به نام خدا

GENERAL REVISION

MICROBIOLOGY LAB

By: **Dr. A. Mohammadi**

Department of Biology,
Faculty of science,
University of Alzahra

Dr A.MOHAMMADI

Selective and Differential Media

An example of the use of a selective medium

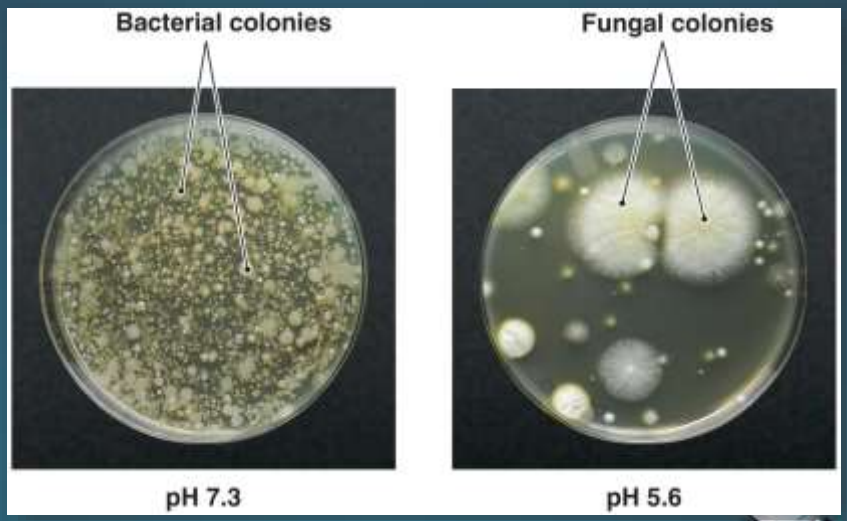


Figure 6.12

Dr A.MOHAMMADI

Selective/Specialized medium

- Some examples of selective media include:
- Eosin methylene blue (EMB) that contains methylene blue – toxic to Gram-positive bacteria, allowing only the growth of Gram negative bacteria
- YM (yeast and mold) which has a low pH, deterring bacterial growth
- MacConkey agar for Gram-negative bacteria
- Brilliant green agar, a medium that inhibits Gram-positive bacteria while permitting Gram-negative organisms such as *Salmonella* species to grow.

Selective/Special medium

- Hektoen enteric agar (HE) which is selective for Gram-negative bacteria
- Mannitol salt agar (MSA) which is selective for Gram-positive bacteria and differential for mannitol
- Terrific Broth (TB) is used with glycerol in cultivating recombinant strains of *Escherichia coli*.
- xylose lysine desoxyscholate (XLD), which is selective for Gram-negative bacteria
- Buffered charcoal yeast extract agar, which is selective for certain gram-negative bacteria, especially *Legionella pneumophila*

Dr A.MOHAMMADI

Differential media

- Blood agar which contains bovine heart blood that becomes transparent in the presence of hemolytic streptococcus.
- Eosin methylene blue (EMB), which is differential for lactose and sucrose fermentation.
- MacConkey (MCK), which is differential for lactose fermentation.
- Mannitol salt agar (MSA), which is differential for mannitol fermentation.
- violet red bile agar is used to distinguish coliform bacteria from noncoliform organisms.

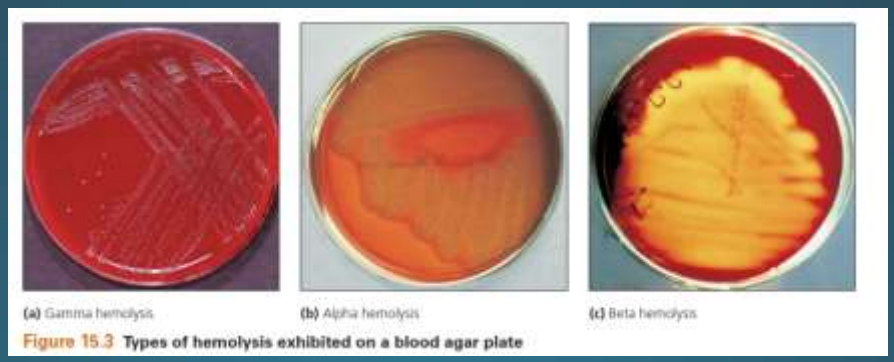
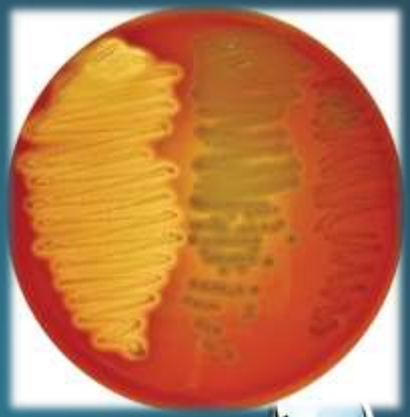


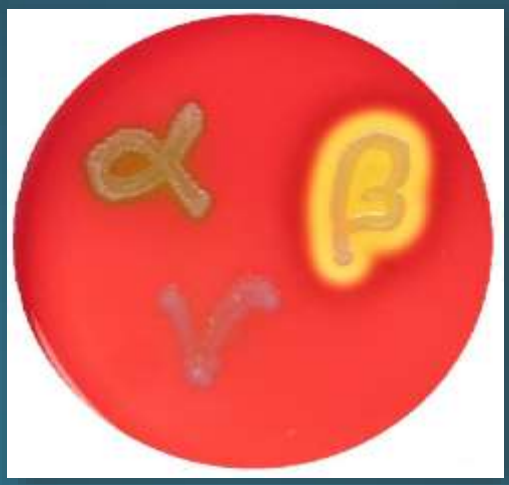
Figure 15.3 Types of hemolysis exhibited on a blood agar plate

Dr A.MOHAMMADI

The use of blood agar as a differential medium



Blood agar

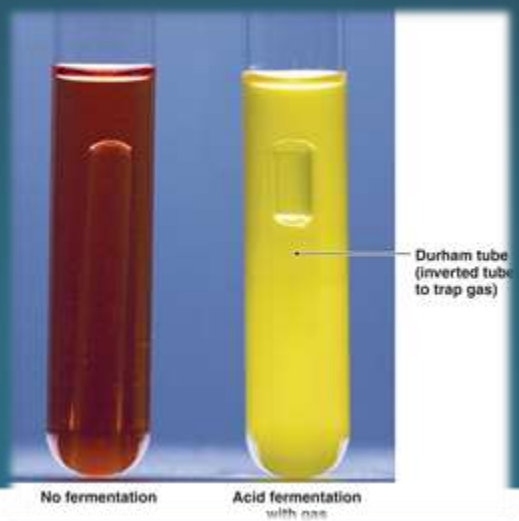


Hemolysins are exotoxins produced by bacteria which cause lysis of red blood cells *in vitro*.

9

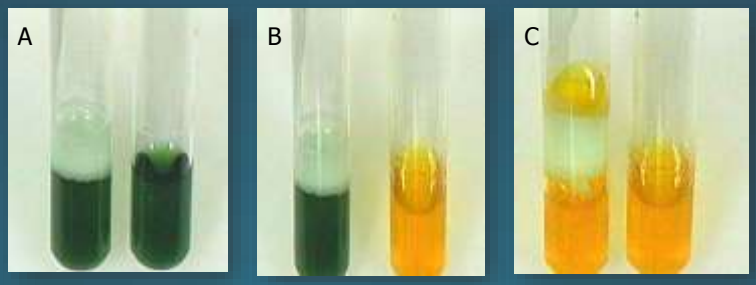
Dr A.MOHAMMADI

The use of carbohydrate tubes as differential media



10

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

Dr A.MOHAMMADI

Selective Media for Isolation of Gram-Positive Cocci

1) Phenylethyl Alcohol Agar,
2) Columbia CNA Agar,
3) Bile Esculin Agar,
4) Mannitol Salt Agar

- are all used to isolate streptococci, enterococci, or staphylococci In human samples

Bile Esculin Test

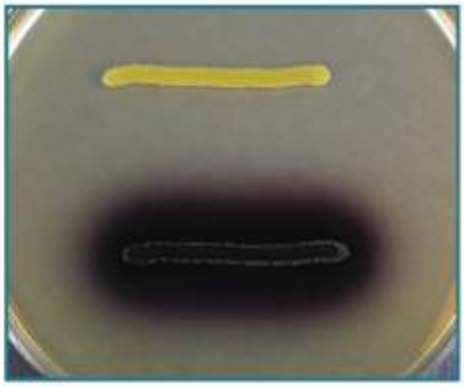
- آزمون بیل اسکولین (BET) اغلب برای شناسایی احتمالی انتروکوک‌ها و اعضای گروه استرپتوکوکوس بوویس که همگی گرم مثبت هستند، استفاده می‌شود. در واقع این آزمون جهت افتراق استرپتوکوک‌های گروه D از استرپتوکوک‌های غیر گروه D به کار می‌رود. .

- صفرا نیز به عنوان یک عامل انتخابی جهت جداسازی گروه استرپتوکوکوس بوویس و انتروکوک¬ها از دیگر استرپتوکوک¬ها به محیط افزوده شده است. ضمن اینکه سیترات فریک به عنوان منبع آهن اکسید شده برای نشان دادن یک تست مثبت در این محیط وجود دارد.

- بسیاری از باکتری‌ها قادرند اسکولین را در شرایط اسیدی هیدرولیز کنند و بسیاری از باکتری‌ها خصوصاً انتریک¬های گرم منفی نیز قادرند صفرا را تحمل نمایند. با این حال، در میان استرپتوکوک¬ها، به طور معمول تنها انتروکوک¬ها و گروه استرپتوکوکوس بوویس (S.equinus, S. gallolyticus, S. infantarius, and S. alactolyticus) می‌توانند صفرا را تحمل کرده و اسکولین را هیدرولیز کنند.

3

Dr A.MOHAMMADI



4-5 Bile Esculin Test Results ◆ This plate was inoculated with two Gram-positive cocci. The organism on the bottom is bile esculin-positive. The organism on the top is negative.

- در این آزمایش، در تجزیه اسکولین به اسکولتین و گلوکز، اسکولتین حاصله با آهن (Fe+3) سیترات فریک واکنش نشان داده و یک رسوب قهوه‌ای تیره ایجاد می‌کند .
- از نظر آزمون بیل اسکولین، مثبت در نظر گرفته می‌شود و در نقطه مقابل اگر قابلیت چنین کاری را نداشته باشد، منفی در نظر گرفته می‌شود

TABLE OF RESULTS

Result	Interpretation	Symbol
Medium is darkened within 48 hours	Presumptive identification as a member of Group D *Streptococcus* or *Enterococcus*	+
No darkening of the medium after 48 hours	Presumptive determination as not a member of Group D *Streptococcus* or *Enterococcus*	–

4

Phenylethyl Alcohol Agar

- فنیل اتیل الکل (PEA) یک محیط انتخابی (غیر افتراقی) برای جداسازی و افتراق استافیلوکوک¬ها و استرپتوکوک¬ها (شامل انتروکوک¬ها و لاکتوکوک¬ها) از نمونه‌های حاوی مخلوطی از باکتری‌ها است.
- هنگامی که همراه با ۵٪ خون گوسفند آماده شود، از آن می‌توان برای کشت بی‌هوازی¬های گرم مثبت استفاده کرد.
- فنیل اتیل به عنوان ماده مؤثره این محیط کشت با شکستن سد نفوذپذیری غشاء باکتری‌های گرم منفی باعث ورود مواد ممنوعه و همچنین نشت مقادیر زیادی از پتاسیم سلولی می‌شود. این مسئله در نهایت سنتز مولکول DNAی این باکتری‌ها را مختل و یا متوقف می‌کند
- پس از آماده کردن پلیت‌های فنیل اتیل الکل آگار از آن بوی گل رز به مشام می¬رسد

Dr A.MOHAMMADI

4-1 Nutrient Agar Versus Phenylethyl Alcohol Agar ✦ NA is on the left; PEA is on the right. Both plates were inoculated with the same three organisms—one Gram-positive coccus and two Gram-negative rods. All three organisms grow well on the NA, but only the Gram-positive organism (top) grows well on the PEA. Note the stunted growth of the Gram-negative rods on PEA.

TABLE **4-1** PEA Results and Interpretations

TABLE OF RESULTS

Result	Interpretation	Presumptive ID
Poor growth or no growth (P)	Organism is inhibited by phenylethyl alcohol	Probable Gram-negative organism
Good growth (G)	Organism is not inhibited by phenylethyl alcohol	Probable Staphylococcus, Streptococcus, Enterococcus, or Lactococcus

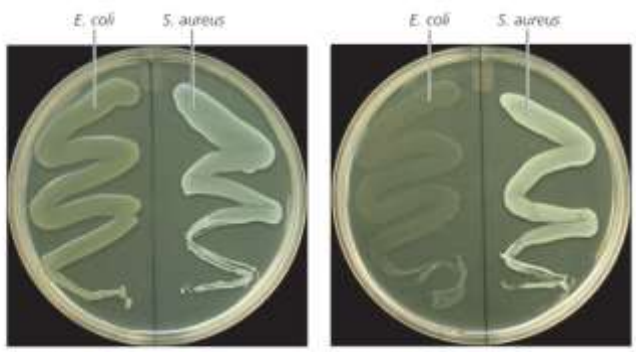


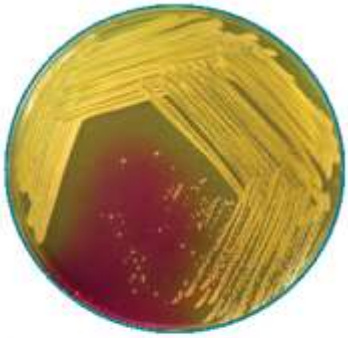
Figure 15.1 Selective effect of phenylethyl alcohol agar reduces the growth of *E. coli* and selects for *S. aureus*

Dr A.MOHAMMADI

Mannitol Salt Agar (MSA)

- MSA یک محیط بسیار انتخابی برای جداسازی و افتراق استافیلوکوک¬های بیماری‌زا به خصوص استافیلوکوکوس اورئوس از سایر اعضای خانواده میکروکوکاسه کاربرد دارد.
- مانیتول سوبسترایی برای تخمیر بوده و موجب افتراقی شدن این محیط می‌شود.
- کلرید سدیم موجود در MSAآن را به عنوان یک محیط انتخابی برای استافیلوکوک درآورده است چرا که غلظت بالای نمک موجود در محیط، رشد اکثر سوش¬های گرم منفی و گرم مثبت به‌جز استافیلوکوک اورئوس را مهار می‌کند.
- فنل رد به عنوان معرف pH، با تغییر رنگ مشخص می‌کند که آیا تخمیر صورت گرفته یا خیر؟ این معرف در pH پایین‌تر از ۶/۸ به رنگ زرد، در ۷/۴ تا ۸/۴ به رنگ قرمز و در pHبالای ۸/۴ به رنگ صورتی خواهد بود.

4-7 Mannitol Salt Agar ✦ This MSA was inoculated with two of the organisms used in today's lab. Both grew well, but only the top one fermented mannitol and produced acid end products. This is evidenced by the yellow growth and halo surrounding it. Compare this plate with the one in Figure 4-8 and see if you can identify the organisms.



4-8 Mannitol Salt Agar Streaked for Isolation ✦ This MSA was inoculated with the same two organisms as in Figure 4-7. The solid growth in the first three quadrants is still a mixture of the two organisms, so disregard the color in this region. Note the small red colonies and larger yellow colonies in the fourth streak.

TABLE **4-4** Mannitol Salt Agar Results and Interpretations

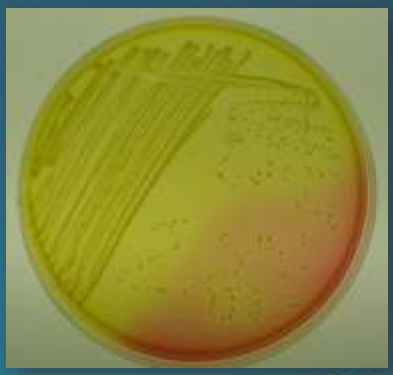
TABLE OF RESULTS

Result	Interpretation	Presumptive ID
Poor growth or no growth (P)	Organism is inhibited by NaCl	Not *Staphylococcus*
Good growth (G)	Organism is not inhibited by NaCl	*Staphylococcus*
Yellow growth or halo (Y)	Organism produces acid from mannitol fermentation	Possible pathogenic *Staphylococcus aureus*
Red growth (no halo) (R)	Organism does not ferment mannitol. No reaction	*Staphylococcus* other than *S. aureus*

Dr A.MOHAMMADI

Mannitol Salt agar

Staph. epidermidis



Staph. aureus

Mannitol Salt agar

Dr A.MOHAMMADI

Selective Media for Isolation of Gram-Negative Rods

1) MacConkey Agar,
2) Eosin Methylene Blue (EMB) Agar
3) Hektoen Enteric (HE) Agar,
4) Xylose Lysine Desoxycholate (XLD) Agar

MacConkey Agar (MAC)

- مک کانکی آگار یک محیط انتخابی و افتراقی برای تشخیص ارگانیسم‌های کلی‌فرم و پاتوژن¬های روده‌ای است.
- از این محیط با توجه به قابلیت تخمیر لاکتوز برای جداسازی و افتراق اعضای خانواده انتروباکتریاسه استفاده می‌شود.
- این محیط انواع مختلفی دارد ؛ مک کانگی آگار بدون کریستال ویوله (CS) که کوکسی‌های گرم مثبت در آن رشد می‌کنند و مک کانگی آگار دارای CS برای کنترل باکتری‌های سوارمینگ (پروتئوس) که در دیگر نتایج تداخل ایجاد می‌کنند.
- املاح صفراوی و کریستال ویوله مانع از رشد باکتری‌های گرم مثبت به‌ویژه انتروکوک‌ها و استافیلوکوک‌ها می‌شوند.
- نوترال رد به عنوان معرف pHدر محیط قلیایی (بالای ۸/۶) بی‌رنگ و در محیط اسیدی (زیر ۸/۶) قرمزرنگ است که از این ویژگی جهت نشان دادن خصوصیات افتراقی استفاده می‌شود.

Dr A.MOHAMMADI 3

Dr A.MOHAMMADI

TABLE 4-5 MacConkey Agar Results and Interpretations

TABLE OF RESULTS

Result	Interpretation	Presumptive ID
Poor growth or no growth (P)	Organism is inhibited by crystal violet and/or bile	Gram-positive
Good growth (G)	Organism is not inhibited by crystal violet or bile	Gram-negative
Pink to red growth with or without bile precipitate (R)	Organism produces acid from lactose fermentation	Probable coliform
Growth is "colorless" (not red or pink) (C)	Organism does not ferment lactose. No reaction	Noncoliform

4-9 MacConkey Agar • This MacConkey Agar was inoculated with four members of *Enterobacteriaceae*, all of which show abundant growth. The top organism and the one on the right are lactose fermenters, as evidenced by the pink color. Note the bile precipitate around the top organism. The organisms on the bottom and on the left produced no color, s they do not appear to be lactose fermenters.

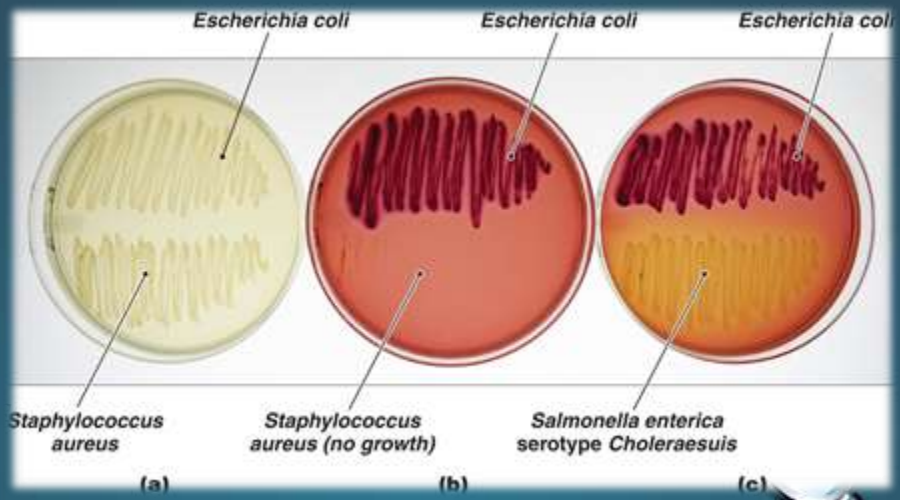
4

MacConkey agar

***MacConkey agar** will inhibit the growth of gram positive with the exception of **Enterococcus** and some spp. of **Staphylococcus** And allow **gram negative** to grow.*

Dr A.MOHAMMADI

MacConkey agar as a selective and differential medium



Eosin Methylene Blue Agar (EMB)

- محیط ائوزین متیلن بلو آگار(EMB) برای جداسازی کلی‌فرم‌های مدفوع استفاده می‌شود.
- دارای لاکتوز لذا افتراق دهنده تخمیرکنندگان از غیره
- دارای رنگ‌های ائوزین Yو متیلن بلو : ۱) آن‌ها رشد باکتری‌های گرم مثبت را مهار می‌کنند ۲) آن‌ها با تخمیرکنندگان شدید لاکتوز واکنش داده و (در محیط اسیدی) محیط را به رنگ ارغوانی تیره یا سیاه درمی‌آورند.
- این رشد تیره مختص اشرشیا کلی نسبت به سایر باکتری‌های روده‌ایی بوده و معمولاً همراه با یک جلای فلزی سبزرنگ رخ می‌دهد .
- علت جلای فلزی بودن باکتری اشرشیا کلی رسوب ائوزین است.
- دیگر تخمیرکنندگان ملایم لاکتوز همچون انتروباکتر یا کلبسیلا کلنی‌هایی ایجاد می‌کنند که می‌تواند از صورتی‌رنگ تا ارغوانی تیره باشد.
- باکتری‌های تخمیرکننده سوکروز و باکتری‌هایی که قادر به تخمیر لاکتوز نمی‌باشند، رنگ طبیعی خود را حفظ کرده یا اینکه رنگ محیط کشت را می‌گیرند.

Dr A.MOHAMMADI

TABLE OF RESULTS

Result	Interpretation	Presumptive ID
Poor growth or no growth (P)	Organism is inhibited by eosin and methylene blue	Gram-positive
Good growth (G)	Organism is not inhibited by eosin and methylene blue	Gram-negative
Growth is pink and mucoid (Pi)	Organism ferments lactose with little acid production	Possible coliform
Growth is "dark" (purple to black, with or without green metallic sheen) (D)	Organism ferments lactose and/or sucrose with acid production	Probable coliform
Growth is "colorless" (no pink, purple, or metallic sheen) (C)	Organism does not ferment lactose or sucrose. No reaction	Noncoliform

4-12 Eosin Methylene Blue Agar • This EMB Agar was inoculated with (clockwise from the top) two coliforms, a Gram-negative noncoliform, and a Gram-positive organism. Note the characteristic green metallic sheen of the coliform at the top and the pink coloration of the one at the right. Both organisms are lactose fermenters; the difference in color results from the degree of acid production. The organism on the bottom is a nonfermenter, as indicated by the lack of color. Growth of the Gram-positive organism on the left was inhibited by eosin Y and methylene blue.

Results

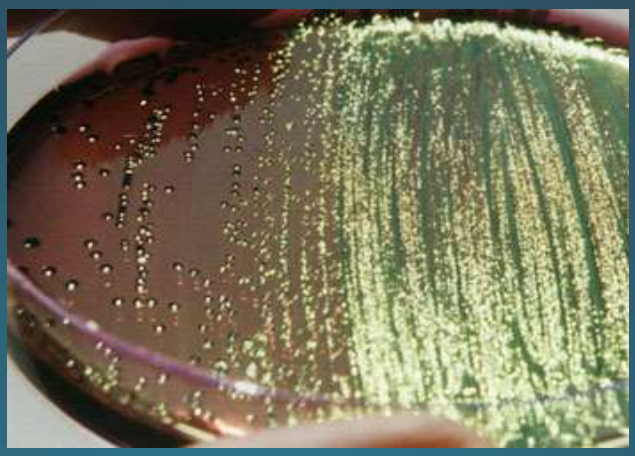
Large amounts of acid from lactose fermentation cause the dyes to precipitate on the colony surface, producing a black center or a "green metallic sheen" (*E. coli)*

Smaller amounts of acid production result in pink coloration of the growth (*E. aerogenes)*

Nonfermenting enterics do not produce acid so their colonies remain colorless or take on the color of the media (*P. vulgaris)*

No growth indicates a Gram + organism (*S.aureus)*

Dr A.MOHAMMADI



•Large amounts of acid from lactose fermentation cause the dyes to precipitate on the colony surface, producing a black center or a "green metallic sheen" (*E. coli)*

Escherichia coli on L-EMB agar

Dr A.MOHAMMADI

Lactose non-fermenter on L-EMB agar

Lactose fermenter on L-EMB agar

Dr A.MOHAMMADI

GENERAL REVISION

- Gram Stain.
- Acid Fast Stain.
- Endosperm Stain.
- Capsule Stain.
- Flagella Stain.
- Motility test.
- Catalase test.
- Oxidase test.
- Urease test.
- Coagulase test.
- Gelatin liquefaction test.
- Starch hydrolysis test.
- IMViC tests.
- Nitrate reduction test.
- Single media / Multiple tests.
- Selective and Differential media.
- Oxidation Fermentation medium.

Bacterial Staining

- Differential Stains:
  - I. Gram Stain.
  - II. Acid Fast Stain.
- Special Stains:
  - I. Endospore Stain.
  - II. Capsule Stain.
  - III. Flagella Stain.

Dr A.MOHAMMADI

Gram Stain

Gram Positive

- i. bacilli
- ii. cocci

Gram Negative

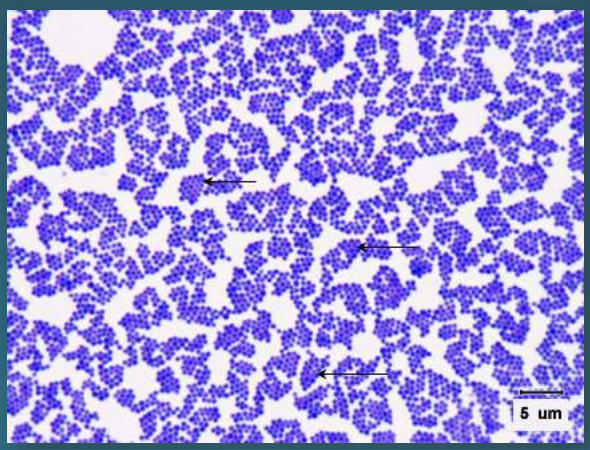
- i. bacilli
- ii. cocci

Gram Positive bacilli

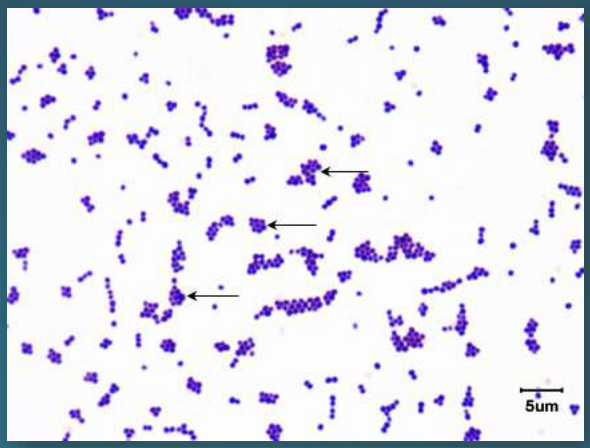
Dr A.MOHAMMADI

Dr A.MOHAMMADI

Gram positive cocci



Gram positive cocci



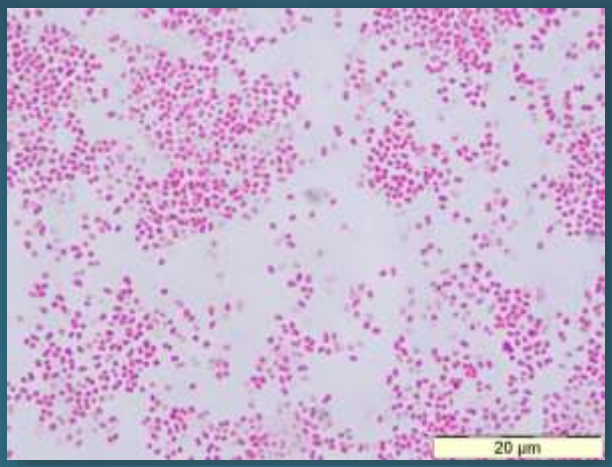
Dr A.MOHAMMADI

Gram positive cocci

Gram negative bacilli

Dr A.MOHAMMADI

Gram negative cocci

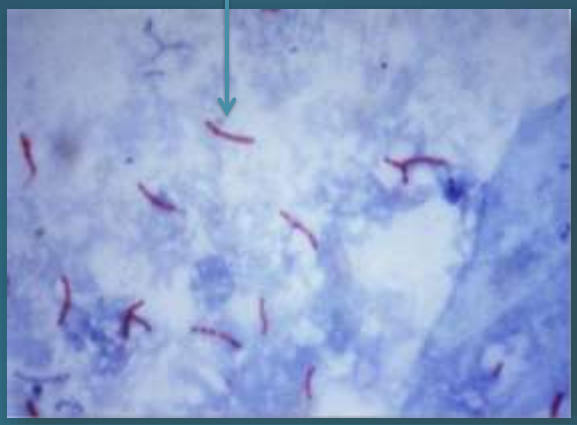


Acid Fast Stain

Ziehl neelson method

Dr A.MOHAMMADI

Acid Fast bacilli



Endospore Stain

Schaffer Fulton method

Dr A.MOHAMMADI

Endospore Stain

Schaffer Fulton method

Capsule Stain

I. Gin's method
II. Anthony's method

Dr A.MOHAMMADI

Capsule Stain

I. Gin's method

Capsule Stain

II. Anthony's method

Dr A.MOHAMMADI

Motility test

I. Semisolid media
II. Flagella stain
III. Hanging drop technique

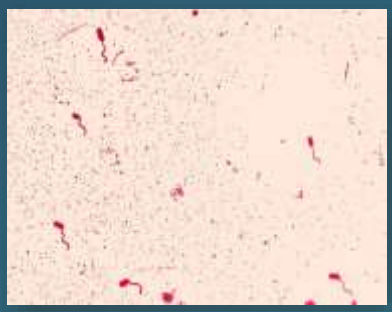
Motility test

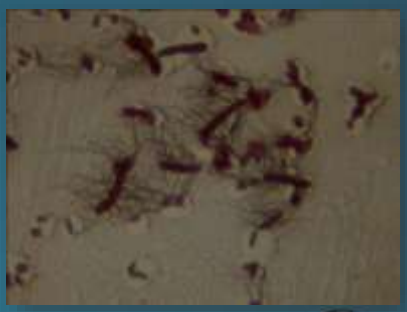
I.Semisolid media

Dr A.MOHAMMADI

Motility test

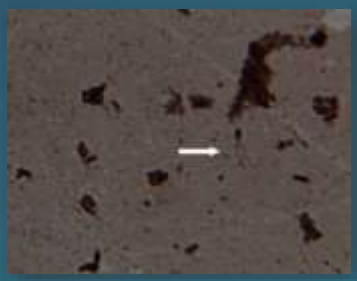
II. Flagella stain (leifson method)





Motility test

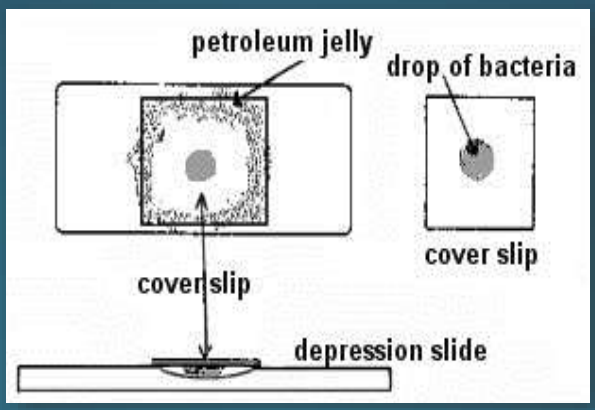
II. Flagella stain (presque isle method)



Dr A.MOHAMMADI

Motility test

III.Hanging drop technique



Biochemical tests

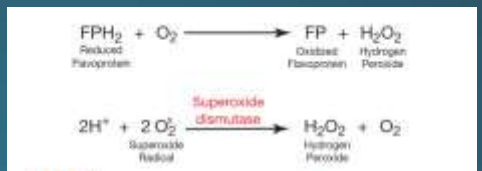
I. Catalase test.
II. Oxidase test.
III. Coagulase test.
IV. Gelatin liquefaction test.
V. Starch hydrolysis test.
VI. Urease test.
VII. IMViC tests.
VIII. Nitrate reduction test.
IX. Single media / Multiple tests.
X. Selective and Differential media.
XI. Oxidation Fermentation medium.

Dr A.MOHAMMADI

Ability to Respire

1-Catalase test

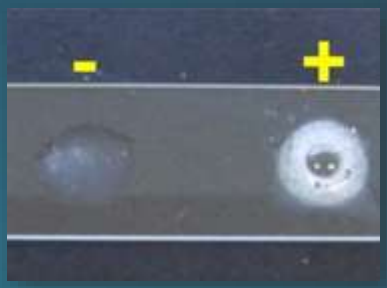
- این تست به شناسایی موجوداتی که قادرند آنزیم کاتالاز تولید کنند، کمک می‌کند. معمولاً از این تست برای افتراق اعضای کاتالاز مثبت خانواده میکروکوکاسه از اعضای کاتالاز منفی خانواده استرپتوکوکاسه استفاده می‌شود. ضمن اینکه مشتقاتی از این تست نیز برای شناسایی گونه‌های مایکوباکتریوم بکار می‌رود.



5-15 Microbial Production of H_2O_2 • Hydrogen peroxide may be formed through the transfer of electrons from reduced flavoprotein to oxygen or from the action of superoxide dismutase.

5-16 Catalase Mediated Conversion of H_2O_2 • Catalase is an enzyme of aerobes, microaerophiles, and facultative anaerobes that converts hydrogen peroxide to water and oxygen gas.

Catalase test



برای تشخیص اینکه یک باکتری خاص می‌تواند آنزیم کاتالاز را بسازد یا نه، مقدار کمی از باکتری را با یک قطره محلول ۳ درصد پراکسید هیدروژن مخلوط می‌کنیم. در صورت مشاهده‌ی حباب‌های کوچک گاز اکسیژن، نتیجه‌ی تست مثبت است

Dr A.MOHAMMADI

Ability to Respire

2- Oxidase test

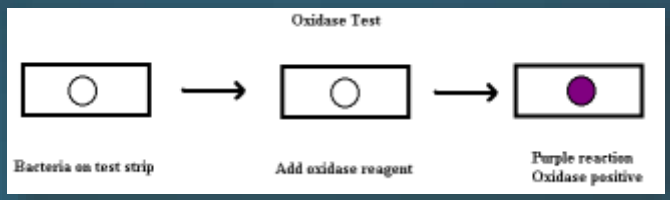
- این تست برای شناسایی باکتری‌های دارای آنزیم تنفسی سیتوکروم اکسیداز C بکار می‌رود.
- در میان کاربردهای فراوان این تست، شناسایی احتمالی نایسریا اکسیداز مثبت قرار دارد.
- این تست همچنین در جداسازی انتروباکتریاسه‌ها همانند گونه‌های استافیلوکوکوس و استرپتوکوکوس (که همه اکسیداز منفی هستند) از باکتری‌هایی مثل سودوموناس، ویبریوناسه، آئروموناس، کمپیلوباکتر و پاستورلا (که همه اکسیداز مثبت‌اند) مفید است.
- ضمن اینکه در شناسایی ارگانیسم‌هایی که فاقد آنزیم سیتوکروم اکسیدازند یا بی‌هوازی اجباری‌ها کاربرد دارد.

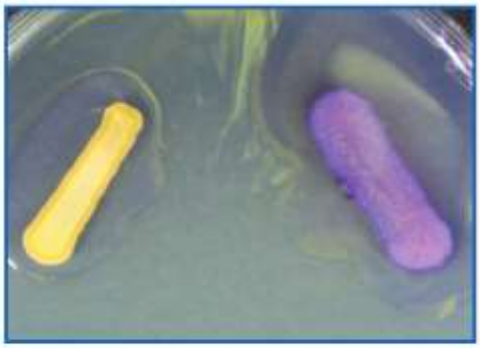
Ability to Respire

2- Oxidase test

- در تست اکسیداز، عامل احیاءکننده (معرف کواکس، معرف گوردون و مک لئود و ...) مستقیماً به محیط کشت جامد باکتریایی یا یک کلنی باکتریایی به یک کاغذ آغشته به عامل احیاءکننده افزوده می‌شود.
- اگر عامل احیاءکننده اکسید شود، در کسری از ثانیه می‌توان تغییر رنگ را مشاهده کرد که نشان‌دهنده حضور آنزیم سیتوکروم اکسیداز C است؛ اما عدم تغییر رنگ در زمان مشخص شده، نشان دهنده منفی بودن تست و نبود این آنزیم می‌باشد.
- بعضی از میکروارگانیسم‌ها اکسیداز متغیر و یا اکسیداز مثبت تأخیری می‌باشند.
- تنوع در واکنش اکسیداز میکروارگانیسم‌ها به متفاوت بودن ترکیب سیتوکروم C، تنوع در سیتوکروم اکسیداز و تنوع در ترکیب زنجیره انتقالی مرتبط است.

Oxidase test





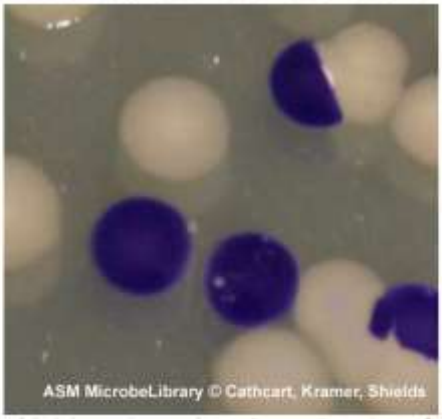
5-21 Oxidase Test on Bacterial Growth ✦ A few drops of reagent on oxidase-positive bacteria will produce a purple-blue color immediately.

5-22 Oxidase Slide Test ✦ Positive results with this test should appear within 20 seconds. The dark blue is a positive result. No color change is a negative result. The organism in the top right panel demonstrates a negative result (not blue) but appears yellow because it is pigmented. (BBL™ DrySlide™ systems available from Becton Dickinson, Sparks, MD.)

Dr A.MOHAMMADI

نتیجه تست اکسیداز در روش کاغذ صافی: در سمت چپ، باکتری اکسیداز مثبت سودوموناس آئروژینوزا و در سمت راست، اشرشیا کلی اکسیداز منفی را مشاهده می کنید.

نتیجه تست اکسیداز در روش کاغذ صافی: در سمت چپ، باکتری اکسیداز مثبت سودوموناس آئروژینوزا و در سمت راست، اشرشیا کلی اکسیداز منفی را مشاهده می کنید.



نتیجه تست اکسیداز در روش مستقیم روی پلیت: در این تصویر کشت مخلوطی از اشرشیا کلی اکسیداز منفی و ویبریو کلرا اکسیداز مثبت را مشاهده می کنید و اینکه چگونه تست اکسیداز موجب افتراق این دو شده است.

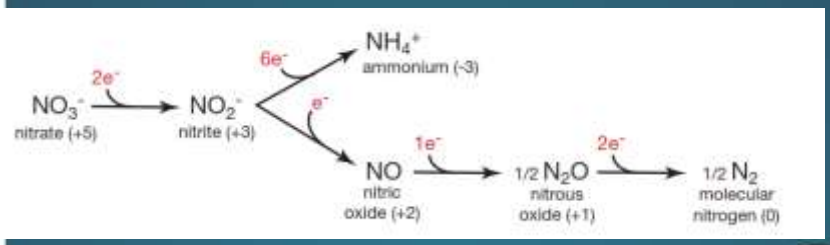
Dr A.MOHAMMADI

تست اکسیداز در لوله آزمایش:
در سمت چپ، باکتری اکسیداز مثبت *Neisseria sicca* و در سمت راست، استافیلوکوکوس آرئوس اکسیداز منفی را مشاهده می کنید. پس از ۲۴ ساعت از کشت باکتری ها، معرف گیای و هادلی به هر لوله افزوده شد.

Ability to Respire

3- Nitrate reduction test

- تقریباً تمام اعضای انتروباکتریاسه احیای یک مرحله‌ای نیترات به نیتریت را انجام می‌دهند.
- تست احیای نیترات برای افتراق آن‌ها از باکتری‌های میله‌ای گرم منفی استفاده می‌شود که باکتری‌های اخیر قادر به احیای نیترات نبوده یا اینکه نیترات را به N2یا دیگر ترکیبات احیاء می‌کند.



اعضای انتروباکتریاسه به سادگی نیترات را نیتریت احیاء می‌کنند. سایر باکتری‌ها که جزو شوره‌زداها و در چرخه نیتروژن بسیار مهم هستند، NO_3را از طریق واسطه‌هایی به N_2تبدیل می‌کنند. دیگر موجودات نیز به طور مشابهی قادر به احیای نیترات هستند که در آن NO_3به NH_4احیاء می‌شود که می‌تواند در سنتز اسیدآمینه استفاده شود..

Dr A.MOHAMMADI 35

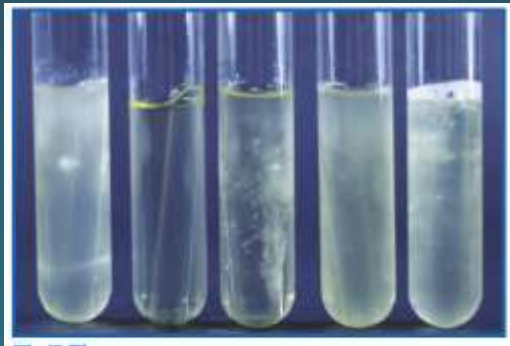
Dr A.MOHAMMADI

Ability to Respire

3- Nitrate reduction test

- محیط نیترات براث یک محیط غیراختصاصی از عصاره گوشت، پپتون و نیترات پتاسیم (KNO_3) است.
- یک لوله دُرهام وارونه در هر براث قرار داده می‌شود تا هرگونه گاز تولیدی جمع‌آوری شود.
- برخلاف بسیاری از محیط‌های افتراقی، هیچ معرف رنگی در این محیط یافت نمی‌شود.
- بررسی وجود دِنیتریفیکاسیون: بررسی چشمی برای حضور گاز در لوله دُرهام انجام می‌شود (شکل). اگر این لوله دارای گاز بوده و باکتری موردنظر تخمیرکننده نباشد (شناسایی از طریق تست تخمیر)، تست، کامل و دِنیتریفیکاسیون انجام شده است.
- گاز تولید شده توسط یک باکتری تخمیرکننده در تست احیای نیترات، تعیین‌کننده نیست چرا که منشأ گاز مشخص نیست.

Dr A.MOHAMMADI 36



5-25 Incubated Nitrate Broth Before the Addition of Reagents ✦ Numbered 1 through 5 from left to right, these are Nitrate Broths immediately after incubation before the addition of reagents. Tube 2 is an uninoculated control used for color comparison. Note the gas produced by tube 5. It is a known nonfermenter and, therefore, will receive no reagents. The gas produced is an indication of denitrification and a positive result. Tubes 1 through 4 will receive reagents. See Figure 5-26.

Dr A.MOHAMMADI

5-26 Incubated Nitrate Broth After Addition of Reagents ✦ After the addition of reagents, tube 1 shows a positive result. Tube 3 and tube 4 are inconclusive because they show no color change. Zinc dust must be added to tubes 2 (control), 3, and 4 to verify the presence or absence of nitrate. See Figure 5-27.

اگر شاهدی در خصوص دِنیتریفیکاسیون دیده نشود، دو معرف اسید سولفانیلیک (معرف A) و نفتیل آمین (معرف B) برای بررسی احیای نیترات به نیتریت، به محیط افزوده می‌شود. نیتریت در صورت وجود، در محیط آبی اسید نیتروز (HNO_2) ایجاد می‌کند. اسید نیتروز با معرف‌های افزوده شده واکنش داده و یک ماده قرمز رنگ محلول در آب تولید می‌کند .

اگر تغییر رنگی ایجاد نشود، احتمالاً نیترات احیاء نشده یا اینکه به دیگر ترکیبات نیتروژن دار (مثل نیتروژن مولکولی) احیاء شده است. به دلیل اینکه تشخیص میان این دو حالت به صورت چشمی غیرممکن می‌باشد بایستی از تست دیگری کمک گرفته شود.

5-27 Incubated Nitrate Broth After Addition of Reagents and Zinc + Finally, a pinch of zinc is added to tubes 2, 3, and 4 because they have been colorless up to this point. Tube 2 (the control tube) and tube 3 turned red. This is a negative result because it indicates that nitrate is still present in the tube. Tube 4 did not change color, which indicates that the nitrate was reduced by the organism beyond nitrite to some other nitrogenous compound. This is a positive result.

افزودن مقدار کمی از پودر فلز روی به براث تا هر گونه نیترات موجود (که همچنان ممکن است به صورت KNO3موجود باشد) به نیتریت احیاء شود.

اگر باکتری‌ها یون‌های نیترات را احیاء نکرده باشند و لذا نیترات در هنگام افزودن روی در محیط موجود باشد، بلافاصله توسط روی به نیتریت تبدیل شده و با توجه به واکنش اسید نیتروز و معرف‌ها، رنگ قرمز در محیط ظاهر خواهد شد. در چنین مواردی، ظهور رنگ قرمز حاکی از عدم احیای نیترات توسط میکروارگانیسم و منفی بودن تست می‌باشد؛ اما اگر با افزودن روی هیچ تغییر رنگی مشاهده نشود، نتیجه‌ی آزمایش احیای نیترات مثبت می‌باشد.

در چنین مواقعی به دلیل احیای نیترات به NH3، NO، N2Oو یا دیگر ترکیبات نیتروژنی هیچ نیتراتی در محیط وجود ندارد.

Dr A.MOHAMMADI

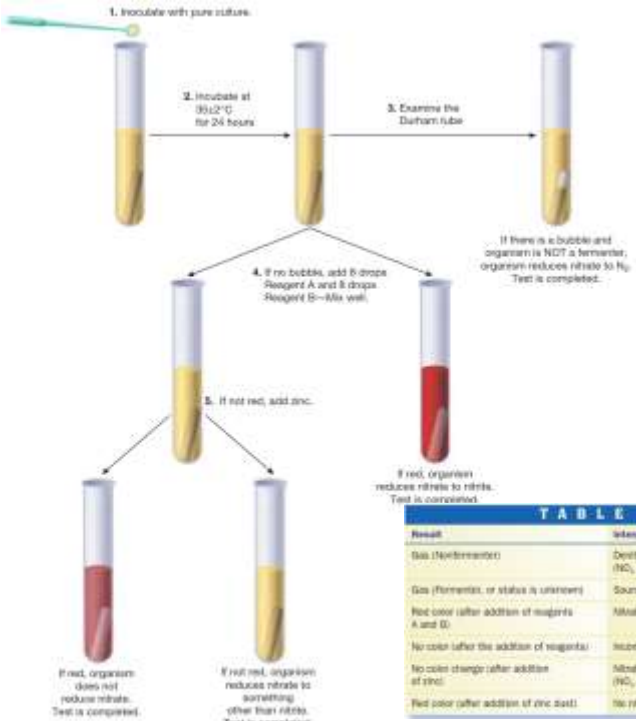


TABLE OF RESULTS

Result	Interpretation	Symbol
Gas (fermenter)	Denitrification—production of nitrogen gas ($NO_3^- \rightarrow NO_2^- \rightarrow N_2$)	+
Gas (fermenter, or status is unknown)	Source of gas is unknown; requires addition of reagents	
Red color (after addition of reagents A and B)	Nitrate reduction to nitrite ($NO_3^- \rightarrow NO_2^-$)	+
No color (after the addition of reagents)	Incomplete test; requires the addition of zinc dust	
No color change (after addition of zinc)	Nitrate reduction to nongaseous nitrogenous compounds ($NO_3^- \rightarrow NO_2^- \rightarrow$ nongaseous nitrogenous products)	+
Red color (after addition of zinc dust)	No nitrate reduction	–

Coagulase test

- معمولاً برای تمایز استافیلوکوکوس اورئوس از سایر کوکسی‌های گرم مثبت به کار گرفته می‌شود.
- یکی از دلایل مقاومت این باکتری، تولید آنزیم کواگولاز است. کواگولاز با همکاری ترکیبات طبیعی پلاسما، سد فیبرینی محافظتی را اطراف سلول‌های منفرد باکتری یا تجمع سلولی ایجاد می‌کند تا آن‌ها را از فاگوسیتوز یا سایر حملات محافظت کند.

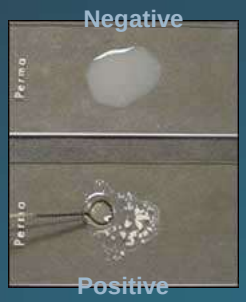
- آنزیم‌های کواگولاز به دو شکل آزاد و باند شده (فاکتور کلامپ) وجود دارند.
- تست لوله‌ای حضور کواگولاز آزاد و باند شده به دیواره را تشخیص می‌دهد و تست اسلایدی فقط کواگولاز باند شده را شناسایی می‌کند.
- هر دو تست از پلاسما خرگوش تیمار شده با آنتی-کواگولانت به منظور قطع مکانیسم طبیعی لخته شدن استفاده می¬کنند.

Dr A.MOHAMMADI 71

Dr A.MOHAMMADI

Coagulase test

Negative



Positive

Slide method

Positive

Negative

Tube method

TABLE 5-32 Coagulase Slide Test Results and Interpretations

TABLE OF RESULTS

Result	Interpretation	Symbol
Clumping of cells	Plasma has been coagulated	+
No clumping of cells	Plasma has not been coagulated	–

TABLE 5-33 Coagulase Tube Test Results and Interpretations

TABLE OF RESULTS

Result	Interpretation	Symbol
Medium is solid	Plasma has been coagulated	+
Medium is liquid	Plasma has not been coagulated	–

72

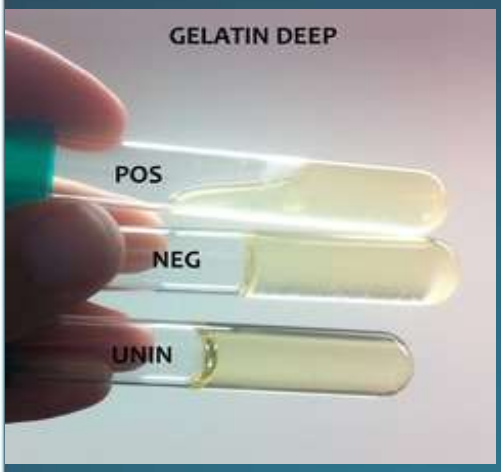
Gelatin liquefaction test

- 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.

Dr A.MOHAMMADI 73

Dr A.MOHAMMADI

Gelatin liquefaction test

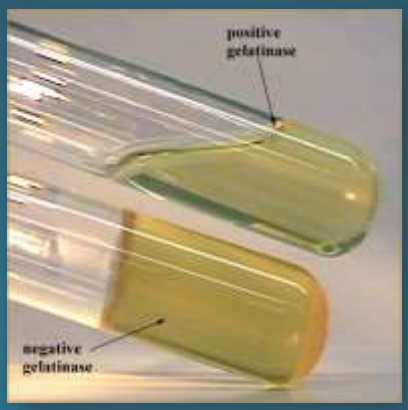


- یکی از اشکالات جزئی محیط ژلاتین غذایی، ذوب شدن آن در دمای ºC 28است؛ بنابراین همراه با لوله‌های تست بایستی نمونه کنترل نیز در دمای ºC 25 گرمخانه‌گذاری شود تا تأیید شود که مایع شدن محیط به دلیل گرما نبوده است.

Dr A.MOHAMMADI 74

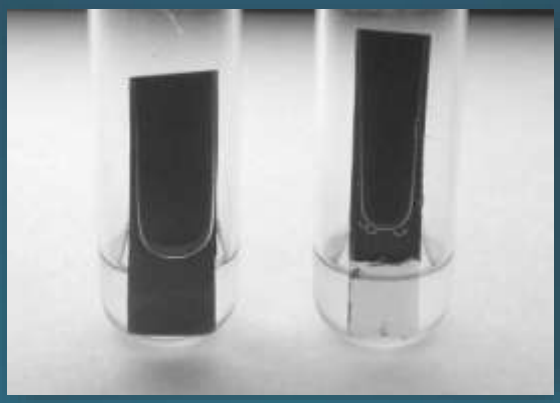
Gelatin liquefaction test

Nutrient Gelatin



Dr A.MOHAMMADI

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.

Starch hydrolysis test

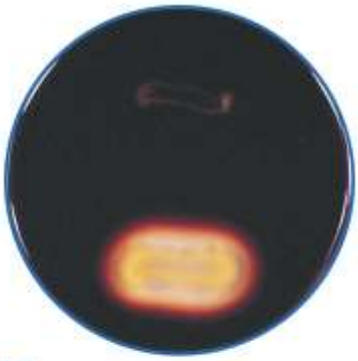
- هنگامی که میکروارگانیسم‌های دارای آنزیم‌های آلفا آمیلاز و الیگو-۱،۶-گلیکوزیداز به محیط نشاسته آگار وارد شوند می‌توانند نشاسته اطراف محیط خود را هیدرولیز کنند.
- با توجه به بی‌رنگ بودن نشاسته و زیرواحدهای آن در محیط کشت با کمک معرف یُد می‌توان آن‌ها را در اطراف رشد باکتری مشاهده کرد.
- وقتی که یُد با 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.

Dr A.MOHAMMADI

TABLE 5-12 Amylase Test Results and Interpretations

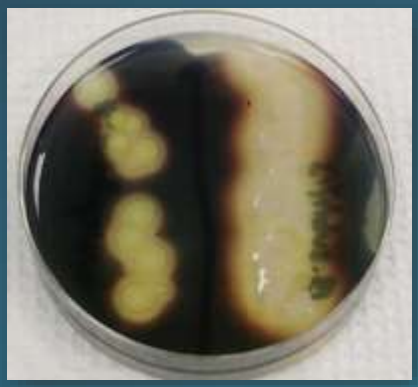
TABLE OF RESULTS

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

Dr A.MOHAMMADI

IMViC tests:

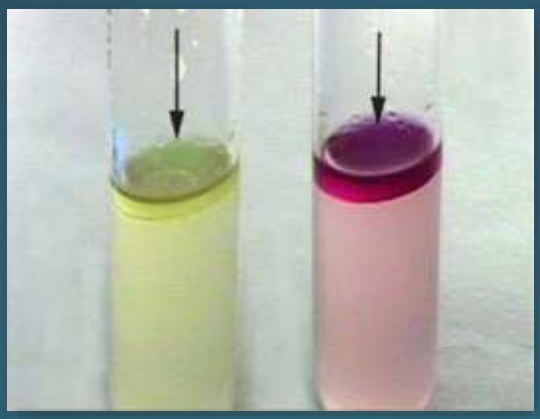
I. Indole production test.
II. Methyl Red test.
III. Voges-Proskauer test.
IV. Citrate Utilization test.

Indole production test

- ایندول در محیط SIM به واسطه حضور تریپتوفان ساخته می‌شود که این اسید آمینه در کازئین و پروتئین حیوانی وجود دارد. باکتری‌های دارای آنزیم تریپتوفاناز قادر به هیدرولیز تریپتوفان به پیرووات، آمونیاک (از طریق دآمینه شدن) و ایندول می‌باشند
- هیدرولیز تریپتوفان با افزودن معرف کواکس بعد از دوره انکوباسیون تشخیص داده شود.
- معرف کواکس با ایندول واکنش داده و تولید ترکیبی می دهد که منجر به تغییر رنگ لایه معرف به قرمز می‌شود (شکل).
- تشکیل رنگ قرمز در لایه معرف نشان‌دهنده‌ی مثبت بودن واکنش و حضور آنزیم تریپتوفاناز می‌باشد. عدم مشاهده رنگ قرمز به منزله منفی بودن تست ایندول می‌باشد.

Dr A.MOHAMMADI

Indole production test

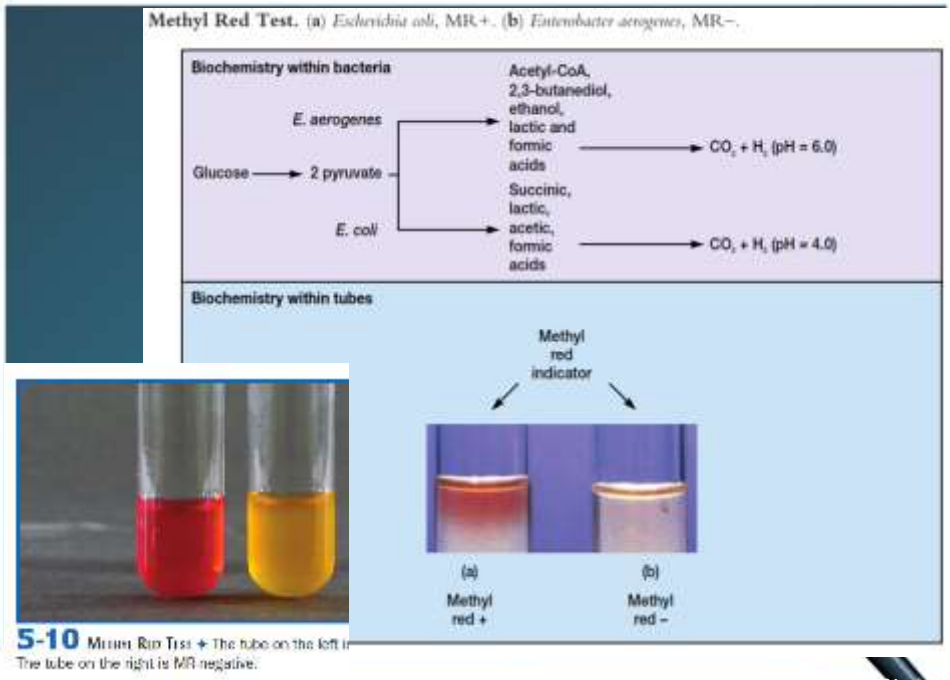


Negative Positive

Methyl Red test

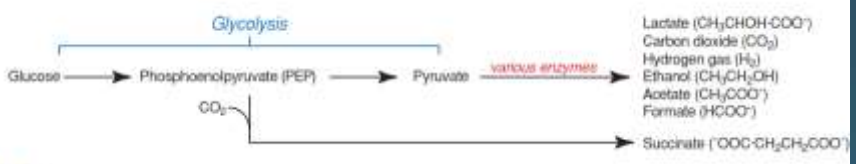
- تست متیل رد (MR) برای تشخیص میکروارگانیسم‌هایی طراحی شده که قادر به تخمیر اسیدی مخلوط می‌باشند و با غلبه بر بافر فسفات موجب کاهش pHمحیط می‌شوند.
- تخمیر اسیدی مخلوط با افزودن معرف متیل رد پس از مرحله انکوباسیون تأیید می‌شود. معرف متیل رد یک اندیکاتور pHاست که در pH= 4.4 به رنگ قرمز، pH= 6.2 به رنگ زرد و در محدوده بین این دو pHبه رنگ نارنجی با سایه‌های مختلف می‌باشد.
- رنگ قرمز تنها نشانه صحیح واکنش مثبت است. نارنجی حاکی از منفی یا بی‌نتیجه بودن تست است. رنگ زرد نیز حاکی از منفی بودن نتیجه تست است.

Dr A.MOHAMMADI



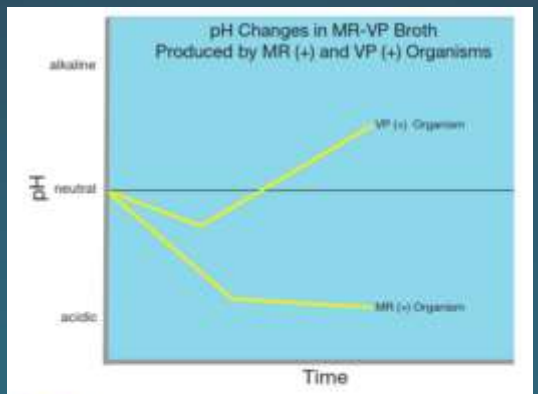
5-10 Methyl Red Test + The tube on the left is
The tube on the right is MR negative.

Methyl Red and Voges-Proskauer Tests



5-8 Mixed Acid Fermentation of *E. coli* ✦ *E. coli* is a representative Methyl Red positive organism and is recommended as a positive control for the test. Its mixed acid fermentation produces the end products listed in order of abundance. Most of the formate is converted to H_2 and CO_2 gases. ***Note:*** The amount of succinate falls between acetate and formate but is derived from PEP, not pyruvate. *Salmonella* and *Shigella* also are Methyl Red-positive.

Dr A.MOHAMMADI



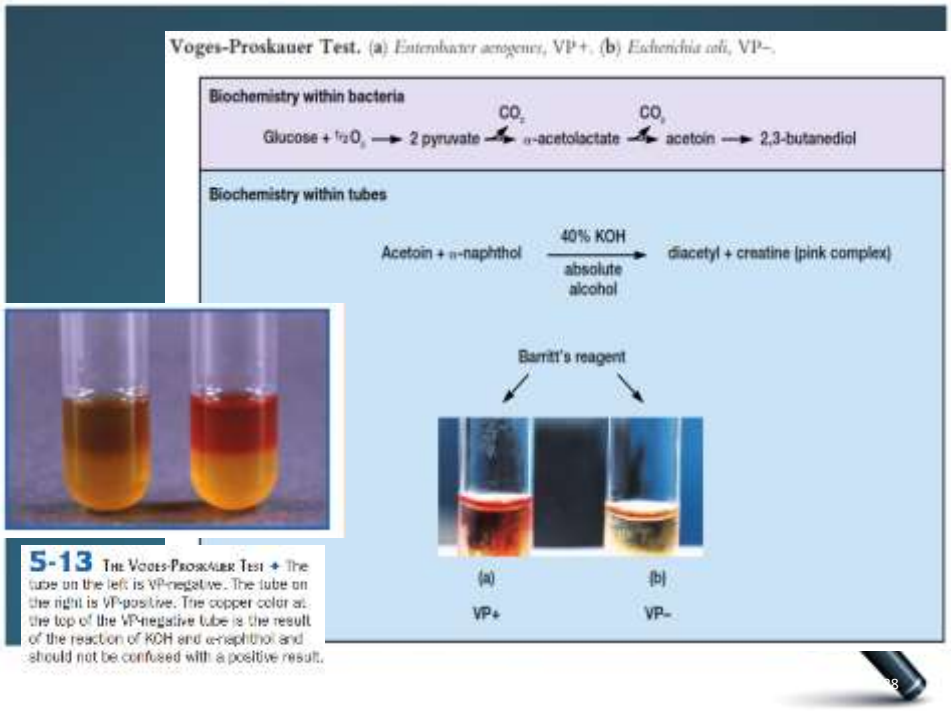
5-9 pH Changes in MR-VP Broth ✦ The MR test identifies organisms that perform a mixed acid fermentation and produce stable acid end products. MR (+) organisms lower the broth's pH permanently. The VP test is used to identify organisms that perform a 2,3-butanediol fermentation. VP (+) organisms initially may produce acid and temporarily lower the pH, but because the 2,3-butanediol fermentation end products are neutral, the pH at completion of the test is near neutral.

Voges-Proskauer test

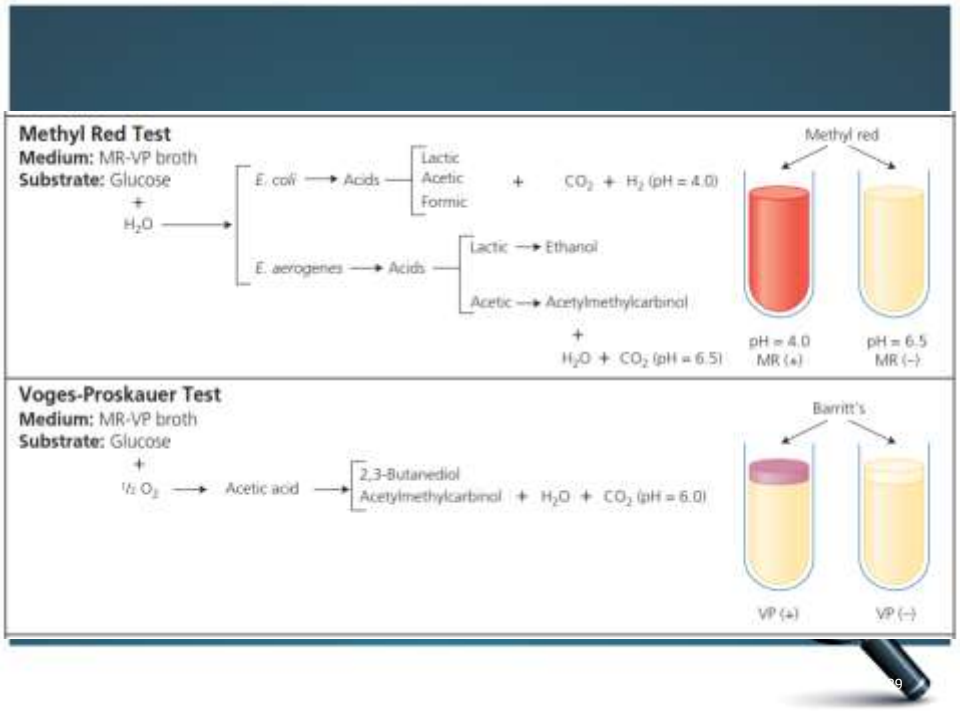
- این تست باکتری‌هایی را شناسایی می‌کند که قادرند از گلوکز در مسیر تخمیر ۲ و ۳-بوتاندیول، استوئین (استیل متیل کربونیل) تولید کنند.
- افزودن معرف‌های وُژز-پروسکوئر به محیط پس از مرحله انکوباسیون موجب اکسیداسیون استوئین (اگر در محیطَ باشد) به دی استیل می‌شود که به نوبه خود با هسته‌های گوانیدین پپتون واکنش داده و یک رنگ قرمز ایجاد می‌کند
- نتیجه مثبت تست VPبا رنگ قرمز مشخص می‌شود. است. عدم تغییر رنگ (ایجاد یک رنگ مسی) پس از افزودن معرف‌ها حاکی از منفی بودن تست است.
- رنگ مسی در نتیجه برهمکنش معرف‌ها ایجاد شده و بایستی دقت کرد که با رنگ قرمز صحیح در تست مثبت اشتباه گرفته نشود (شکل). پیشنهاد می‌شود جهت جلوگیری از اشتباهات احتمالی، از نمونه‌های کنترل مثبت و منفی استفاده کنید.

Dr A.MOHAMMADI

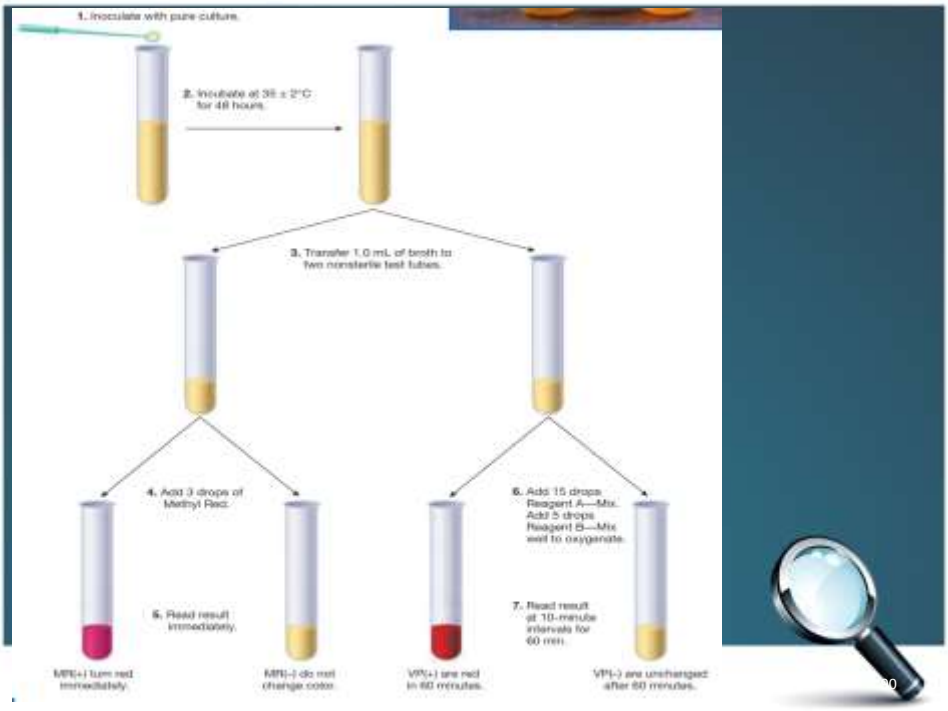
Dr A.MOHAMMADI

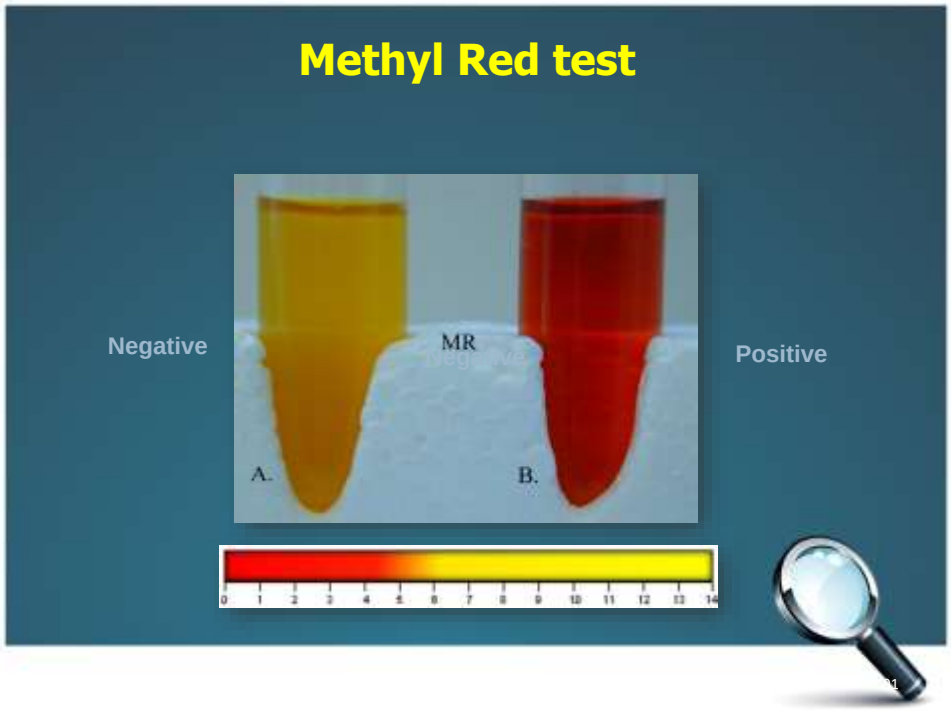


5-13 The Voges-Proskauer Test + The tube on the left is VP-negative. The tube on the right is VP-positive. The copper color at the top of the VP-negative tube is the result of the reaction of KOH and α-naphthol and should not be confused with a positive result.

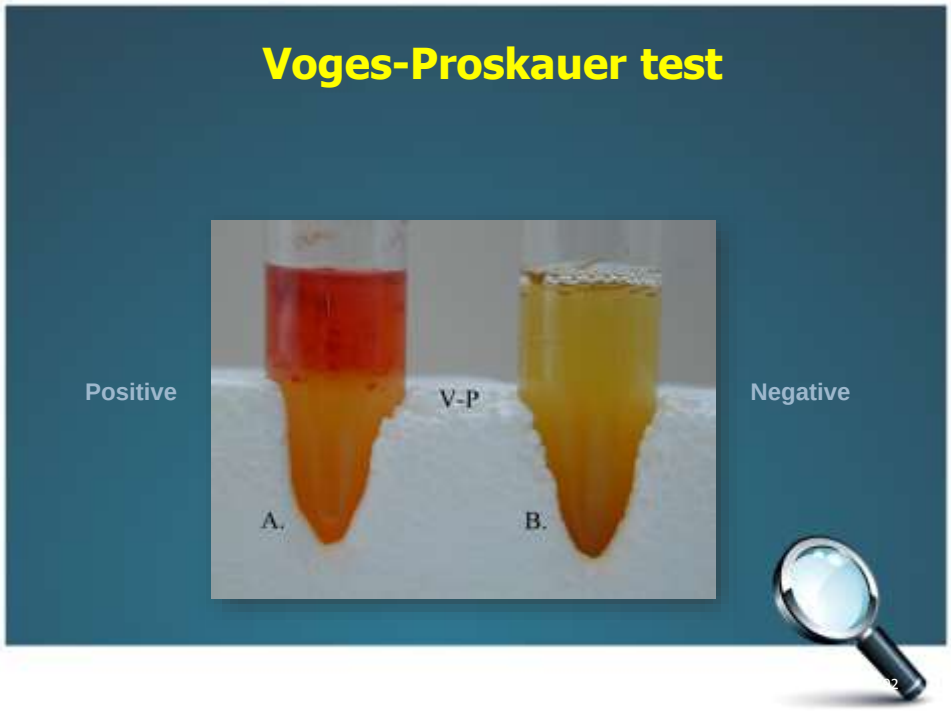


Dr A.MOHAMMADI





Dr A.MOHAMMADI



Citrate Test

- تعیین توانایی یک میکروارگانیسم در مصرف سیترات به عنوان تنها منبع کربن
- شناسایی و افتراق اعضای خانواده انتروباکتریاسه و همچنین افتراق آن‌ها از باکتری‌های میله‌ای گرم منفی.
- محیط سیمون سیترات آگار یک محیط اختصاصی است که دارای سیترات سدیم به عنوان تنها منبع کربن و فسفات آمونیوم ($NH_4H_2PO_4$) به عنوان تنها منبع نیتروژن است.
- رنگ بُرمو تیمول بلو (BTB) به عنوان معرف pHعمل می‌کند که در pH 6.9، سبز رنگ و در pH 7.6، آبی رنگ است.
- باکتری‌هایی که می‌توانند در محیط باقی مانده و سیترات را مصرف کنند، همچنین فسفات آمونیوم را به آمونیاک (و هیدروکسید آمونیوم (NH_4OH) تبدیل می‌کنند که هر دو موجب قلیایی شدن محیط می‌شوند. با بالا رفتن pHمحیط، رنگ محیط از سبز به آبی تغییر می‌یابد لذا تغییر رنگ محیط کشت به آبی حاکی از مثبت بودن تست سیترات است

Dr A.MOHAMMADI

Dr A.MOHAMMADI

Citrate Utilization test

Positive

Negative

5-30 Citrate Test Results ✦ These Simmons Citrate slants were inoculated with a citrate-positive (+) organism on the left and a citrate-negative (−) organism in the center. The slant on the right is uninoculated.

TABLE OF RESULTS

Result	Interpretation	Symbol
Blue (even a small amount)	Citrate is utilized	+
No color change; growth	Citrate is utilized	+
No color change; no growth	Citrate is not utilized	−

Dr A.MOHAMMADI

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.

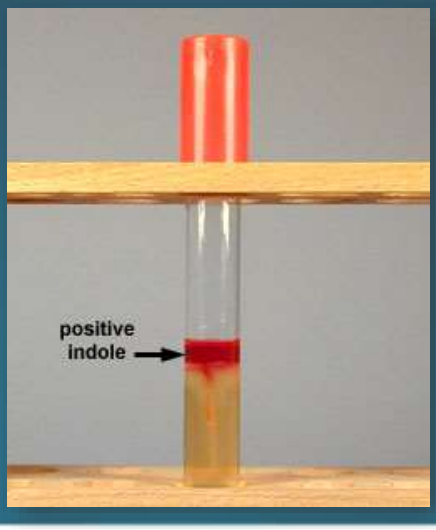
در لوله‌های اوره براث، ایجاد رنگ قرمز نشان‌دهنده‌ی واکنش قلیایی و هیدرولیز اوره است

Dr A.MOHAMMADI

Single media / Multiple tests

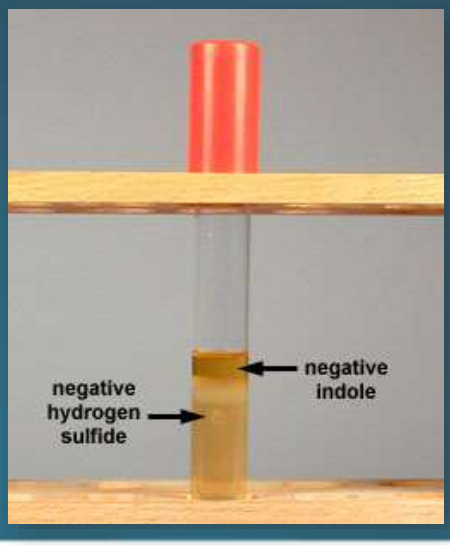
I. SIM medium.
II. Kliger's Iron agar (KIA).
III. Triple Sugar Iron agar (TSIA).
IV. Lysine Iron agar (LIA).
V. Motility Indole Ornithine (MIO) medium.

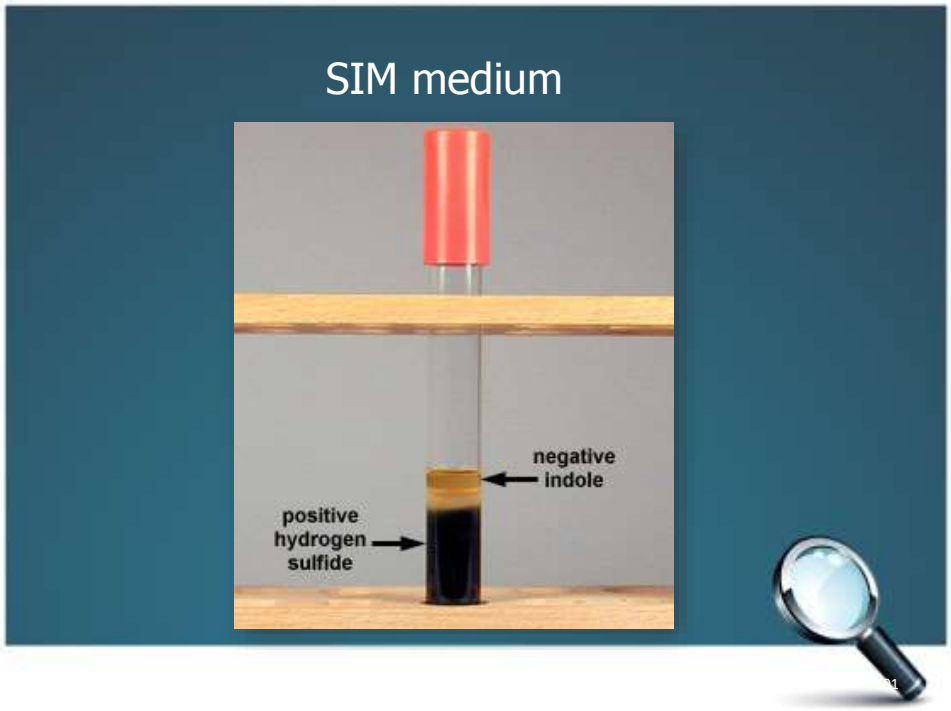
SIM medium



Dr A.MOHAMMADI

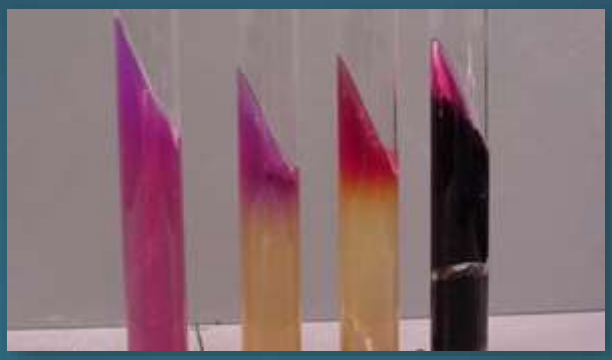
SIM medium





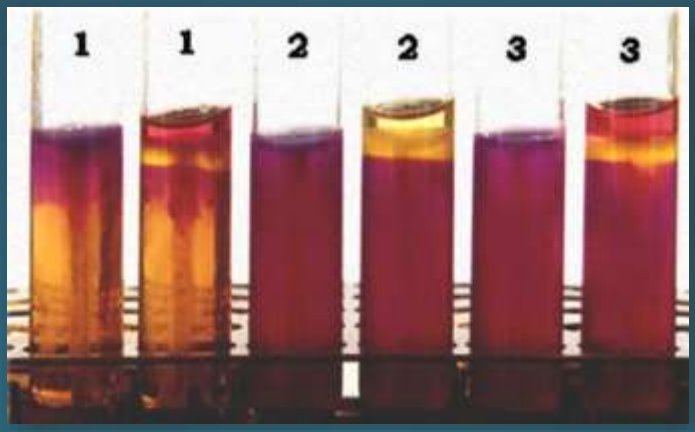
Dr A.MOHAMMADI

Lysine Iron agar (LIA)



Dr A.MOHAMMADI

Motility Indole Ornithine medium



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

Dr A.MOHAMMADI

105

Dr A.MOHAMMADI