



به نام خدا

دانشگاه اصفهان

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

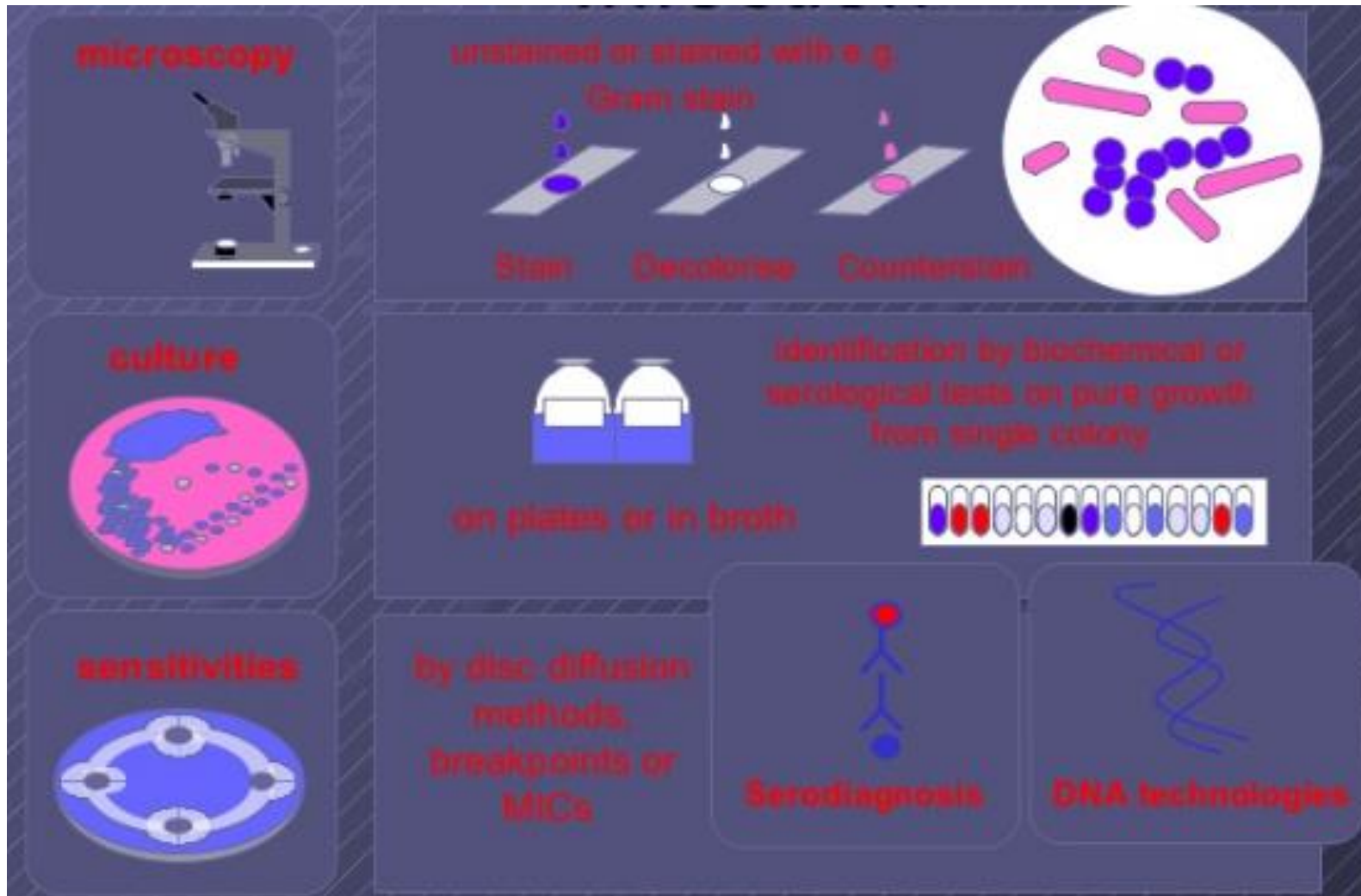
آزمایشگاه باکتری شناسی ۲

بررسی خصوصیات ماکروسکوپی و میکروسکوپی، انجام آزمون های
بیوشیمیایی جهت شناسایی باکتری های خانواده انتروباکتریاسه شامل
اشریشیا کلای، کلبسیلا

تهیه کننده: سهیلا عباسی

Laboratory Identification Tests

Diagnosis of Bacterial Infection



Indole production

- Degradation of tryptophan by tryptophanase to produce indole
- Red colour develops after adding a solution containing p-dimethylaminobenzaldehyde (Kovacs or Erlich's)

Negative
Positive



● Triple Sugar Iron Agar (TSI):

Purpose: To differentiate bacteria based on their ability to ferment glucose, lactose and/or sucrose, and to reduce sulfur to hydrogen sulfide.



تفسیر محیط KIA

زرد، زرد Yellow / Yellow	اسید در عمق، اسید در سطح Acid slant / Acid butt	تخمیر گلوکز و لاکتوز glucose and lactose fermented
زرد، قرمز Red / Yellow	اسید در عمق، قلّیا در سطح Alkaline slant / Acid butt	تخمیر گلوکز glucose fermented
قرمز، قرمز Red / Red	قلّیا در عمق، قلّیا در سطح Alkaline slant / Alkaline butt	عدم تخمیر گلوکز و لاکتوز Glucose and lactose not fermented



شکل ۱: واکنش چند نوع باکتری بر روی محیط KIA

ONPG test

- Determines presence of β -galactosidase
- Utilizes o-nitrophenyl-d- β -galactosidase
- Differentiates late lactose fermenting organisms



Methyl Red

- This is a qualitative test of the acidity produced by the growth of a bacterium in phosphate-buffered glucose peptone water
- *E. coli* produces a pH of about 5, and hence a red colour is produced after addition of methyl red.
- *Enterobacter aerogenes* the pH never drops so low, it appears yellow after addition of methyl red.

Voges-Proskauer

- This test for production of acetylmethylcarbinol (**AMC**) from carbohydrates by bacteria in glucose phosphate peptone water
- Red colour is produced after addition of alpha naphthol and KOH
 - *Klebsiella* +
 - *E coli* -

MR/VP Results

● Reading Results:

- MR— a + result is red (indicating pH below 6) and a – result is yellow (indicating no acid production)
- VP—A + result is red after VP reagents are added (indicating the presence of acetoin) and a – result is no color change.



Methyl Red: left – and right +



VP: left + and right –

IMViC test

- IMViC test is a group of four biochemical tests collectively used for primary identification of enteric bacteria
 - Indole
 - Methyl red
 - Voges proskuer
 - Citrate utilization test

IMViC tests

Help to differentiate among members of the family Enterobacteriaceae (enterics)

Lab #6 (white), p. 3

- I** = test for production of **indole** from tryptophan
- M** = **methyl red** test for acid production from glucose
- V** = **Voges-Proskauer** test for production of acetoin from glucose
- C** = test for the use of **citrate** as the sole carbon source

Indole (IMViC tests)

- *E. coli* (pink/red) +
- *E. coli* (left side) –
- Kovac's reagent
- detects if tryptophan
- has been hydrolyzed
- to indol/tryptophanase



Methyl Red (MR) (IMViC tests)

*Enterobacter
aerogenes* (left) –

E. coli (bright red) +

Reagent: Methyl red

indicator identifies pH
change due to mixed
acid fermentation



Voges-Proskauer (VP) (IMViC tests)

Enterobacter aerogenes
+(left)

E. coli – (right)

Red colour is produced
after addition of alpha
naphthol and KOH

- *Klebsiella* +
- *E coli* -



Citrate utilization

- Ability to use sodium citrate as sole source of carbon
- Medium has sodium citrate, ammonium salt, bromothymol blue
- Positive test - deep blue colour in 24-48hrs
- Indicates citrate utilization
- Production of alkaline products

E. coli (left green) –

Enterobacter aerogenes
(right royal blue) +



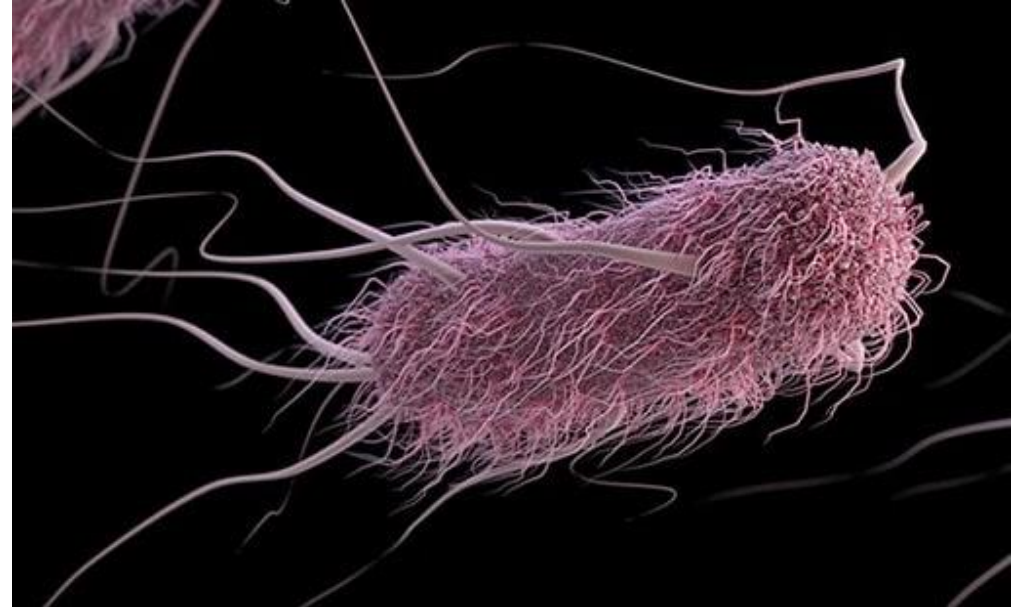
Positive

Negative

Escherichia coli

The scientific name for E. coli is Escherichia coli.

E. Coli are members of a large group of bacterial germs that inhabit the intestinal tract of humans and other warm blooded animals.



E. coli



EMB agar—Selective AND Differential

Eosine and methylene blue block are dyes that block the growth of gram (+) bacteria.

Why are gram (-) bacteria more resistant?

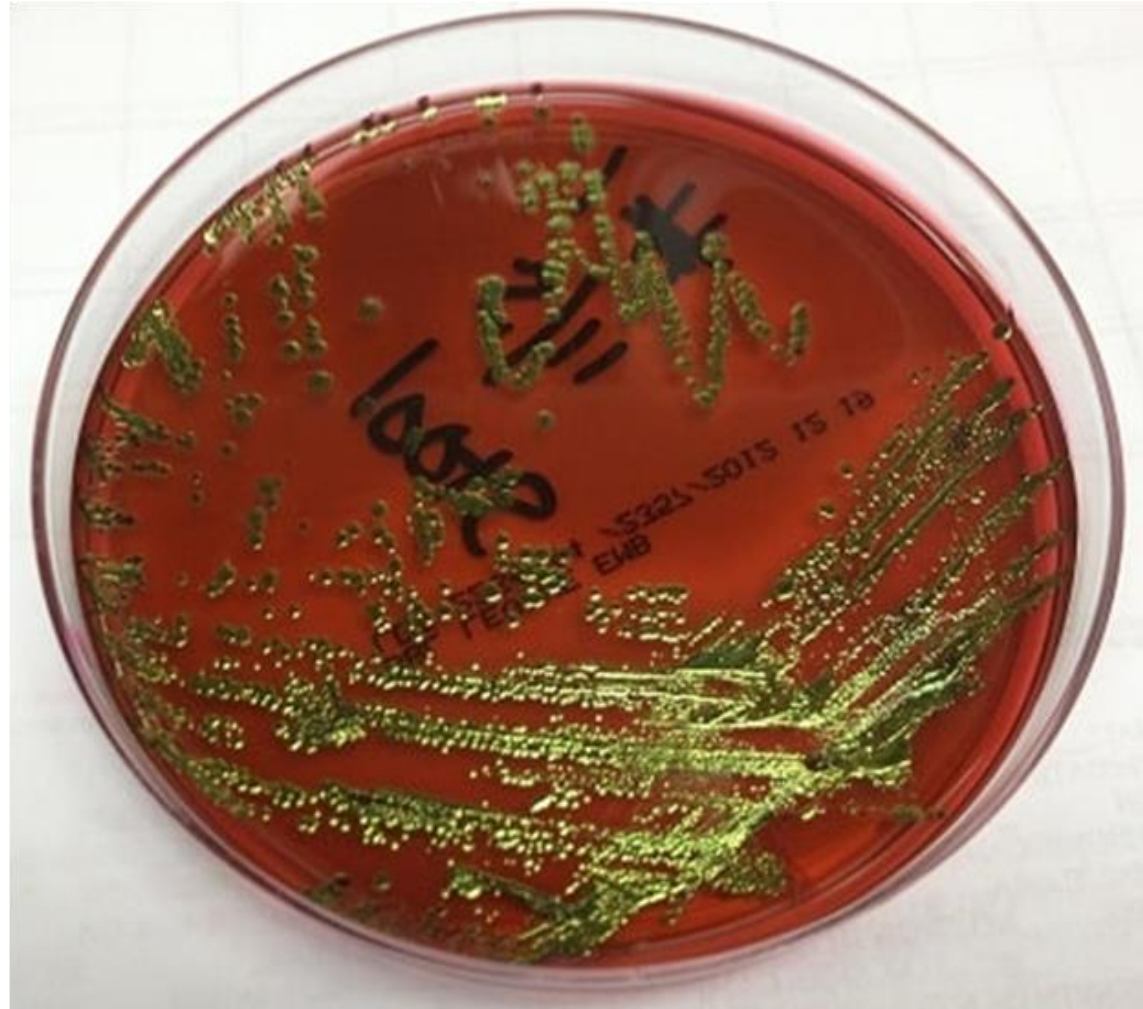
E. coli forms blue-black colonies with a green metallic sheen. (due to lactose fermentation)

E. aerogenes forms large mucoid pink to purple colonies with no metallic sheen.

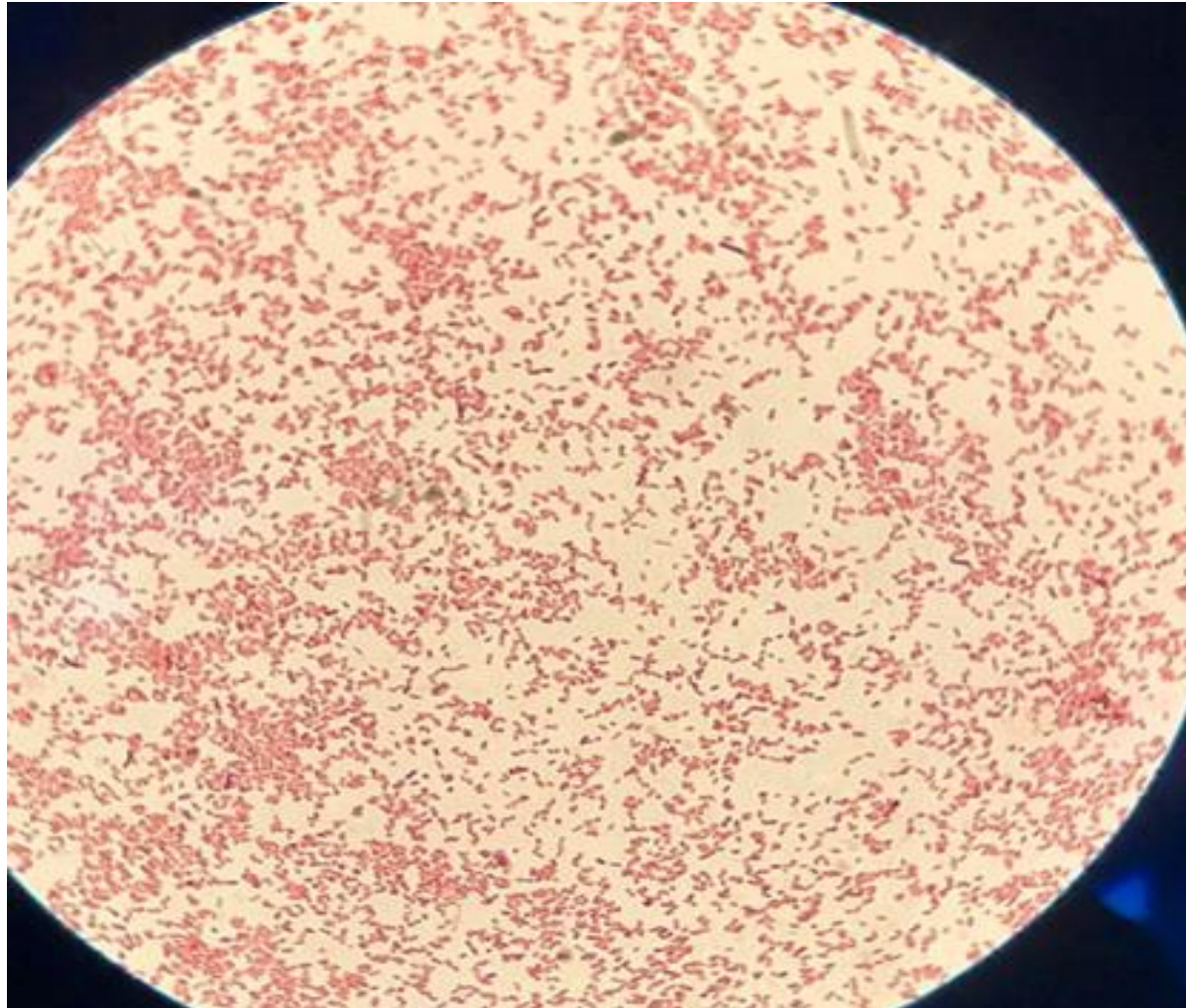
Salmonella large forms pink colonies.



جلای سبز فلزی اشرفیاشیا کلای
روی محیط EMB



لام رنگ آمیزی گرم اشريشيا كلای



BIOCHEMICAL TEST	<i>E. ALBERTII</i>	<i>E. BLATTAE</i>	<i>E. COLI</i>	<i>E. FERGUSONII</i>	<i>E. HERMANNII</i>	<i>E. VULNERIS</i>
Indole	-	-	+	+	+	-
Methyl red	+	+	+	+	+	+
Voges-Proskauer	-	-	-	-	-	-
Citrate	-	V (50)	-	V (17)	-	-
Lysine decarboxylase	+	+	+	+	-	V (85)
Arginine dihydrolase	-	-	V (17)	-	-	V (30)
Ornithine decarboxylase	+	+	V (65)	+	+	-
ONPG	+	-	+	V (83)	+	+
Fermentation of:						
Lactose	-	-	+	-	V (45)	V (15)
Sorbitol	-	-	+ ^a	-	-	-
Mannitol	+	-	+	+	+	+
Adonitol	-	-	-	+	-	-
Cellobiose	-	-	-	+	+	+
Yellow pigment	-	-	-	-	+	V (50)

^a Strains of *E. coli* belonging to serotype O157:H7 are sorbitol-negative.

+, 90% or more strains positive; -, 90% or more strains are negative; V, 11-89% of strains are positive.

اشریشیاکلی های مولد اسهال

- اشریشیا کلی انتروپاتوژنیک (EPEC): علت عمده اسهال کودکان در کشورهای توسعه نیافته است.
- اشریشیاکلی انتروتوکسیژنیک (ETEC): اسهال مسافران در کشورهای در حال توسعه است.
- اشریشیاکلی انترواینویسیو (EIEC): سویه های آن از نظر خصوصیات ظاهری و بیماری زایی شباهت زیادی به شیگلا دارند و باعث ایجاد اسهال شبه شیگلایی می شوند.
- اشریشیاکلی انتروهموراژیک (EHEC): یکی از عوامل اسهال های ناشی از مواد غذایی در کشورهای توسعه یافته است.
- اشریشیاکلی انترواگریگیتیو (EAEC): EAEC به عنوان یک پاتوژن نوظهور با شیوع روز افزون شناخته شده است.
- اشریشیاکلی با چسبندگی پراکنده (DAEC): اسهال غیرخونی در کودکان 1 تا 5 ساله ایجاد می کند.

انتقال بیماری می باشند . سروتایپ های اشیریشیا کلی انتروهموراژیک که عمدتاً " وابسته به بیماری هستند شامل موارد زیر می شود :

O111:H8 ،O103:H2 ،O26:H11 ،O9:NМ ،O5:NМ ،O2:H6 ،O1:NМ ،O91:NМ ،
O48:H21،O45:H2 ،O26:NМ ،O22:H5 ،O118:H16 ،O118:H12 ،O157:H7،O145:H28 ،
O104:NМ ،O91:H21 ،O153:H25 ،O153:H2 ،O83:H1،O79:H7 ،O55:H7 ،O50:H7 ،
O172:NМ ،O165:H25 ،O118:H2،O113:H21 ،O111:H2 ،O111:NМ ،O104:H21 ،
19 و O157:NМ.O121:H ،O145:NМ ،O137:H41 ،O128:H45 ،O128:H2 ،Orough:H9 ،
O165:NМ،O163:H19 ،O128:NМ ،O128:H19

اشریشیا کلای انترو هموراژیک:

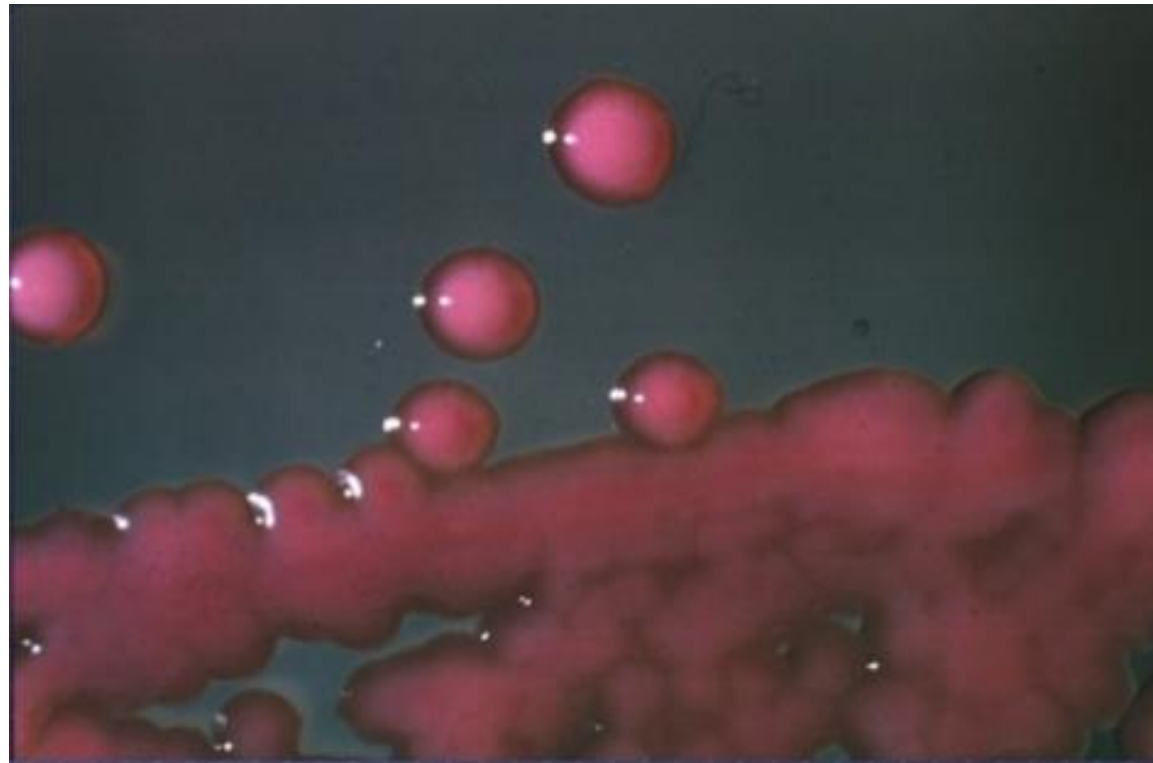
اشریشیاکلی انتروهموراژیک (EHEC) از جمله زیرگروه‌های اشریشیا کلی تولید کننده‌ی شیگا توکسین می‌باشند که باعث ایجاد کولیت هموراژیک و سندرم همولیتیک اورمیک در انسان می‌شوند. مهم‌ترین سروتایپ شایع، O157H7 می‌باشد که تاکنون باعث اپیدمی و مرگ و میر در کشورهای آمریکای شمالی، اروپا و کانادا شده است.

Klebsiella spp.

Lactose fermentor on MCA



Lactose positive Klebsiella sp.



Klebsiella

- *K pneumoniae*
- Present in respiratory tract and feces of about 5% of
- normal individuals.
- Can cause bacterial pneumonia (3%).
- Produce extensive hemorrhagic necrotising consolidation of lungs.

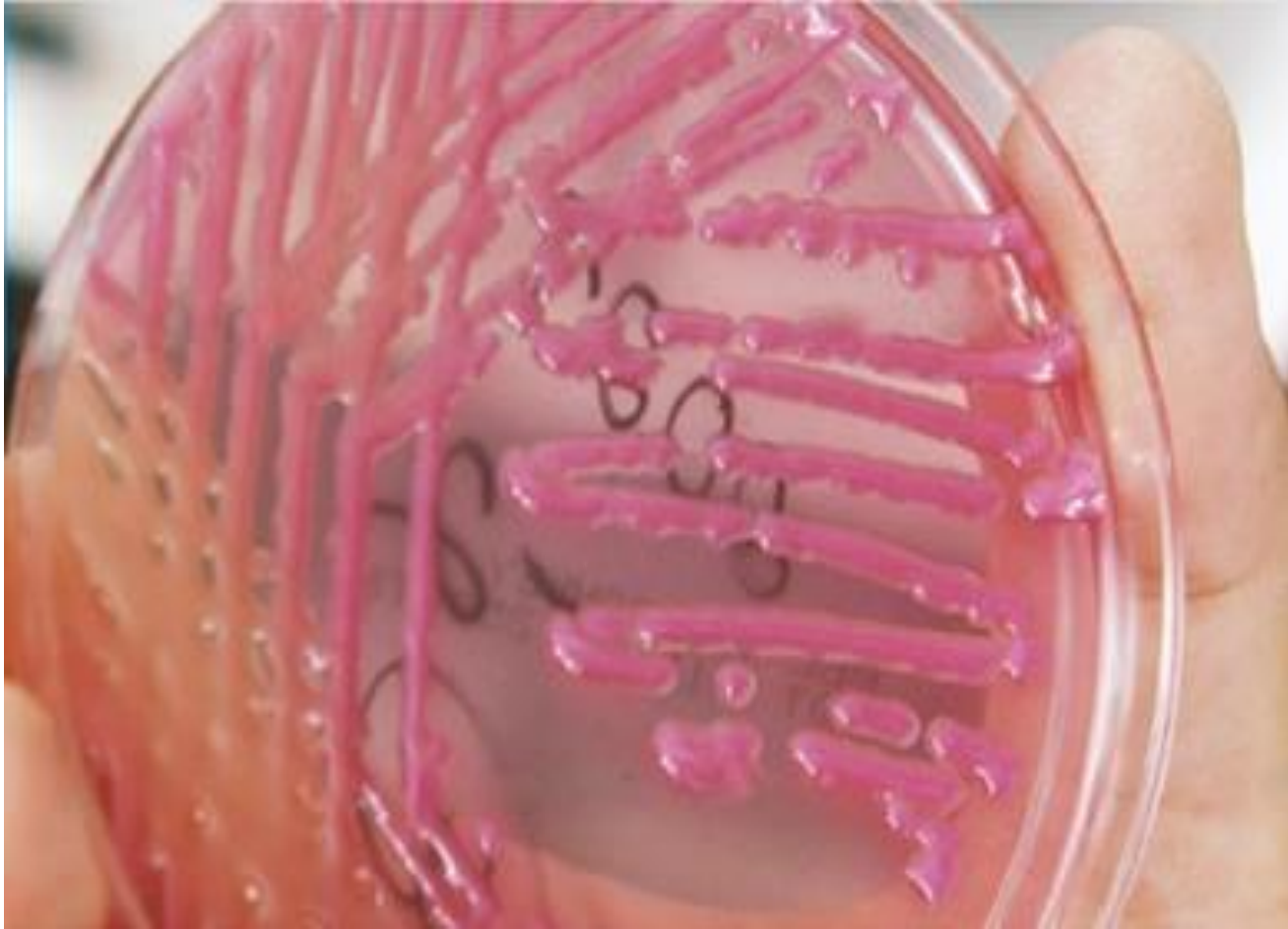
Morphology and culture characteristics

● Morphology

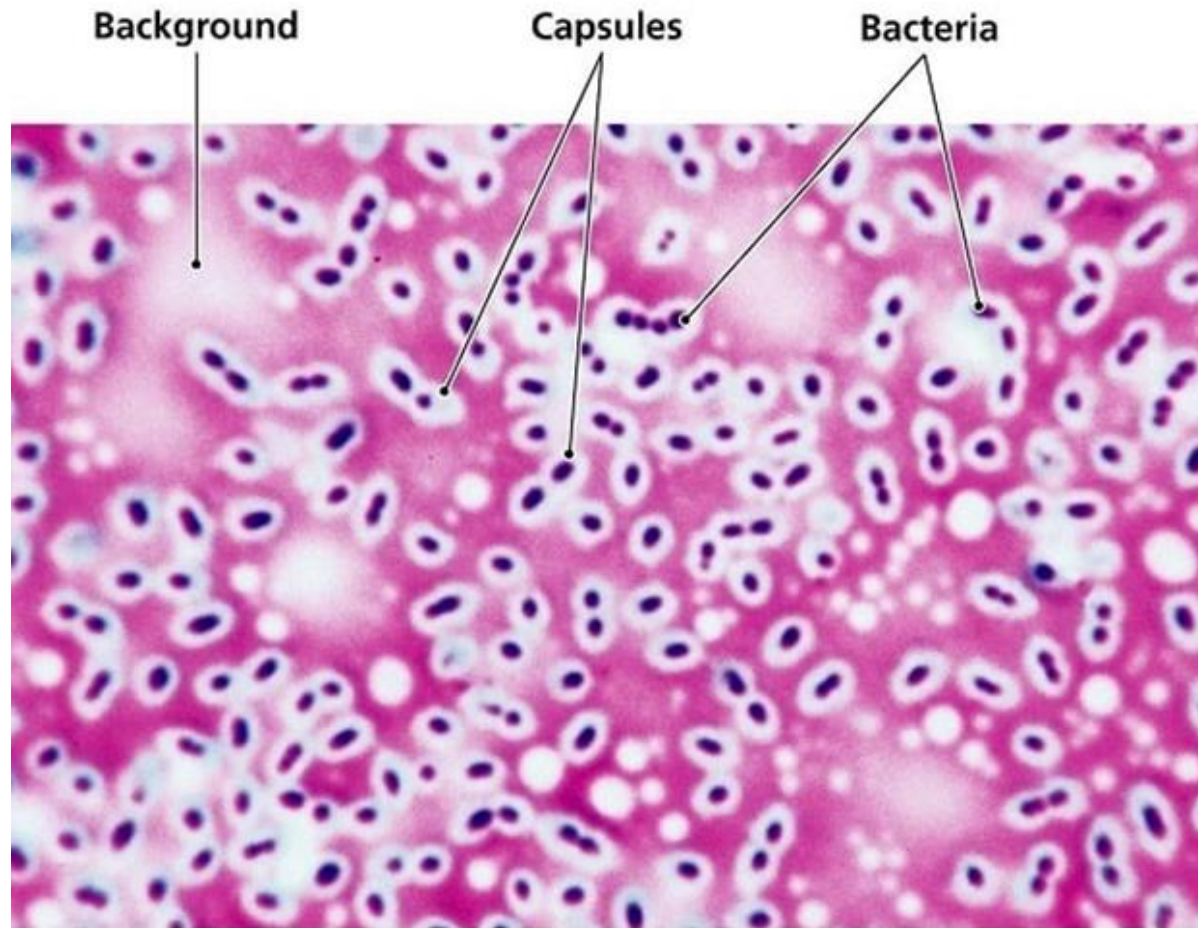
- Gram negative rods
- Non-spore former, capsulated and non-motile

● Culture characteristics

- **N.agar** – mucoid, circular, convex, small colonies
- **MacConkey** – mucoid, rose pink



رنگ آمیزی کپسول (کلبسیلا پنومونیه)



جدول ۱: خصوصیات کلیدی چهار گونه اصلی کلبسیلا

گونه	MR	VP	فعالیت اوره‌آز	تولید مالونات	تولید ایندول
کلبسیلا اکسی توکا	-	+	+	+	+
کلبسیلا اوزونه	+	-	-	-	-
کلبسیلا پنومونیه	-	+	+	+	-
کلبسیلا رینواسکلروماتیس	+	-	-	+	-

واکنش‌های بیوشیمیایی گونه‌های مختلف کلبسیلا

Characteristic	<i>Klebsiella pneumoniae</i>			<i>K. oxytoca</i>	<i>K. terrigena</i>	<i>K. planticola</i>	<i>K. ornithinolytica</i>
	subsp. <i>pneumoniae</i>	subsp. <i>ozaenae</i>	subsp. <i>rhinoscleromatis</i>				
Indole	–	–	–	+	–	v ^b	+
Ornithine decarboxylase	–	–	–	–	–	–	+
Lysine decarboxylase	+	v	–	+	+	+	+
Pectate degradation	–	–	–	+	–	–	–
Gas from lactose at 44.5°C	+	–	–	–	–	–	–
Growth at 10°C	–	–	–	+	+	+	+
Acid from:							
D-Melezitose	–	–	–	v	+	–	–
L-Sorbose	v			+	+	+	
Utilization of:							
<i>m</i> -Hydroxybenzoate	–	–	–	+	+	–	–
Hydroxy-L-proline	v			v	v	+	
Malonate	+	–	+	+	+	+	+
Methyl red test	–	+	+	–	+	v	+
Voges-Proskauer reaction	+	–	–	+	+	+	+

- Biochemical reactions

- IMViC: --++

- TSI: Acid butt/acid slant with gas production



با تشکر از توجه شما

