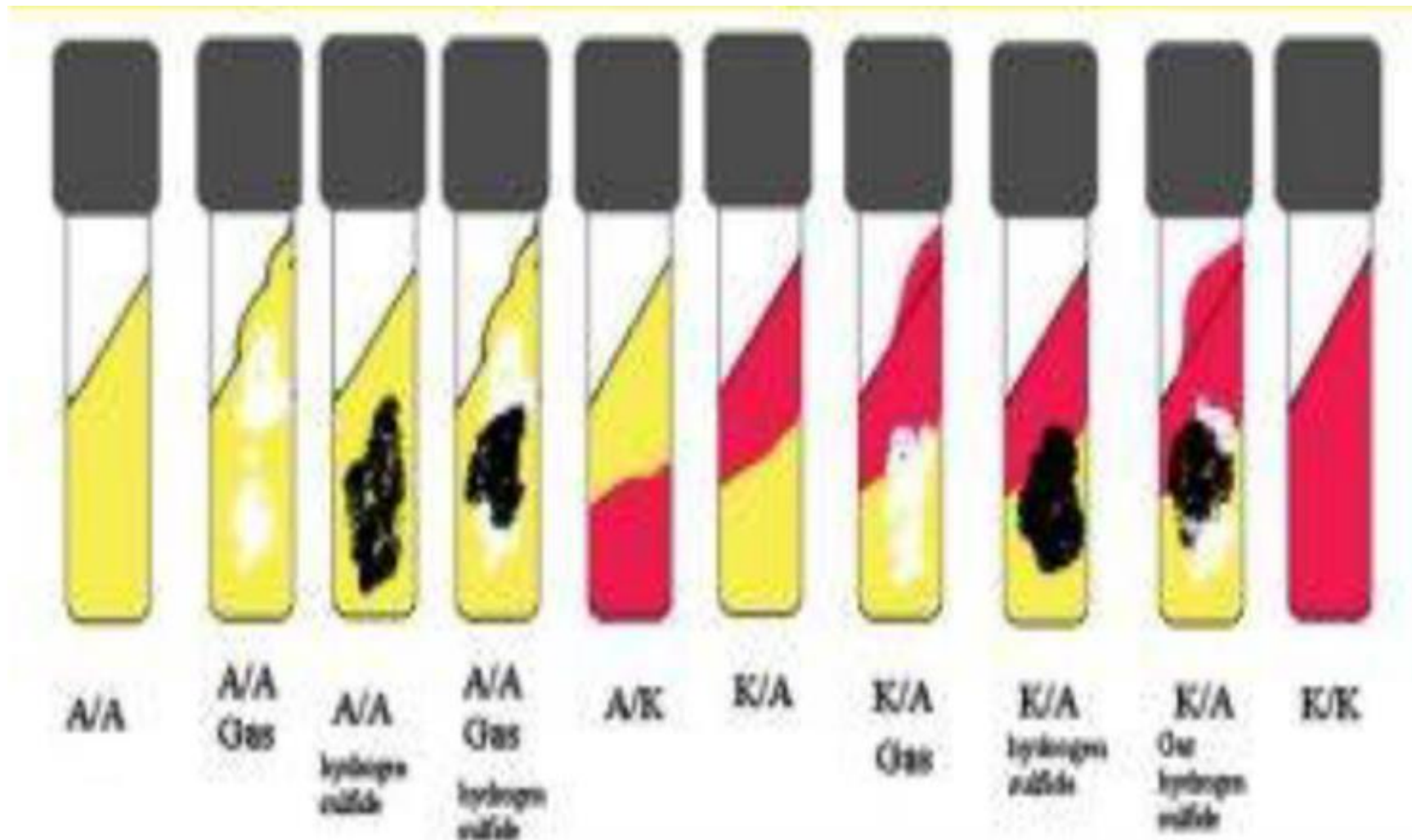
## آزمایش TSI برای شناسایی اعضای خانواده انتروباکتریاسه

### دستورالعمل تست TSI برای شناسایی گروه انتروباکتریاسه



آزمایش TSI برای شناسایی اعضای خانواده انتروباکتریاسه به کار می رود. همچنین این تست برای افتراق انتروباکتریاسه از سایر باسیل های روده ای گرم منفی استفاده می شود. محیط کشت TSI حاوی ۱ درصد لاکتوز، ۱ درصد ساکارز و ۰/۱ درصد گلوکز می باشد. اختلاف در غلظت این قند ها به منظور تشخیص توانایی مصرف آنها است. معرف فنول رد به عنوان شاخص PH تغییرات اسیدیته محیط را که نتیجه تخمیر کربوهیدرات ها می باشد، نشان می دهد. بطوری که تولید اسید ناشی از تخمیر قند را با تغییر رنگ قرمز به زرد نشان می دهد. در این محیط تیوسولفات سدیم و سولفات آهن II نیز وجود دارد، تیوسولفات سدیم سوبسترای تولید H<sub>2</sub>S و سولفات آهن به عنوان معرف رنگی عمل می کند و در حضور H<sub>2</sub>S رسوب رنگی تشکیل می دهد.

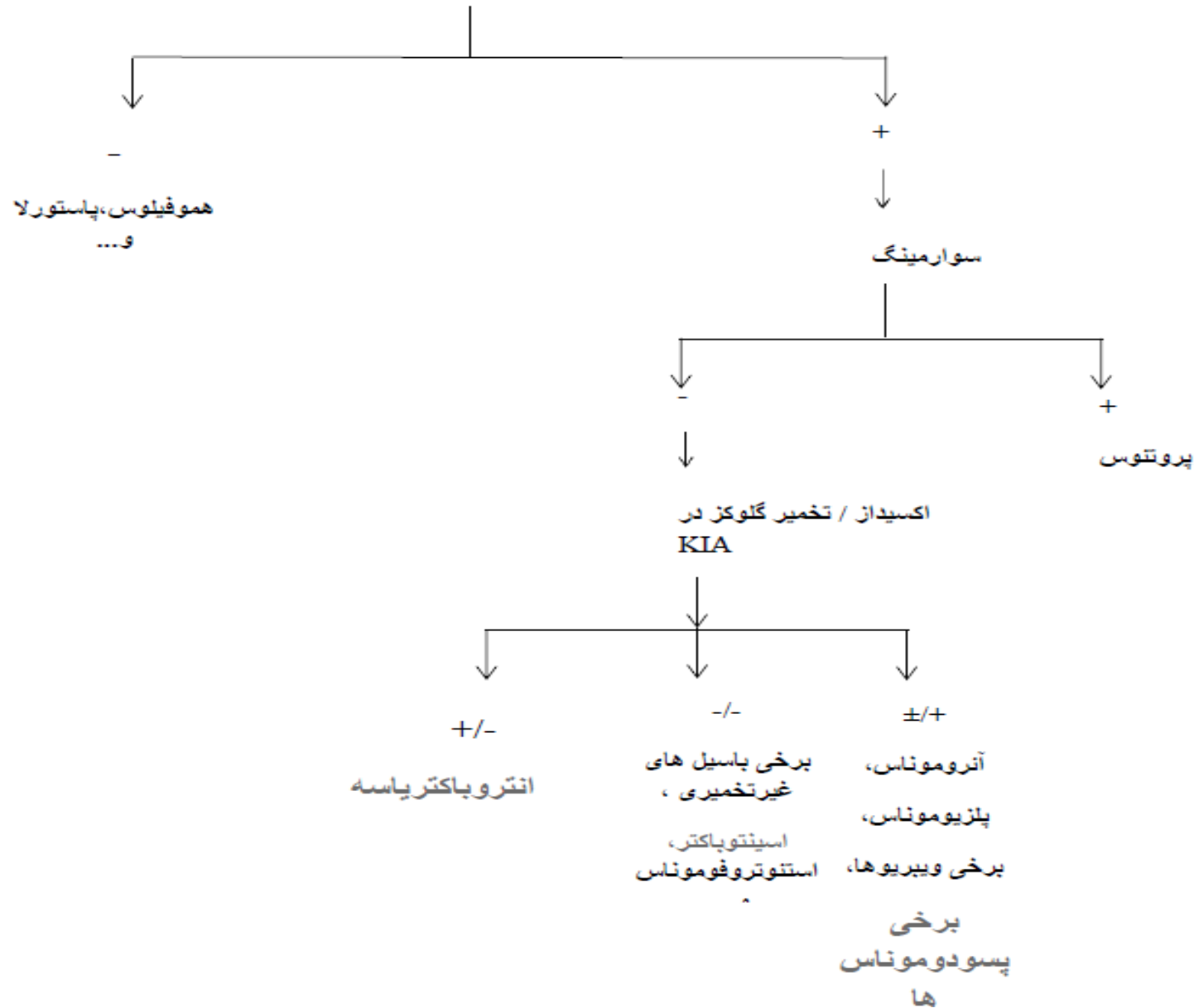
# Triple Sugar Iron Agar (TSIA) Test



جدول زیر واکنش های بیوشیمیایی انتروباکتریاسه در محیط TSI را نشان می دهد

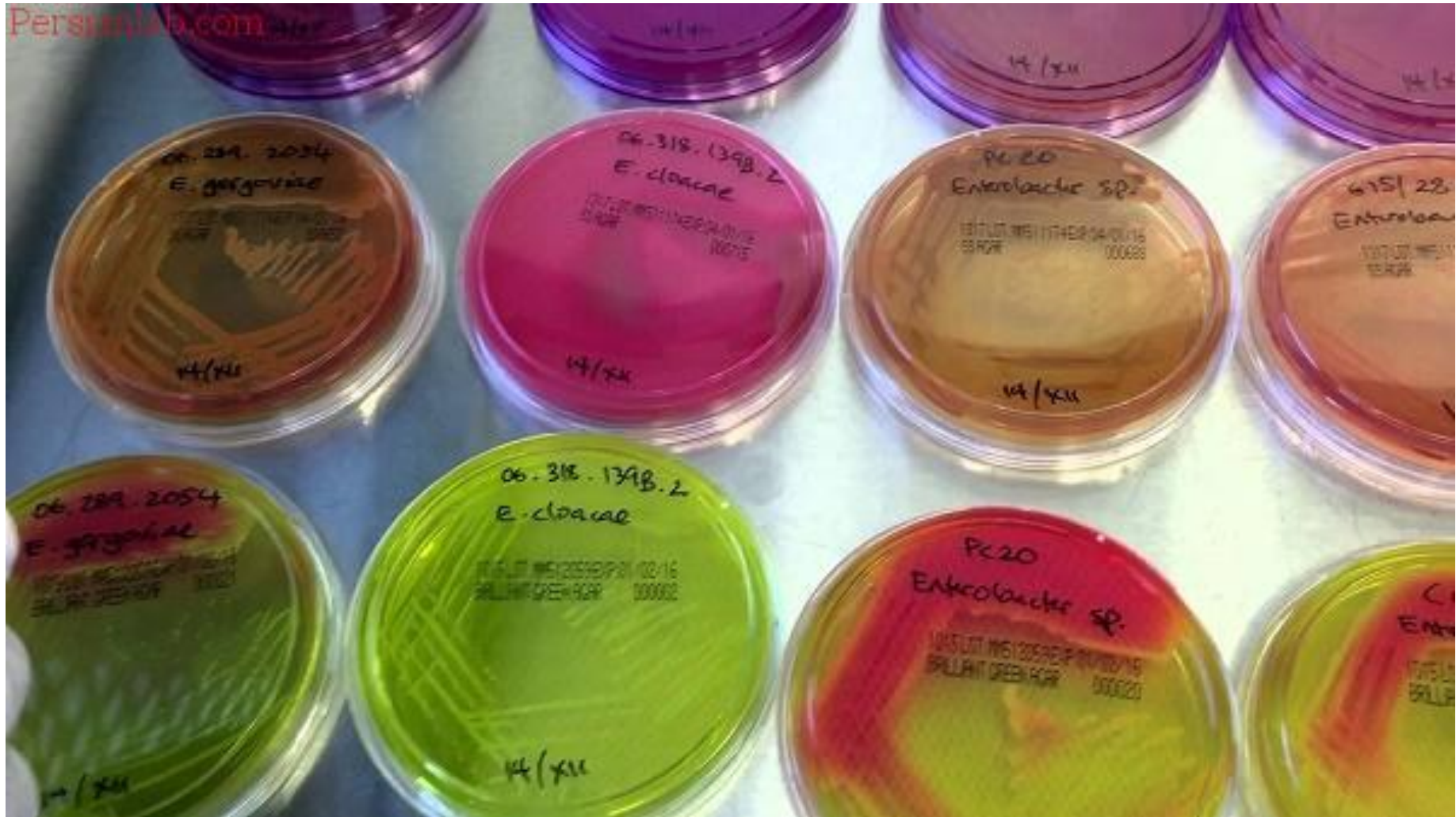
نام باکتری	عمق لوله	سطح شیبدار	سولفید هیدروژن	تولید گاز
انتروباکتر	A	A	-	+
اشرشیا	A	A or K	-	+
کلپسیلا	A	A	-	+
سیتروباکتر	A	A or K	متغیر	+
پروتئوس	A	A or K	-	-
ادواردسیلا	A	K	-	+
مورگانلا	A	K	-	+
سراتیا	A	A or K	-	متغیر
شیگلا	A	K	-	-
سالمونلا	A	K	+	-

## رشد روی محیط MAC









تهیه کننده: سهیلا عباسی

---

---

# Cowan and Steel's Manual for the Identification of Medical Bacteria

---

---

Third Edition

Edited by  
G.I. Barrow and R.K.A. Feltham





**Table 6.1.** First-stage table for Gram-positive bacteria

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
Shape	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Acid fast	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	w	+
Spores	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
Motility	-	-	-	-	D	-	-	d	-	-	+	-	-	-	-	-	D	D	-	-	-
Growth in air	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	d	+	+	+	+
Growth anaerobically†	-	+	w	w	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	D	-	-	?
Catalase	+	+	w	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+
Oxidase	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	?	?	?	?	-	d	-	-	-
Glucose (acid)	D	+	+	+	+	+	+/-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	D	D	+	+	+
Carbohydrates [F/O/-]	O/-	F	F	F	F	F	F/-	-	-	F	F/-	F	F	F	F	-	F/-	F/O/-	O	O	O/NT

<i>Micrococcus</i> <sup>a</sup>	+	6.2																			
<i>Staphylococcus</i>		+																			
<i>Aerococcus</i>			+	+																	
<i>Enterococcus</i>					+																
<i>Streptococcus</i>						+															
<i>Lactococcus</i>							+														
<i>Pediococcus</i> <sup>b</sup>								+													
<i>Gemella</i>									+												
<i>Anaerobic cocci</i> <sup>*</sup>										+											
<i>Kurthia</i>											+										
<i>Corynebacterium</i>												+	+								
<i>Listeria</i>														+							
<i>Brochothrix</i>															+						
<i>Erysipelothrix</i>																+					
<i>Lactobacillus</i>																	+				
<i>Arcanobacterium</i>																		+			
<i>Arachnia</i> <sup>c</sup>																			+		
<i>Rothia</i>																				+	
<i>Propionibacterium</i>																					+
<i>Actinomyces</i>																					
<i>Bifidobacterium</i>																					
<i>Eubacterium</i>																					
<i>Clostridium</i> <sup>d</sup>																					
<i>Bacillus</i>																					
<i>Nocardia</i> <sup>e</sup>																					
<i>Mycobacterium</i>																					

\* *Peptococcus* and *Peptostreptococcus*.


<sup>a</sup> Also *Stomatococcus*.

<sup>b</sup> Also *Leuconostoc*.

<sup>c</sup> Also *Actinomyces odontolyticus*.

<sup>d</sup> Exceptions: *C. histolyticum*; *C. tertium*; *C. carnis*.

<sup>e</sup> Also *Actinomadura*.

 Cultural characters of these organisms can be found in tables with the number indicated.  
 S Sphere (coccus).  
 R Rod-shaped (bacillus).

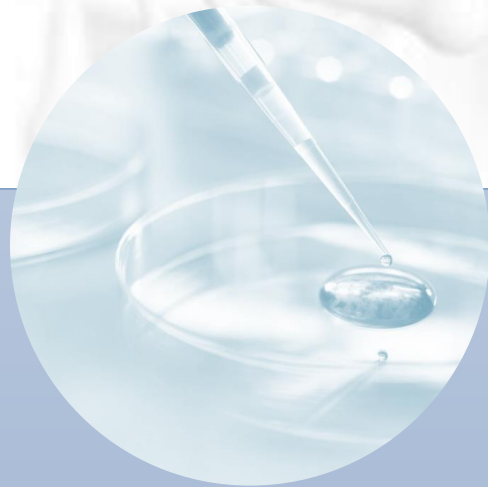


**Table 7.1. First-stage table for Gram-negative bacteria**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
Shape	R	S	S	S	S/R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R/S	R	H/C	H/C	H	R	R	NT
Motility	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	D	-	-	+	+	+	-	+	NT
Growth in air	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-*	-†	+	-	+	+
Growth anaerobically	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	D	+	+	+	-	+
Catalase	d	D	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	D	-	D	+	-	-	+	?
Oxidase	-	?	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	D	+	+/w	+	-	-	-	D
Glucose (acid)	D	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	D	-	-	-	-	+	+	-
Carbohydrates [F/O/-]	F/-	-	O	-	O/-	F	-	-	-	O	O/-	F	F	F	F	NT	-	-	-	F	F	-	?

<i>Bacteroides</i>	+																						
<i>Fusobacterium</i> <sup>a</sup>	+	7.2																					
<i>Veillonella</i> <sup>b</sup>		+																					
<i>Neisseria</i>			+																				
<i>Branhamella</i>				+																			
<i>Acinetobacter</i>					+																		
<i>Kingella</i>						+																	
<i>Moraxella</i>							+																
<i>Brucella</i>								+															
<i>Bordetella pertussis</i>									+														
<i>Bordetella parapertussis</i>										+													
<i>Bordetella bronchiseptica</i>											+												
<i>Alcaligenes</i>												+											
<i>Shewanella</i>													+										
<i>Pseudomonas (alkali-producers)</i>														+									
<i>Achromobacter</i>															+								
<i>Agrobacterium</i> <sup>c</sup>																+							
<i>Janthinobacterium</i>																	+						
<i>Pseudomonas (oxidizers)</i> <sup>d</sup>																		+					
<i>Flavobacterium</i> <sup>e</sup>																			+				
<i>Actinobacillus</i>																				+			
<i>Pasteurella</i>																					+		
<i>Aeromonas salmonicida</i>																						+	
<i>Cardiobacterium</i>																							+
<i>Chromobacterium</i>																							
<i>Vibrio</i>																							
<i>Plesiomonas</i>																							
<i>Aeromonas</i>																							
<i>Enterobacteria</i> <sup>f</sup>																							
<i>Haemophilus</i>																							
<i>Gardnerella</i>																							
<i>Eikenella</i> <sup>g</sup>																							
<i>Campylobacter</i>																							
<i>Helicobacter</i>																							
<i>Arcobacter</i>																							
<i>Anaerobiospirillum</i>																							
<i>Stenobacillus</i> <sup>h</sup>																							



با تشکر از توجه شما

