به نام خدا

Bacteriology Lab 1

By: **Dr. A. Mohammadi**

Department of Biology,
Faculty of science,
University of Alzahra

fppt.com

آزمایشگاه سوم
انتروباکتریاسه

باکتری های گرم منفی روده ای
اشریشیا کلای
کلبسیلا
شیگلا
پروتئوس
سالمونلا

fppt.com

Enterobacteriaceae

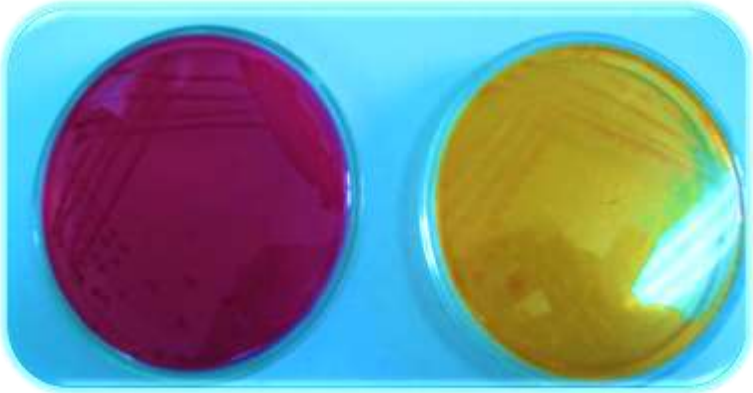
خانواده آنتروباکتریاسیه باسیلهای گرم منفی بدون اسپور، اکسیداز منفی، گلوکز مثبت بوده که قادرند نیترات ها را به نیتریت احیاء کنند. برخی متحرک و بعضی دارای کپسول هستند. این باسیلها از نظر شکل شبیه یکدیگر به طول ۲ تا ۴ و عرض ۰/۵ تا ۲ میکرومتر بوده و به خوبی برروی محیطهای ساده رشد کرده و پرگنه های مشابهی ایجاد می کنند. چون در اکثر نمونه های بالینی با باکتریهای دیگر مخلوط هستند برای جداسازی آنها از محیط های انتخابی استفاده می نمایند. وجود رنگها (بریلیانت گرین یا کریستال ویوله) و نمکهای صفراوی (دزاکسی کلات سدیم) در این محیط ها از رشد باکتریهای گرم مثبت و برخی از باسیلهای گرم منفی غیر بیماریزای روده ای ممانعت به عمل می آورند. براساس غلظت این مواد، محیطهای فوق الذکر را به سه گروه زیر تقسیم می نمایند:

۱- محیط های Low selective مانند مک کانکی یا ائوزین متیلن بلو (EMB) یا دزاکسی کلات آگار(DC)

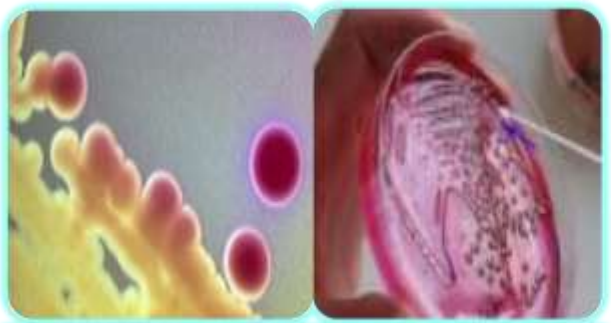
۲- محیطهای Moderate selective مانند سالمونلا، شیگلا آگار ، دزاکسی کلات سیترات آگار (DCC) ، هکتون انتریک آگار (HE) و گزیلوزلیزین دزاکسی کلات آگار (XLD)

۳- محیطهای 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 براساس تخمیر قند لاکتوز جدا می کنند.

برای جداسازی پاتوژن های این خانواده (نظیرسالمونلا و شیگلا) از نمونه مدفوع بیماران می توان از محیط های غنی کننده مانند تتراتیونات (tetrationate broth) یا سلنیت اف استفاده نمود. ترکیبات این محیطها رشد سالمونلا و شیگلا را افزایش داده و از رشد باکتریهای فلور نرمال روده ممانعت می نمایند. پس از جدا سازی اولیه، این باکتریها را بر اساس روشهای بیوشیمیایی و یا سرولوژیک تعیین هویت می نمایند. از جمله آزمایشهای بیوشیمیایی که در تشخیص اولیه این باکتریها کاربرد فراوان دارد آزمایشهای چهارگانه IMViC (Indole, Methyl Red, Voges Proskauer , Citrate) میباشد که بعدا به آنها اشاره می شود.

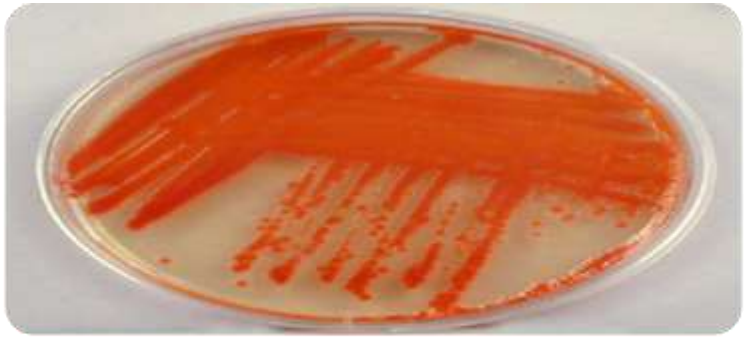


Lactose fermenter & non fermenter

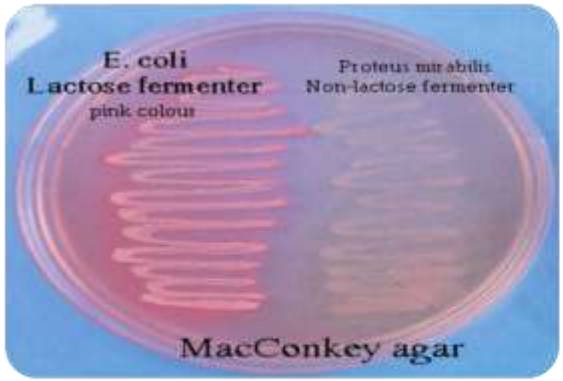


Klebsiella spp (mucoid)

Proteus vulgaris Swarming



Serratia Marcescens On TSA Chromogenic Red Pigments



Lactose fermenter on Mac. agar

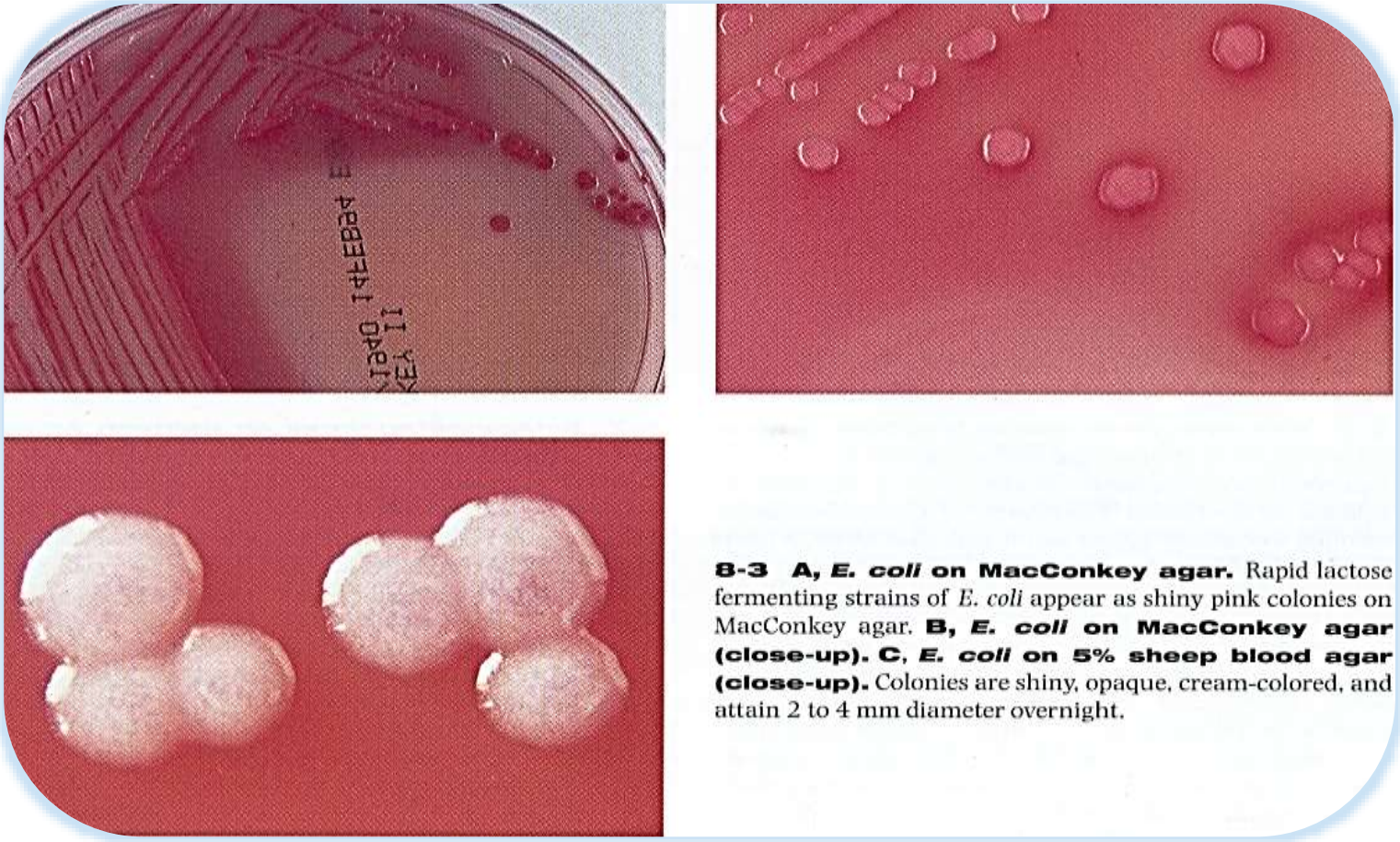
E. coli on EMB agar

Colonial Morphology

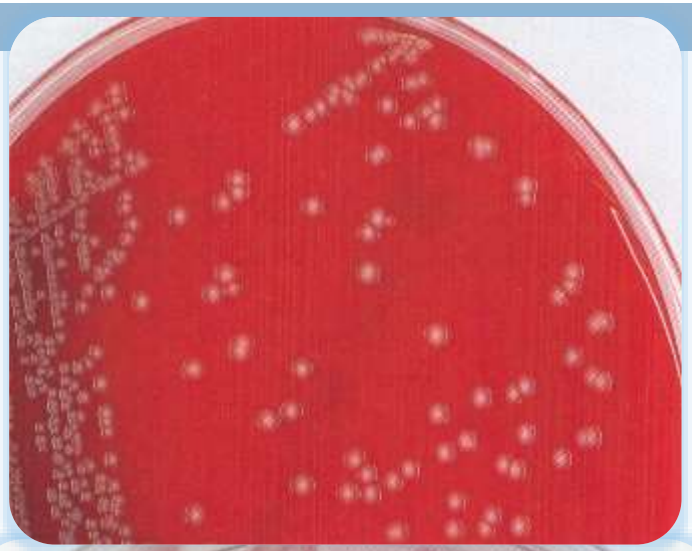
- Characteristics of the organisms' colonies on different media have been used to identify common members of the family Enterobacteriaceae. For example, the ability to ferment lactose (detected by color changes in lactose-containing media such as MacConkey agar).

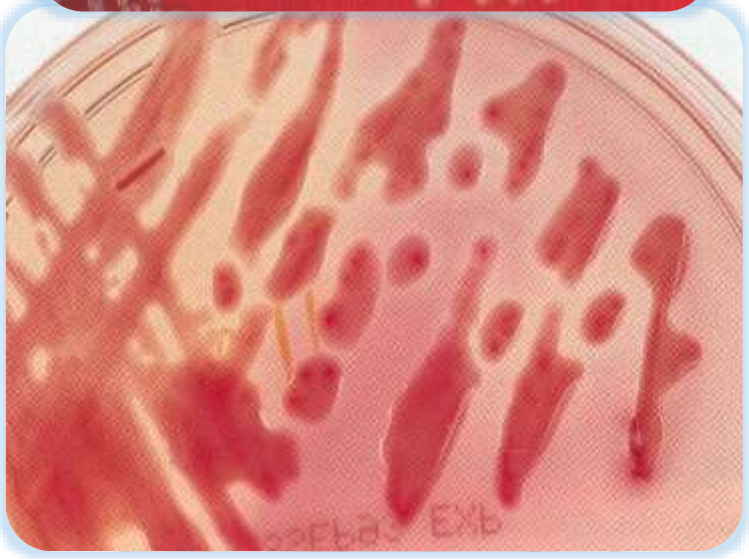
- lactose-fermenting strains *pink-purple colonies*
- (e.g., *Escherichia, Klebsiella, Enterobacter, Citrobacter*)
- Non lactose-fermenting strains * colorless colonies*
- (e.g., *Proteus, Salmonella, Shigella, and Yersinia* spp).
- Delayed lactose fermenter (DLF): (e.g., *Morganella, Providencia, Serratia, Edwardsiella, Erwinia, Hafnia*)

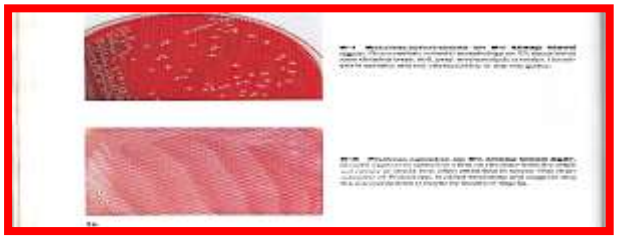
- Resistance to bile salts in some selective media has been used to separate enteric pathogens (e.g., *Shigella, Salmonella*) from commensal organisms that are inhibited by bile salts (e.g., gram-positive and some gram negative).

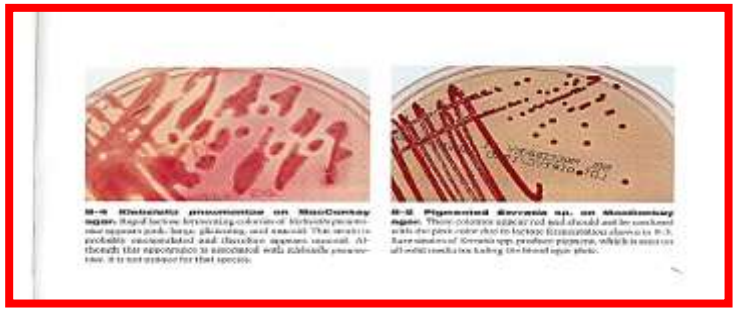


8-3 A, *E. coli* on MacConkey agar. Rapid lactose fermenting strains of *E. coli* appear as shiny pink colonies on MacConkey agar. **B, *E. coli* on MacConkey agar (close-up). C, *E. coli* on 5% sheep blood agar (close-up).** Colonies are shiny, opaque, cream-colored, and attain 2 to 4 mm diameter overnight.

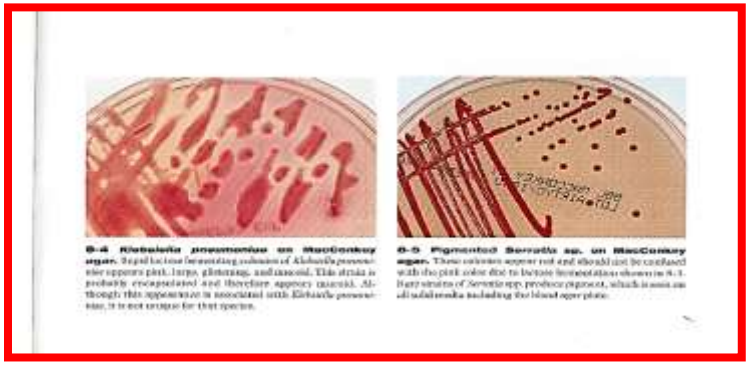






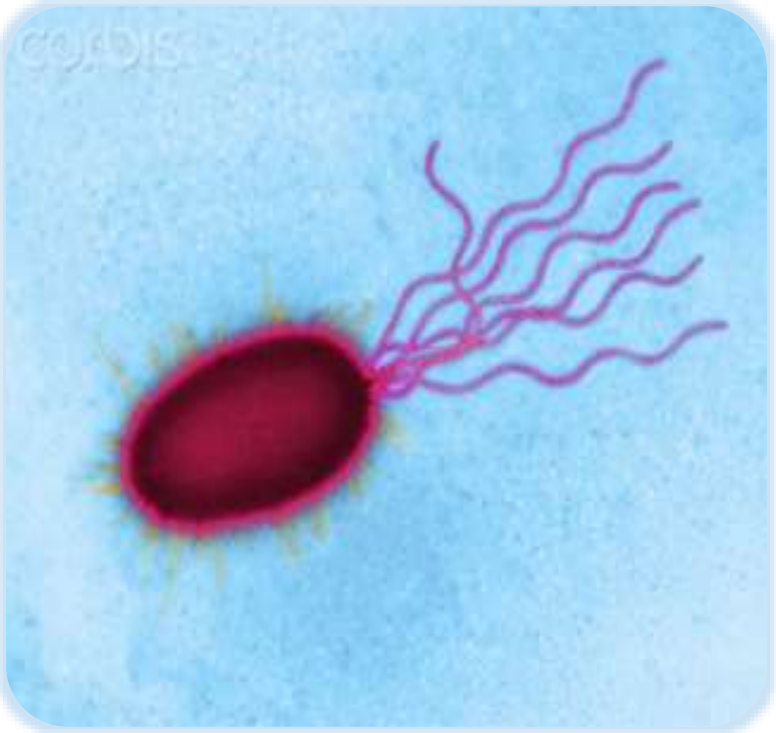


Dr A.Mohammadi

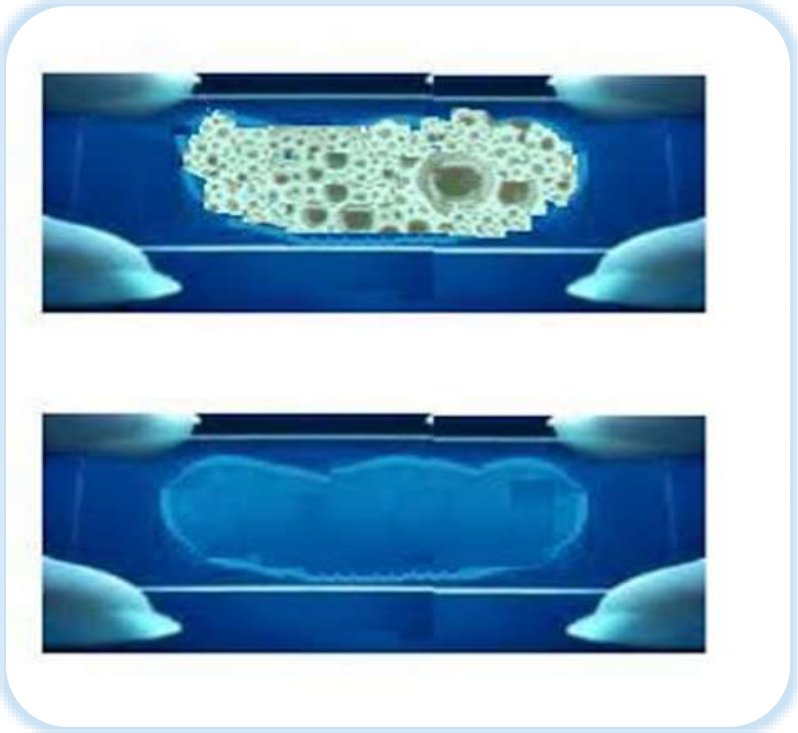


B-4 Klebsiella pneumoniae on MacConkey agar. Rapid lactose fermenting colonies of Klebsiella pneumoniae appear pink, large, glistening, and mucoid. This strain is probably encapsulated and therefore appears mucoid. Although this appearance is associated with Klebsiella pneumoniae, it is not unique for that species.

B-5 Pigmented Serratia sp. on MacConkey agar. These colonies appear red and should not be confused with the pink color due to lactose fermentation shown in A-1. Many strains of Serratia spp. produce pigment, which is seen on all solid media including the blood agar plate.



Some pseudomonads are motile by polar flagella.



Pseudomonads are catalase-positive

کار عملی

۱– محیط کشت EMB

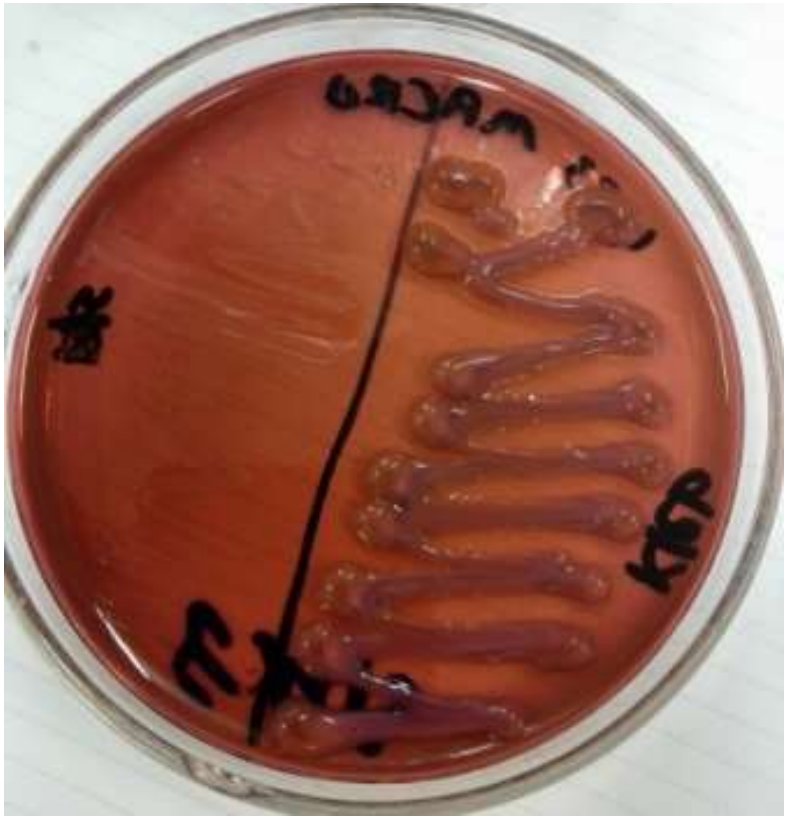
- محیط ائوزین متیلن بلو آگار(EMB) برای جداسازی کلی‌فرم‌های مدفوع استفاده می‌شود.
- دارای لاکتوز لذا افتراق دهنده تخمیرکنندگان از غیره
- دارای رنگ‌های ائوزین Yو متیلن بلو : ۱) آن‌ها رشد باکتری‌های گرم مثبت را مهار می‌کنند ۲) آن‌ها با تخمیرکنندگان شدید لاکتوز واکنش داده و (در محیط اسیدی) محیط را به رنگ ارغوانی تیره یا سیاه درمی‌آورند.
- این رشد تیره مختص اشرشیا کلی نسبت به سایر باکتری‌های روده¬ایی 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.

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

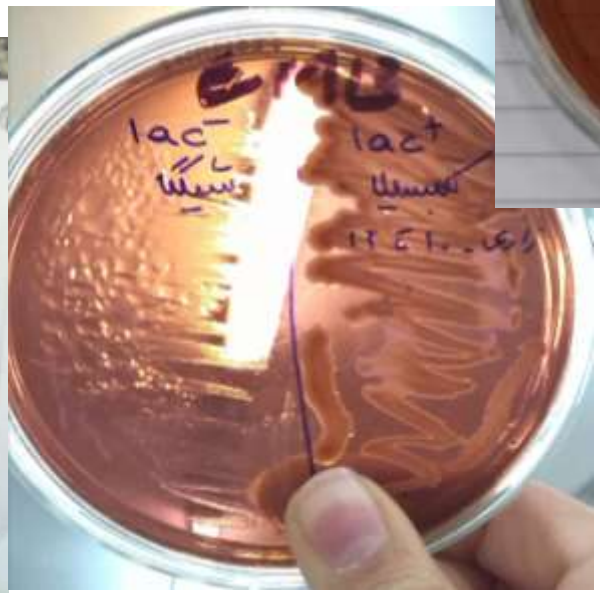
محیط از بالا به ترتیب در جهت عقربه‌های ساعت با دو کلی‌فرم، یک باکتری گرم منفی غیر کلی‌فرم و یک باکتری گرم مثبت تلقیح شده است که همگی به خوبی رشد کرده‌اند. به جلای فلزی سبزرنگ کلنی کلی‌فرمی که در بالا ایجاد شده و همچنین کلنی صورتی‌رنگی که در سمت راست تشکیل شده توجه کنید. هر دو از جمله تخمیرکنندگان لاکتوز می‌باشند که تفاوت‌های رنگی این دو به دلیل متفاوت بودن میزان اسید تولیدی‌شان است. باکتری پایین قابلیت تخمیر نداشته و رنگی نیز ایجاد نکرده است. رشد باکتری گرم مثبت سمت چپ نیز با وجود رنگ‌های ائوزین و متیلن بلو مهار شده است.

E.coli و سالمونلا در EMB

کلبسیلا و شیگلا در EMB



پروتئوس و اینترو باکتر در EMB



شیگلا کلنی های همرنگ محیط (لاکتوز منفی)

کلبسیلا کلنی های ارغوانی مرکز تیره که به چشم ماهی معروف است . به دلیل اینکه این باکتری کپسول دارد کلنی های براق ایجاد می کند.(لاکتوز مثبت)

کار عملی

۲ گروه کشت خطی متراکم کلبسیلا و شیگلا در ۱ پلیت

۲ گروه کشت خطی متراکم اشرشیا کلی و سالمونلا در ۱ پلیت

۲ گروه کشت خطی متراکم انتروکوک و پروتئوس

۲– محیط کشت 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 کانکی آگار بدون کریستال ویوله (CS) که کوکسی‌های گرم مثبت در آن رشد می‌کنند و مک کانکی 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.

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.

دستور کار

الف- با استفاده از لوپ، از باکتری مجهول خود برداشت نموده و در محیط مذکور به روش ایزولاسیون کشت دهید.

ب- پلیت کشت داده شده را برای مدت۲۴- ۱۸ ساعت در گرمخانه ۳۷° C قرار دهید.

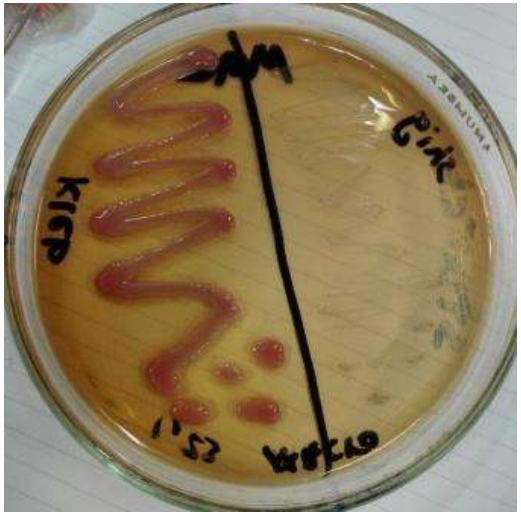
ج- در جلسه بعد بر اساس توضیحات فوق الذکر باکتری مجهول خودرا شناسایی کنید

اشریشیا کلی	کنترل مثبت (پرگنه صورتی)
سالمونلا تیفی	کنترل منفی (پرگنه بی رنگ)

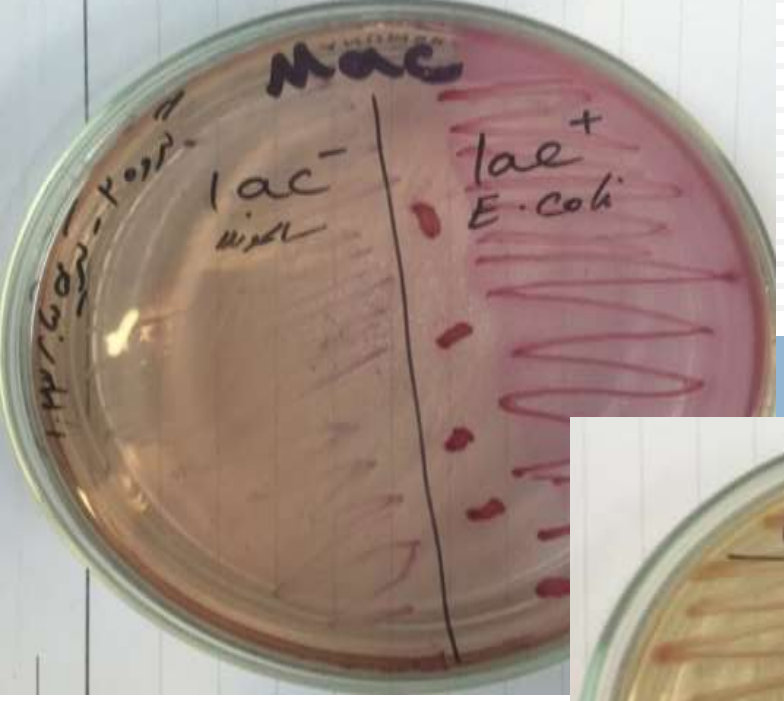
E.coli و سالمونلا در MAC

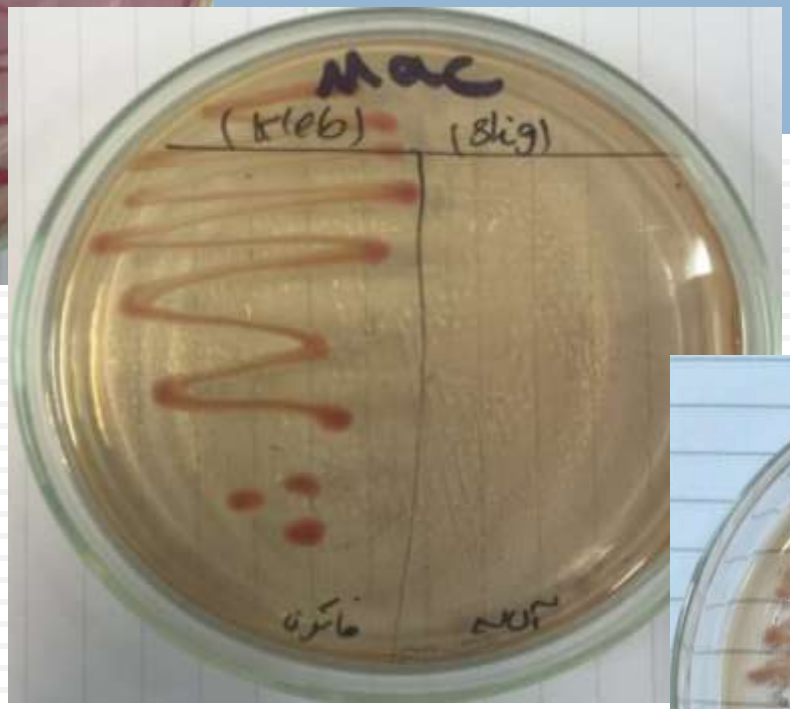
شکل۱۰-۱: محیط مک کانکی

کلبسیلا و شیگلا در



شیگلا لاکتوز منفی و کلبسیلا لاکتوز مثبت





کار عملی

۲ گروه کشت خطی متراکم کلبسیلا و شیگلا در ۱ پلیت

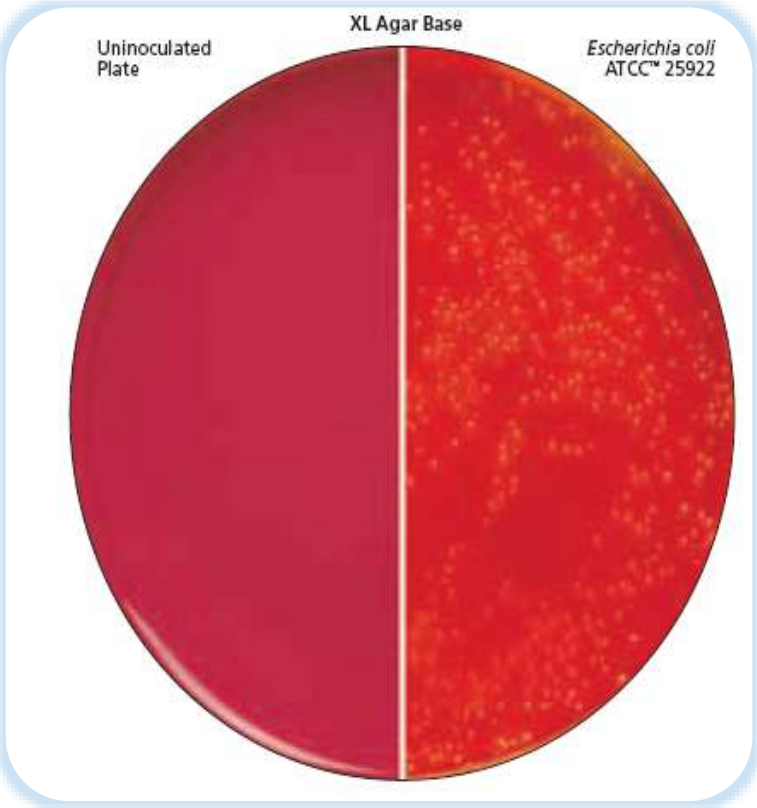
۲ گروه کشت خطی متراکم اشرشیا کلی و سالمونلا در ۱ پلیت

۲ گروه کشت خطی متراکم انتروکوک و پروتئوس

۳– محیط کشت XLD

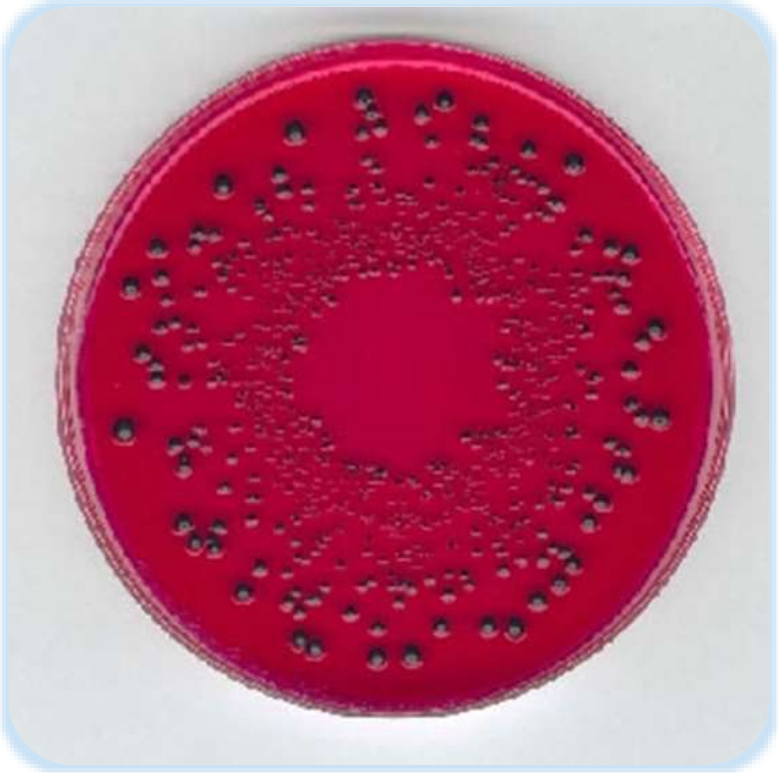
- گزیلوز لیزین دزوکسی کُلات آگار (XLD) یک محیط انتخابی و افتراقی است که جهت جداسازی شیگلا و پرووِیدنسیا از نمونه‌های مدفوع استفاده می‌شود..
- داُکسی کلات یک نمک صفراوی است که از رشد باکتری‌های گرم مثبت ممانعت به عمل می-آوَرد.
- گزیلوز، لاکتوز و سوکروز منابع قندی جهت تخمیر می‌باشند.
- لیزین اسیدآمینه‌ای است که جهت دِکربوکسیلاسیون (حذف گروه کربوکسیل یا COOH) به محیط افزوده شده است.
- تیوسولفات سدیم فراهم‌کننده گوگرد اکسیدشده برای باکتری‌هایی است که قادرند آن را به H2S احیاء نمایند.
- فریک آمونیوم سیترات به عنوان یک معرف عمل می‌کند چرا که موجب آزادسازی یون فریک (Fe3+) به محیط شده و در نتیجه واکنش این یون با H2S، رسوب سیاه‌رنگ سولفید آهن (FeS) در محیط تشکیل می‌شود.
- فنل رد نیز به عنوان معرف pH عمل می‌کند که در محیط اسیدی، زردرنگ و در محیط قلیایی، صورتی یا قرمزرنگ می‌شود.

نتایج	تفسیر	شناسایی
رشد ضعیف یا عدم رشد (P)	میکروارگانیسم توسط دزوکسی کلات مهار شده است.	گرم مثبت
رشد خوب (G)	میکروارگانیسم توسط دزوکسی کلات مهار نشده است.	گرم منفی
رشد زرد (Y)	میکروارگانیسم از تخمیر گزیلوز، اسید تولید کرده است.	غیر از شیگلا یا پرووِیدنسیا
رشد قرمز با مرکز سیاه (RB)	میکروارگانیسم گوگرد را به H_2S احیاء می‌کند.	غیر از شیگلا یا پرووِیدنسیا (احتمالاً سالمونلا)
رشد قرمز بدون مرکز سیاه (R)	عدم تخمیر لاکتوز یا اینکه به آهستگی گزیلوز را تخمیر می‌کند؛ از دکربوکسیلاسیون لیزین، محصولات قلیایی می‌سازد.	احتمالاً شیگلا یا پرووِیدنسیا



Escherichia coli: flat yellow colonies; some strains may be inhibited.

Enterobacter and Klebsiella: mucoid yellow colonies.



Salmonella: usually red colonies with black centers.

Shigella and Pseudomonas: red colonies without black centers.

کلنی های شیگلا بی رنگ و براق و اطراف محیط هاله بی رنگ در اثر هیدرولیز املاح صفراوی توسط انزیم های صفراوی و لایزین .

شیگلا و کلبسیلا هر دو H2Sمنفی

کلبسیلا لاکتوز مثبت (محیط زرد)

شیگلا لاکتوز منفی(محیط قرمز)

کار عملی

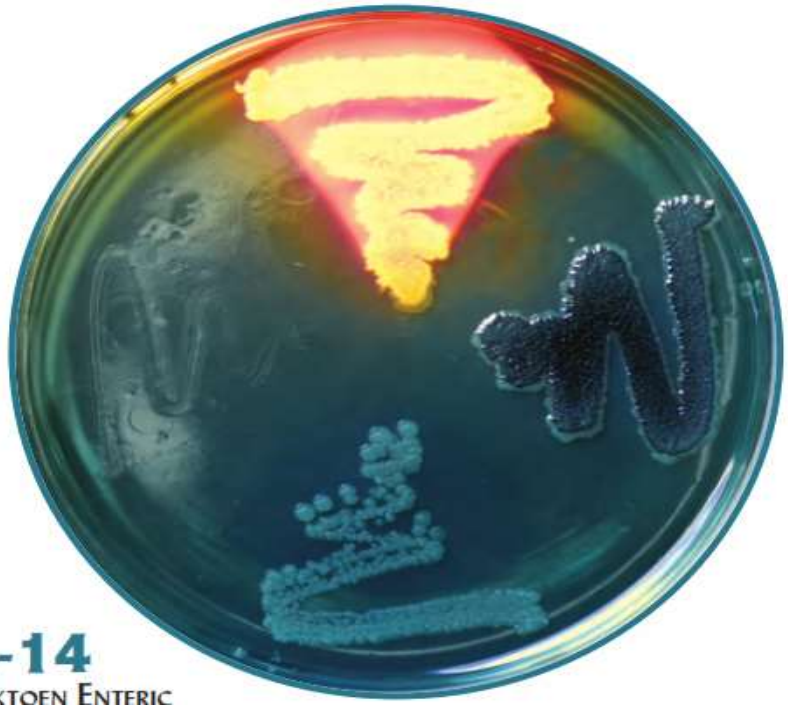
۲ گروه کشت خطی متراکم کلبسیلا و شیگلا در ۱ پلیت

۲ گروه کشت خطی متراکم اشرشیا کلی و سالمونلا در ۱ پلیت

۲ گروه کشت خطی متراکم انتروکوک و پروتئوس

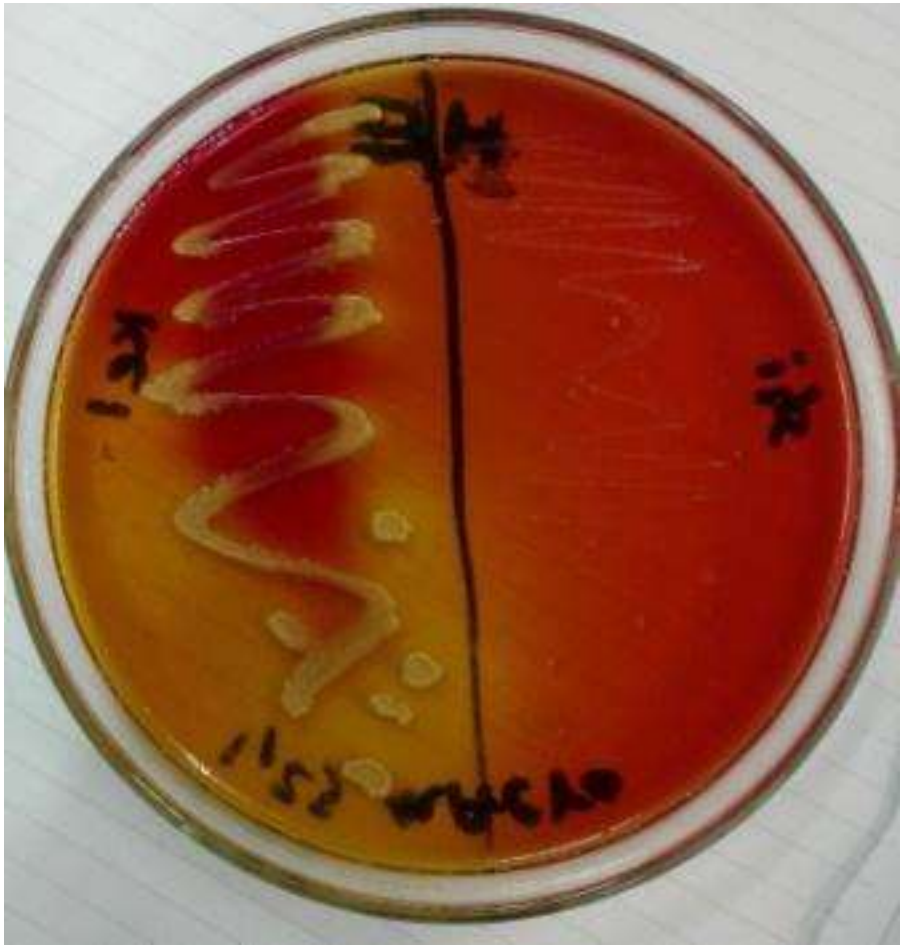
۴–محیط کشت HE

محیط هکتوئن انتریک آگار (HEA) برای جداسازی و افتراق گونه‌های شیگلا و سالمونلا از دیگر گرم منفی‌های روده‌ای (انتریک‌ها) کاربرد دارد.
رنگ‌های برم تیمول بلو و فوشین اسیدی نیز به عنوان معرف‌های pH عمل می‌کنند.
افتراق باکتری‌ها به واسطه تولید رنگ‌های مختلف در کلنی‌های باکتریایی و آگار امکان‌پذیر است.
انتریک‌هایی که از فرایند تخمیر، اسید تولید می‌کنند موجب تشکیل کلنی‌های زرد تا صورتی گُل‌به‌ای رنگ می‌شوند.
گونه‌های سالمونلا و شیگلا هیچ یک از قندها را تخمیر نمی‌کنند در مقابل آن‌ها با تجزیه بافت‌های جانوری موجب اندکی افزایش در pHمحیط و تولید کلنی‌های سبز–آبی می‌شوند.
ضمن اینکه گونه‌های سالمونلا با احیاء گوگرد به H2S موجب تشکیل کلنی‌های دارای سولفید آهن می‌شوند که آن‌ها را نسبتاً یا کاملاً تیره می‌نماید.

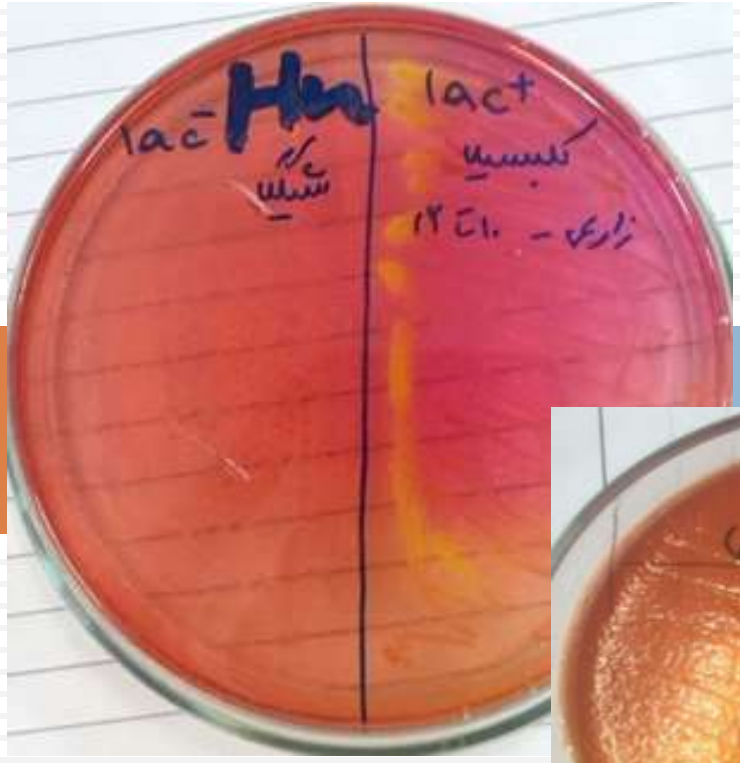


4-14
Hektoen Enteric

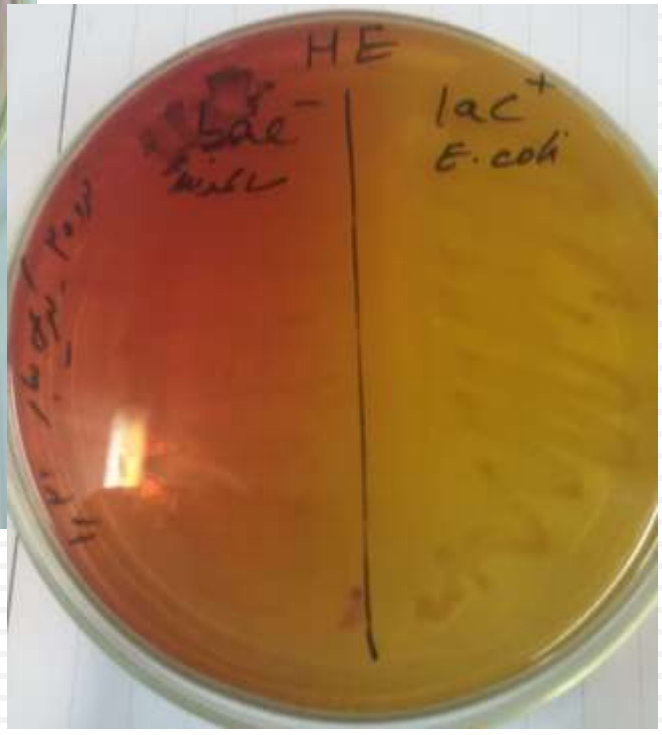
محیط از بالا به ترتیب در جهت عقربه‌های ساعت با یک باکتری گرم منفی تخمیرکننده لاکتوز، دو باکتری غیرتخمیرکننده لاکتوز و یک باکتری گرم منفی تلقیح شده است. به رشد سبز-آبی دو باکتری غیرتخمیرکننده و همچنین رسوب سیاه‌رنگ تشکیل شده (به دلیل وقوع واکنش بین فریک آمونیوم سیترات و H_2S) در کلنی سمت راست توجه کنید. رشد باکتری گرم مثبت سمت چپ نیز با وجود نمک‌های صفراوی مهار شده است.



Dr A.Mohammadi


lac-
lac+

HE
HE
Shig
Klebs


HE
lac-
lac+
E. coli

کار عملی

۲ گروه کشت خطی متراکم کلبسیلا و شیگلا در ۱ پلیت

۲ گروه کشت خطی متراکم اشرشیا کلی و سالمونلا در ۱ پلیت

۲ گروه کشت خطی متراکم انتروکوک و پروتئوس

۵– محیط کشت SSA

محیطی هم رنگ مک کانکی بوده در تقویت رشد سالمونلا و شیگلا که در آن تخمیر قند لاکتوز مد نظر است.

این محیط دارای بریلیانت گرین و املاح صفراوی در مهار رشد گرم مثبت ها و سایر اعضاء انتروباکتریاسه می باشد.

معرف مورد نظر در آن نوترال رد می باشد.که لاکتوز مثبت ها دارای کلنی صورتی و لاکتوز منفی کلنی بی رنگ یا مات دارند،که سالمونلا و شیگلا دارای کلنی صورتی می باشند

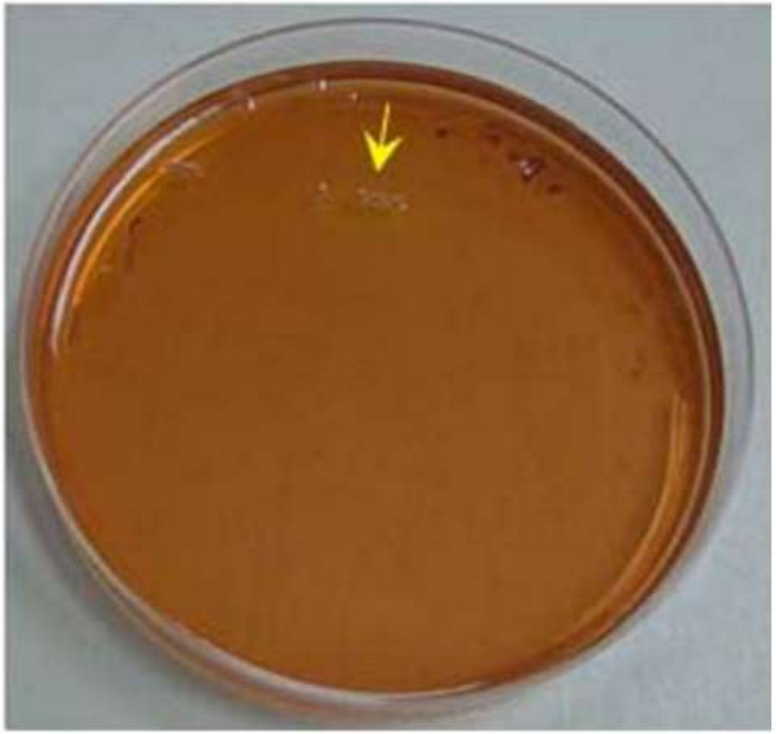
در این محیط تیو سولفات و آهن نیز دارد که در آن اگر باکتری H2Sمثبت باشد رنگ محیط سیاه می باشد.

شیگلا لاکتوز منفی و دارای کلنی های همرنگ می باشد .در باکتری های شیگلا و کلبسیلا H2Sتولید نمی شود.

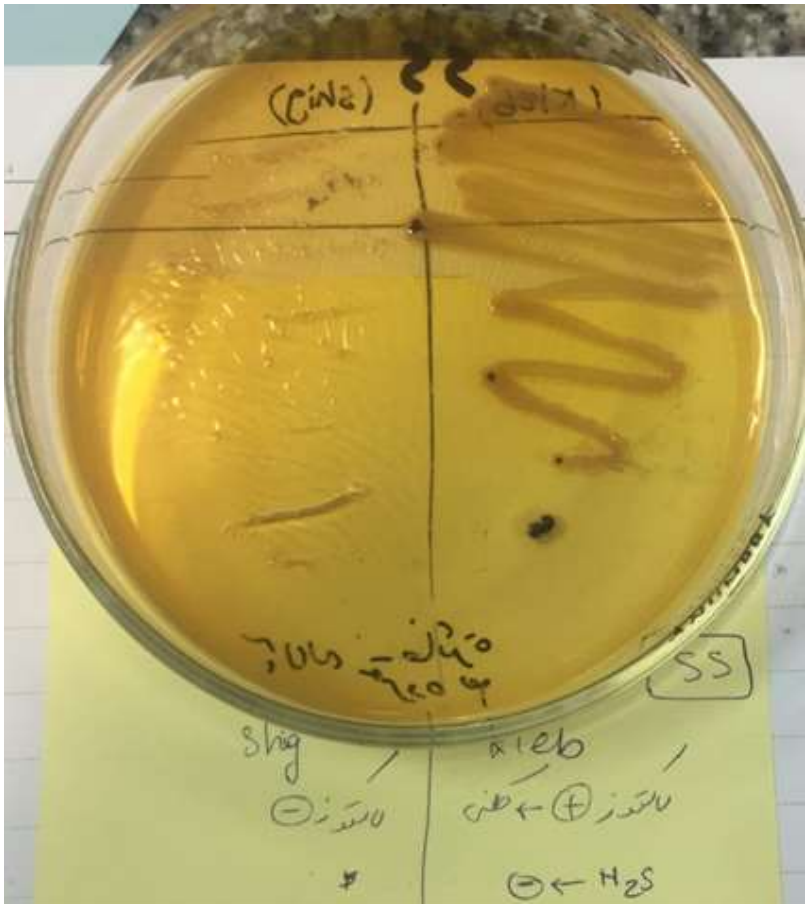
Salmonella Shigella (SS) Agar

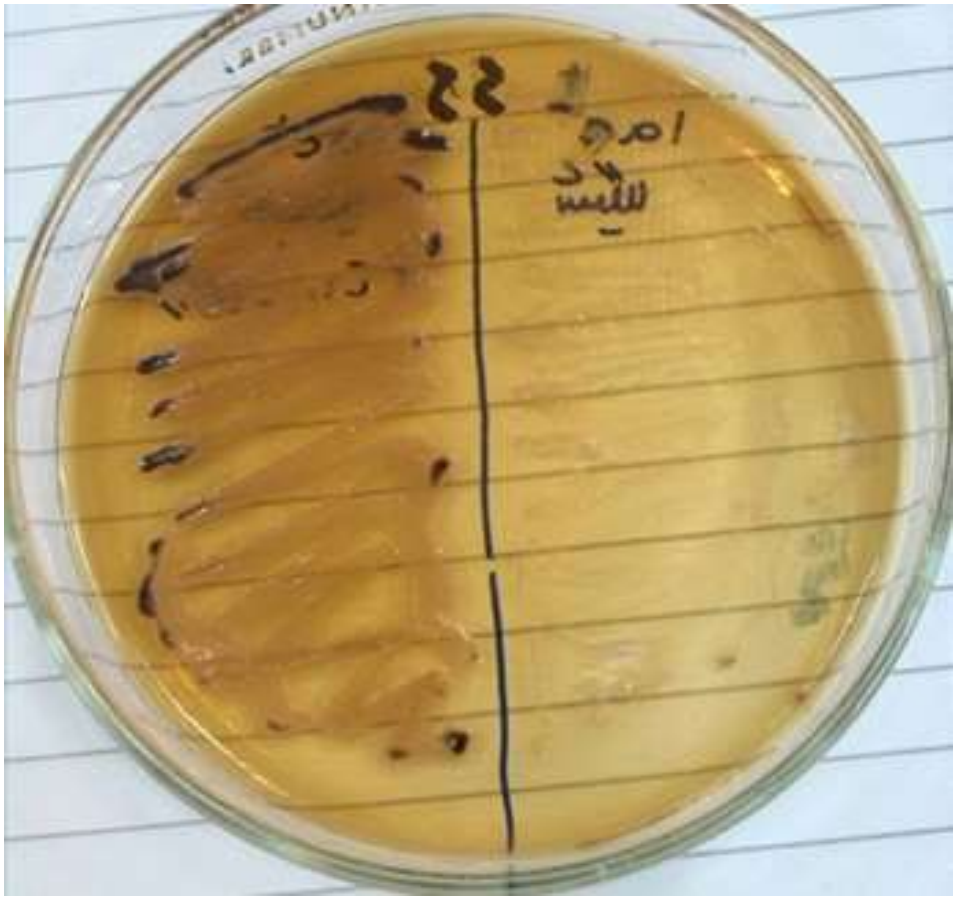
Result Interpretation on *Salmonella Shigella* Agar

Salmonella on SS Agar



Shigella on SS Agar


SS
Shig
Oleb
H2S



کار عملی

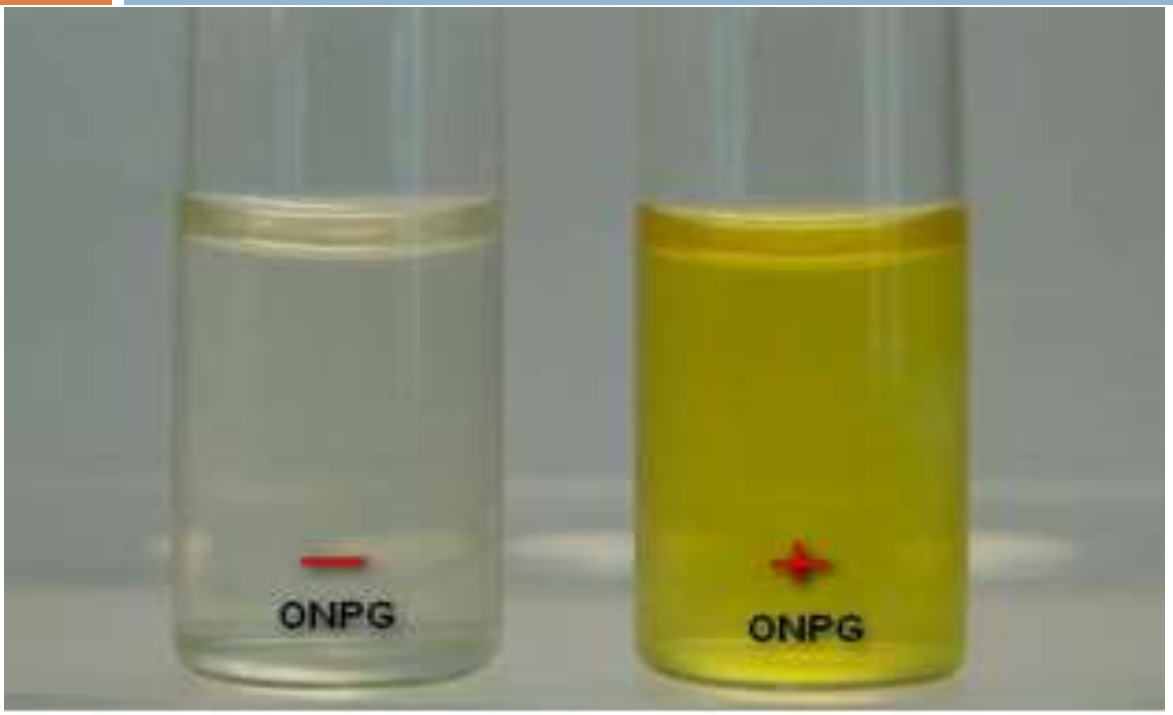
۲ گروه کشت خطی متراکم کلبسیلا و شیگلا در ۱ پلیت

۲ گروه کشت خطی متراکم اشرشیا کلی و سالمونلا در ۱ پلیت

۲ گروه کشت خطی متراکم انتروکوک و پروتئوس

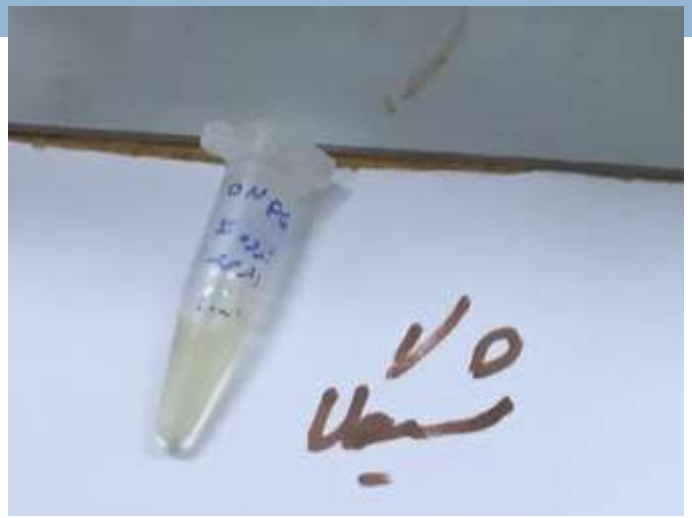
۶– تست ONPG

- **این تست در شناسایی و تمایز باکتری‌های تخمیرکننده تأخیری لاکتوز در اعضای غیرتخمیری انتروباکتریاسه استفاده می‌شود.**
- بعضی از باسیل های گرم منفی قادر به تخمیر لاکتوز بوده و در تشخیص آنتروباکتریاسه از این موضوع استفاده می شود.اما برخی از باسیلهای گرم منفی لاکتوز را به آهستگی تخمیر کرده و یا اصلا تخمیر نمی کنند و این باعث اشتباه در تشخیص پاتوژن های روده ایی مثل سالمونلا می گردد.هر باکتری جهت تخمیر لاکتوز نیاز به ۲ آنزیم بتا گالاکتوزیداز و پرمه آز دارد.بتاگالاکتوزیداز سبب لیز لاکتوز به گلوکز و لاکتوز می شود و پرمه آز به لاکتوز اجازه ورود به باکتری را می دهد.اگر پرمه آز نباشد این باکتریها را در محیط کشت حاوی لاکتوز قرار دهند به علت نداشتن پرمه آز لاکتوز را به صورت تاخیری (ورود قند از راهی به جز پرمه از)مصرف می کنند در واقع اینها تخمیرکننده های کند لاکتوز اند، که در اشرشیا و سالمونلا ، کلبسیلا،انتروباکتر،سراشیا مثبت می باشد.



نتایج تست ONPG: یک باکتری ONPG مثبت (اشرشیا کلی) را در سمت راست و یک باکتری ONPG منفی (پروتئوس ولگاریس) را در سمت چپ مشاهده می کنید.

جدول نتایج		
نتیجه	تفسیر	علامت
تشکیل رنگ زرد	تولید بتاگالاکتوزیداز توسط میکروارگانیسم	+
عدم تغییر رنگ	عدم تولید بتاگالاکتوزیداز	–



شیگلا ONPG منفی نمی تواند لاکتوز مصرف کند عدم تغییر رنگ محیط . E.coli و انتروباکتر ONPG مثبت

کار عملی

کشت شیگلا ، اشرشیا کلی و انتروکوک

با لوپ باکتری را به محیط ONPGوارد می کنیم و ۴ ساعت محیط را انکوباتور قرار می دهیم سپس نتیجه را گزارش می دهیم.

۷– اوره آز

- این تست در شناسایی و تمایز باکتری‌های تخمیرکننده تأخیری لاکتوز در اعضای این تست برای افتراق میکروارگانیسم‌ها بر اساس توانایی‌شان در هیدرولیز اوره با کمک آنزیم اوره¬آز استفاده می‌شود.
- پاتوژن‌های دستگاه ادراری از جنس پروتئوس ممکن است به واسطه فعالیت سریع اوره¬آزی خود از دیگر باکتری‌های روده¬ای متمایز شوند.
- هیدرولیز اوره به آمونیاک به وسیله باکتری‌های اوره¬آز مثبت موجب مغلوب شدن بافر محیط و تغییر رنگ محیط به نارنجی تا صورتی می‌شود.
- محیط آگار در طی انکوباسیون بایستی روزانه چک شود. باکتری‌های اوره¬آز مثبت سریع در مدت ۲۴ ساعت کل شیب محیط را صورتی می‌کنند. این امر در رابطه با باکتری‌های اوره¬آز مثبت ضعیف ممکن است چند روز طول بکشد (جدول).
- باکتری‌های اوره¬آز منفی یا موجب تغییر رنگ نمی‌شوند یا اینکه به دلیل محصولات اسیدی، آن را زرد رنگ می‌کنند

۷– اوره آز

جدول نتایج		
نتیجه	**تفسیر**	**علامت**
صورتی	هیدرولیز سریع اوره؛ تولید قدرتمند اوره‌آز	+
نارنجی یا زرد	عدم هیدرولیز اوره؛ باکتری اوره‌آز تولید نمی‌کند یا نمی‌تواند در براث زندگی کند.	–

لوله‌های اوره‌آز براث از چپ به راست با باکتری‌های *Proteus mirabilis*(اوره‌آز مثبت)، و اشرشیا کلی (اوره‌آز منفی) تلقیح شده‌اند. تمام لوله‌ها به مدت ۱۶ ساعت در دمای ۳۷ $^{\circ}C$ گرمخانه‌گذاری شدند.

نتایج تست اوره‌آز آگار: لوله‌های اوره‌آز آگار شیب‌دار از چپ به راست عبارت‌اند از: کنترل، تلقیح شده با *Proteus mirabilis*(اوره‌آز مثبت سریع)، *Klebsiella pneumoniae*(اوره‌آز مثبت تأخیری) و اشرشیا کلی (اوره‌آز منفی). تمام لوله‌ها به مدت ۱۶ ساعت در دمای ۳۷ °C گرمخانه‌گذاری شدند.

کار عملی

۲ گروه کشت کلبسیلا و شیگلا

۲ گروه کشت اشرشیا کلی و سالمونلا

۲ گروه کشت انتروکوک و پروتئوس

۸– محیط کشت LIA

- محیط لیزین آیرون آگار (LIA) جهت افتراق باکتری‌های انتریک (خانواده انتروباکتریاسه) بر اساس توانایی آن‌ها در دِکربوکسیله کردن یا دآمینه کردن لیزین و تولید سولفید هیدروژن (H2S) استفادِه می‌شود. محیط LIA دَر کنار محیط TSIA به منظور شناسایی اعضای سالمونلا و شیگلا نیز کاربرد دارد.

- محیط LIA به شکل یک محیط شیب‌دار عمیق آماده می‌شود. این شکل از محیط باعث ایجاد منطقه هوازی در سطح شیب‌دار و منطقه‌ی بی‌هوازی در منطقه عمیق می‌شود.

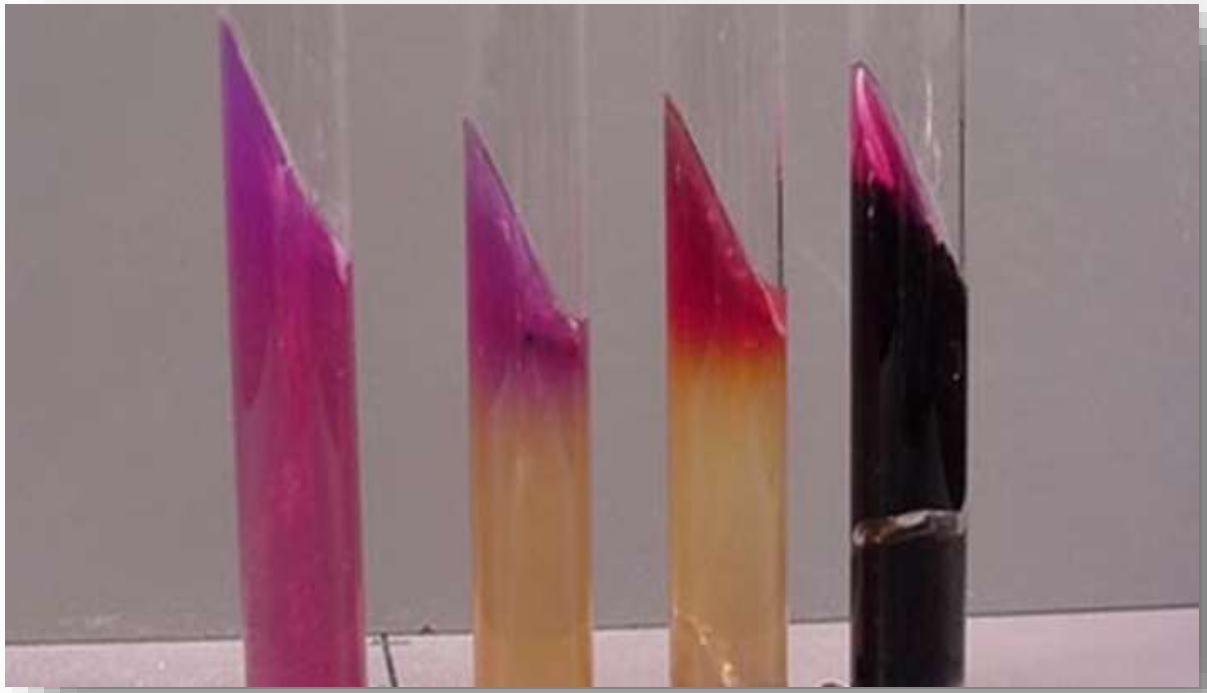
- بعد از دوبار تلقیح عمقی، سطح آن نیز به صورت مارپیچی تلقیح شده و آنگاه با بستن درپوش لوله به صورت محکم، به مدت ۱۸ تا ۲۴ ساعت انکوبه می‌شود.

شکل) نتایج محیط LIA. تفسیر لوله‌های حاوی محیط LIA از چپ به راست: (R/A)؛ (K/A, H2S) {توجه داشته باشید که مقدار کم رسوب سیاه نزدیک به میانه محیط و تولید گاز ناشی از تخمیر گلوکز در انتهای لوله مشاهده می‌شود}؛ کنترل بدون تلقیح؛ و (K/K, H2S) { رنگ عمق لوله به دلیل تشکیل رسوب مبهم دیده می‌شود}.

نتیجه	تفسیر	علامت
سطح شیب‌دار بنفش/ عمق بنفش	لیزین دآمیناز منفی؛ لیزین دکربوکسیلاز مثبت	K/K
سطح شیب‌دار بنفش/ عمق زرد	لیزین دآمیناز منفی؛ لیزین دکربوکسیلاز منفی؛ تخمیر گلوکز	K/A
سطح شیب‌دار قرمز/ عمق زرد	لیزین دآمیناز مثبت؛ لیزین دکربوکسیلاز منفی؛ تخمیر گلوکز	K/A
سطح شیب‌دار قرمز/ عمق قرمز	هیچ تخمیری صورت نگرفته است. پپتون در شرایط هوازی و بی‌هوازی با تولید محصولات قلیایی تجزیه می‌شوند. باکتری مورد نظر از خانواده انتروباکتریاسه نمی‌باشد.	R/A
رسوب سیاه‌رنگ	احیا سولفور	H_2S

Dr A.Mohammadi

Lysine Iron agar (LIA)



کار عملی

۲ گروه کشت کلبسیلا و شیگلا

۲ گروه کشت اشرشیا کلی و سالمونلا

۲ گروه کشت انتروکوک و پروتئوس

۹– محیط سدیم مالونات

- تست مالونات در ابتدا برای افتراق اشرشیا (که در محیط رشد نمی‌کند) و انتروباکتر طراحی شد. در حال حاضر این تست به عنوان یک محیط افتراقی برای تشخیص و تمایز دیگر اعضای انتروباکتریاسه به ویژه سالمونلا بکار گرفته می‌شود.
- رنگ بُرمو تیمول بلو نیز به عنوان معرف pH به محیط اضافه شده که در محیط تلقیح نشده، سبز رنگ است.
- ارگانیسم‌هایی که قادر نیستند از مالونات به عنوان منبع کربن استفاده کنند امّا موفق به مصرف مقدار کمی از گلوکز می‌شوند، ممکن است محیط را کمی زرد کنند یا اینکه رنگی تولید نکنند. این وقایع حاکی از منفی بودن تست است.
- ارگانیسم‌هایی که رنگ آبی تیره تولید می‌کنند، قادرند مالونات را به عنوان منبع کربن استفاده کنند و لذا محیط را قلیایی می‌کنند.
- اگر باکتری‌ها بتوانند از مالونات به عنوان منبع کربن استفاده کنند، پس می‌توانند محصولات قلیایی تولید کنند که دلیل افزایش pH و تغییر رنگ محیط از سبز به آبی تیره است. ظهور آبی تیره حاکی از مثبت بودن تست است.

نتایج تست مالونات: این محیط‌های سیمون سیترات آگار شیب‌دار با یک باکتری مالونات مثبت (لوله سمت چپ) و یک باکتری مالونات منفی (لوله راست) تلقیح شده‌اند. لوله وسط نیز به عنوان کنترل و تلقیح نشده است

جدول نتایج		
نتیجه	**تفسیر**	**علامت**
آبی تیره	مصرف مالونات	+
عدم تغییر رنگ؛ یا کمی زرد	عدم مصرف مالونات	–

کار عملی

۲ گروه کشت کلبسیلا و شیگلا

۲ گروه کشت اشرشیا کلی و سالمونلا

۲ گروه کشت انتروکوک و پروتئوس

۱۰–محیط اورنیتین دکربوکسیلاز

معرف برم‌کروزول در pH 6.8 به بالا به رنگ بنفش و در pH زیر ۵/۲، زردرنگ است.

طح محیط کشت پس از تلقیح با روغن معدنی مسدود می‌شود تا با ممانعت از ورود اکسیژن خارجی، شرایط تخمیر فراهم شود.

تخمیر گلوکز در محیط بی‌هوازی در ابتدا محیط را به دلیل تجمع محصولات نهایی اسیدی، pHپایین و حضور اسیدآمینه خاص باعث تحریک باکتری‌های زردرنگ می‌کند. دِکربوکسیلاز مثبت برای تولید آنزیم می‌شود.

آنزیم‌های دکربوکسیلاز، اسیدهای آمینه را در محیط کشت دکربوکسیله نموده و آمین تولید می‌کنند. این عمل با تجمع محصولات نهایی قلیایی موجب بنفش رنگ شدن محیط می‌شود.

اگر باکتری یک تخمیرکننده گلوکز (مثل تمام اعضای انتروباکتریاسه) باشد امّا دکربوکسیلاز مناسبی تولید نکند، محیط زرد رنگ شده و به همان رنگ باقی می‌ماند امّا اگر دکربوکسیلاز مربوطه تولید شود با دکربوکسیلاسیون اسیدآمینه و ایجاد آمین، pHمحیط کشت افزایش می‌یابد و تغییر رنگ زرد به بنفش (ارغوانی) را مشاهده خواهیم کرد.

ظهور رنگ بنفش حاکی از مثبت بودن و ظهور هر رنگ دیگر حاکی از منفی بودن تست است.

نتایج تست دکربوکسیلاسیون. در تصویر، نتیجه تست یک باکتری دکربوکسیلاز لیزین مثبت (لوله سمت چپ)، یک کنترل در وسط و یک باکتری دکربوکسیلاز لیزین منفی (لوله راست) را مشاهده می‌کنید. به تغییرات رنگی توجه کنید. چنین تغییراتی را در محیط‌های دکربوکسیلاز اُرنیتین و آرژینین هم می‌بینید.

جدول نتایج		
نتیجه	**تفسیر**	**علامت**
عدم تغییر رنگ	عدم دِکربوکسیلاسیون	–
زرد رنگ	تخمیر؛ عدم دِکربوکسیلاسیون	–
بنفش (حتی اندکی)	دِکربوکسیلاسیون؛ باکتری آنزیم عدم دِکربوکسیلاز خاص تولید می‌کند.	+

کار عملی

۲ گروه کشت کلبسیلا و شیگلا

۲ گروه کشت اشرشیا کلی و سالمونلا

۲ گروه کشت انتروکوک و پروتئوس

۱۱– مصرف سیترات(محیط کشت سیمون سیترات)

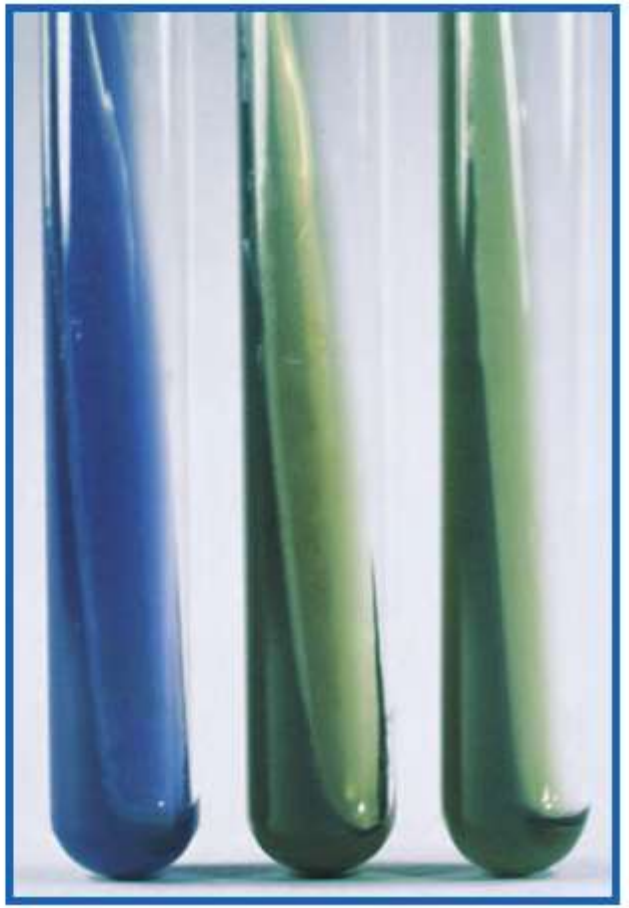
- تعیین توانایی یک میکروارگانیسم در مصرف سیترات به عنوان تنها منبع کربن
- شناسایی و افتراق اعضای خانواده انتروباکتریاسه و همچنین افتراق آن‌ها از باکتری‌های میله‌ای گرم منفی.
- محیط سیمون سیترات آگار یک محیط اختصاصی است که دارای سیترات سدیم به عنوان تنها منبع کربن و فسفات آمونیوم ($NH_4H_2PO_4$) به عنوان 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

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	−

کار عملی

۲ گروه کشت کلبسیلا و شیگلا

۲ گروه کشت اشرشیا کلی و سالمونلا

۲ گروه کشت انتروکوک و پروتئوس

تلقیح کم با انس

۱۲–محیط SIM

- محیط SIM به منظور شناسایی باکتری‌های تولید کننده ایندول با استفاده از آنزیم تریپتوفاناز می‌باشد.

- تست ایندول یکی از اجزاء تست IMViC (ایندول، متیل رد، وُژِز–پروسکوئر و سیترات) می‌باشد که برای افتراق خانواده انتروباکتریاسه مورد استفاده قرار می‌گیرد.

- محیط SIM برای تشخیص و افتراق اعضا احیاءکننده‌ی سولفور خانواده‌ی انتروباکتریاسه به خصوص اعضا جنس سالمونلا، فرانسیسلا و پروتئوس از مورگانلا مورگانی و پرووِیدنسیا رتگری که از این نظر منفی می‌باشند، هم استفاده می‌شود. علاوه بر دو کاربرد اول این محیط، حرکت یک ویژگی تمایزی مهم برای خانواده انتروباکتریاسه می‌باشد.

جدول ۱) نتایج احیا سولفور و تفسیر آن‌ها

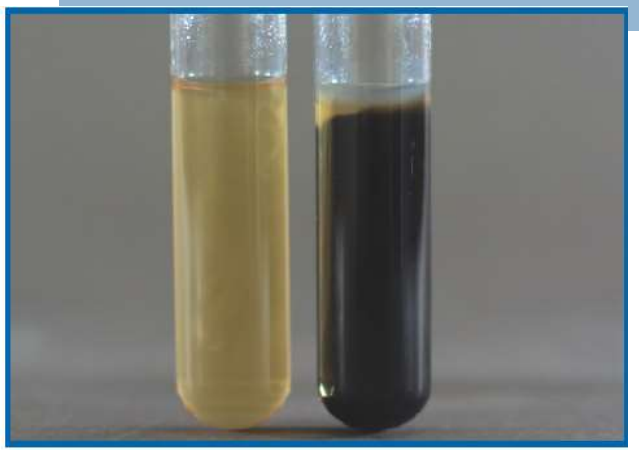
نتیجه	تفسیر	علامت
وجود لکه سیاه در محیط	احیا سولفور (تولید H_2S)	+
عدم وجود لکه سیاه در محیط	عدم احیا سولفور	–

جدول ۲) نتایج احیا ایندول و تفسیر آن‌ها

نتیجه	تفسیر	علامت
مشاهده رنگ قرمز در لایه الکلی معرف کواکس	شکست تریپتوفان به ایندول و پیرووات	+
عدم مشاهده رنگ قرمز در لایه الکلی معرف کواکس	عدم شکست تریپتوفان به ایندول و پیرووات	–

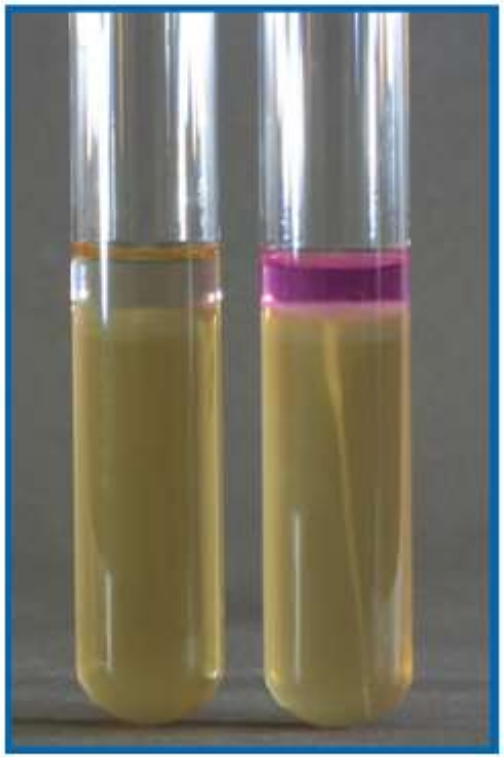
جدول ۳) نتایج حرکت و تفسیر آن‌ها

نتیجه	تفسیر	علامت
رشد انشعابی به سمت بیرون خط stab	حرکت	+
عدم رشد انشعابی	بدون حرکت	–



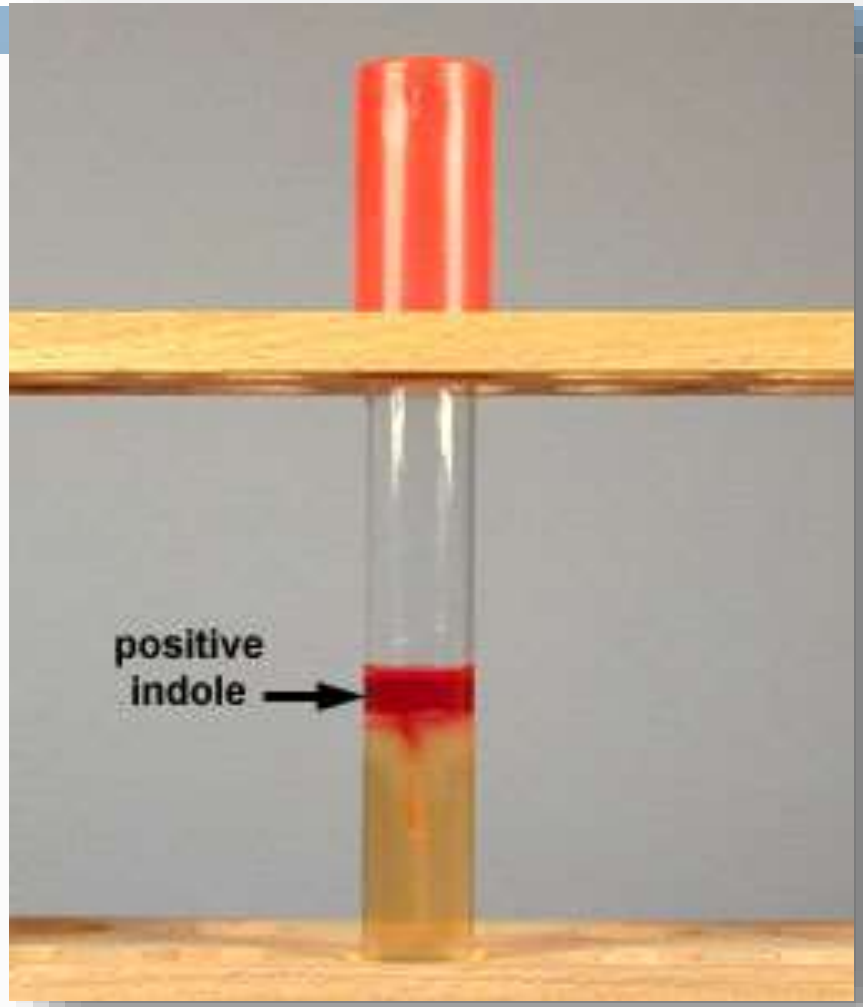
احیا سولفور در محیط SIM.
باکتری در محیط سمت چپ از نظر توانایی احیا سولفور، منفی بوده و باکتری در محیط سمت راست قادر به احیا سولفور بوده و تست مثبت می‌باشد.

شکل) **حرکت در محیط SIM.** لوله‌های حاوی محیط نیمه جامد SIM با باکتری متحرک در سمت راست و باکتری غیر متحرک در سمت چپ مشخص شده‌اند.

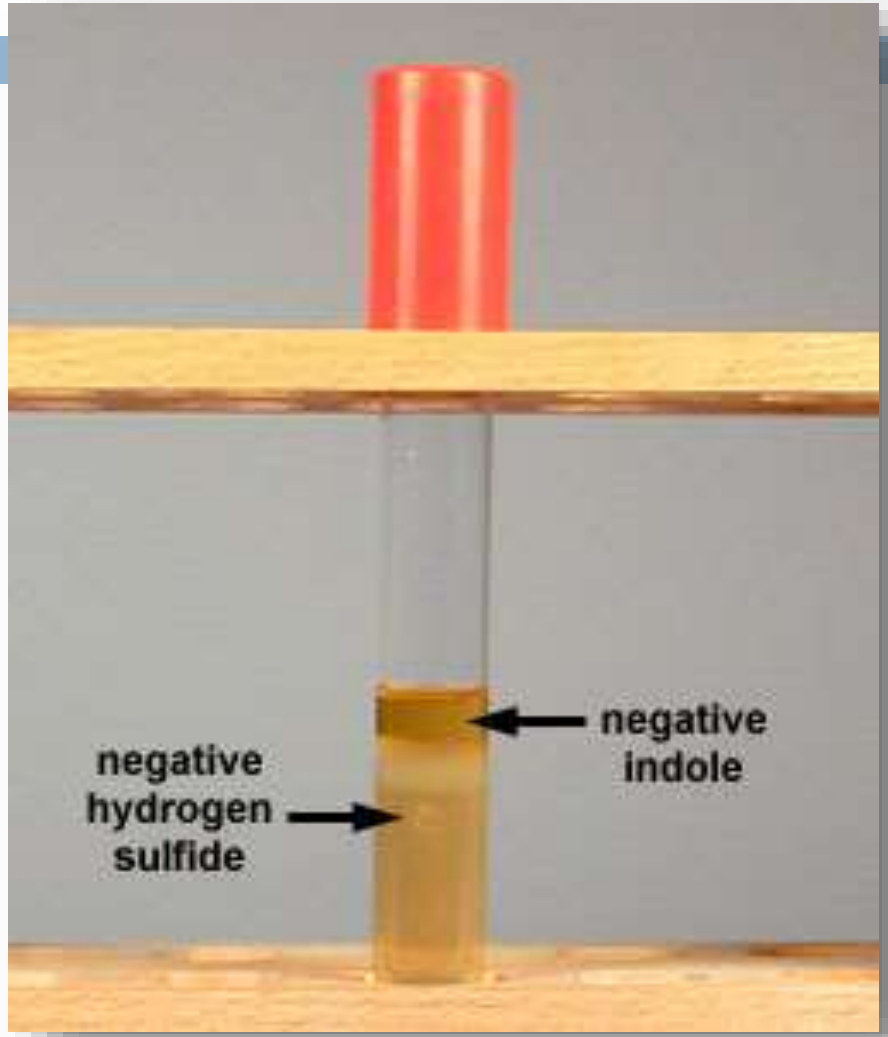


شکل) **نتیجه تست ایندول.** لوله‌های حاوی محیط SIM با باکتری ایندول منفی در سمت چپ و باکتری ایندول مثبت در سمت راست تلقیح شده‌اند.

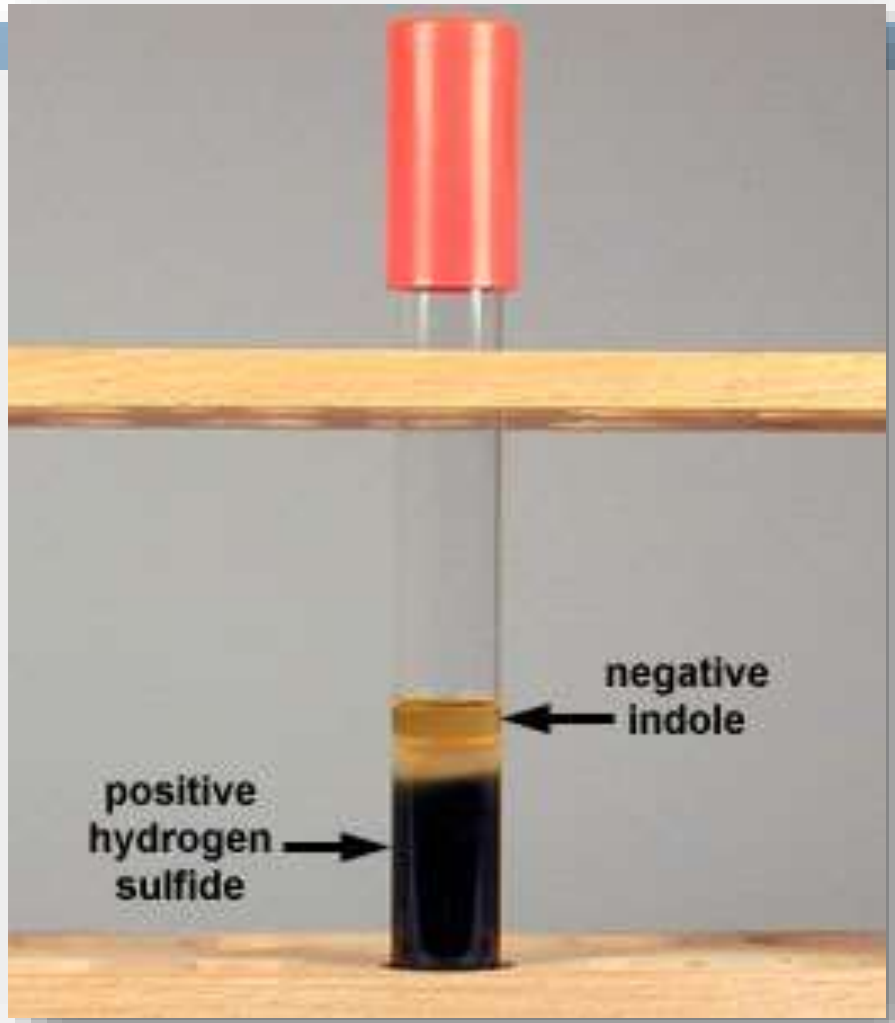
SIM medium



SIM medium



SIM medium



کار عملی

۲ گروه کشت کلبسیلا و شیگلا

۲ گروه کشت اشرشیا کلی و سالمونلا

۲ گروه کشت انتروکوک و پروتئوس

۱۳– تست MR-VP

تست متیل رد(MR):

جهت ردیابی باکتری هایی که گلوکز را مصرف نموده و نتیجه نهایی متابولیسم آنها محصولات اسیدی فراوان از قبیل فومارات و استات می باشد که قابلیت تخمیر مخلوط اسیدی را معلوم می کند.برای انجام تست ارگانیسم را در محیط براث MR.VP در انکوباتور ۳۵-۳۷ درجه در مدت ۴۸ ساعت انکوبه کرده وسپس معرف متیل رد را اضافه کرده و بروز رنگ صورتی تا قرمز نشانه مثبت بوده اما رنگ زرد منفی است. متیل رد مثبت نشانه اینست که PHمحیط کمتر از ۴.۵ است.تمام انتروباکتریاسه متیل رد مثبت بوده بجز دسته کلبسیلاسه(کلبسیلاو سراشیا و انتروباکتر).

تست VP :

در تست وگس پروسکوئر تولید استوئین و بوتان دیول در مسیر تخمیر بوتان دیول در حضور آلفا نفتول در محیط نسبتا قلیایی با پیدایش رنگ قرمز ردیابی می شود.برای اینکار از محیط کشت ۴۸ ساعته MR,VPحدود ۶ قطره آلفا نفتول و ۲ قطره پتاس به آن اضافه کرده و ۱۵ دقیقه در انکوباتور گذاشته سپس آنرا می بینیم پیدایش رنگ قرمز نشانه استوئین بوده و در غیر اینصورت نتیجه منفی گزارش می شود. دسته کلبسیلاسه (کلبسیلا و سراشیا و انتروباکتر) وگس پروسکوئر منفی بوده.در محیط قلیا یی استوئین به دی استیل اکسید شده و واکنش بین دی استیل والفا نفتول کاتالیز شده و رنگ قرمز دیده می شود.

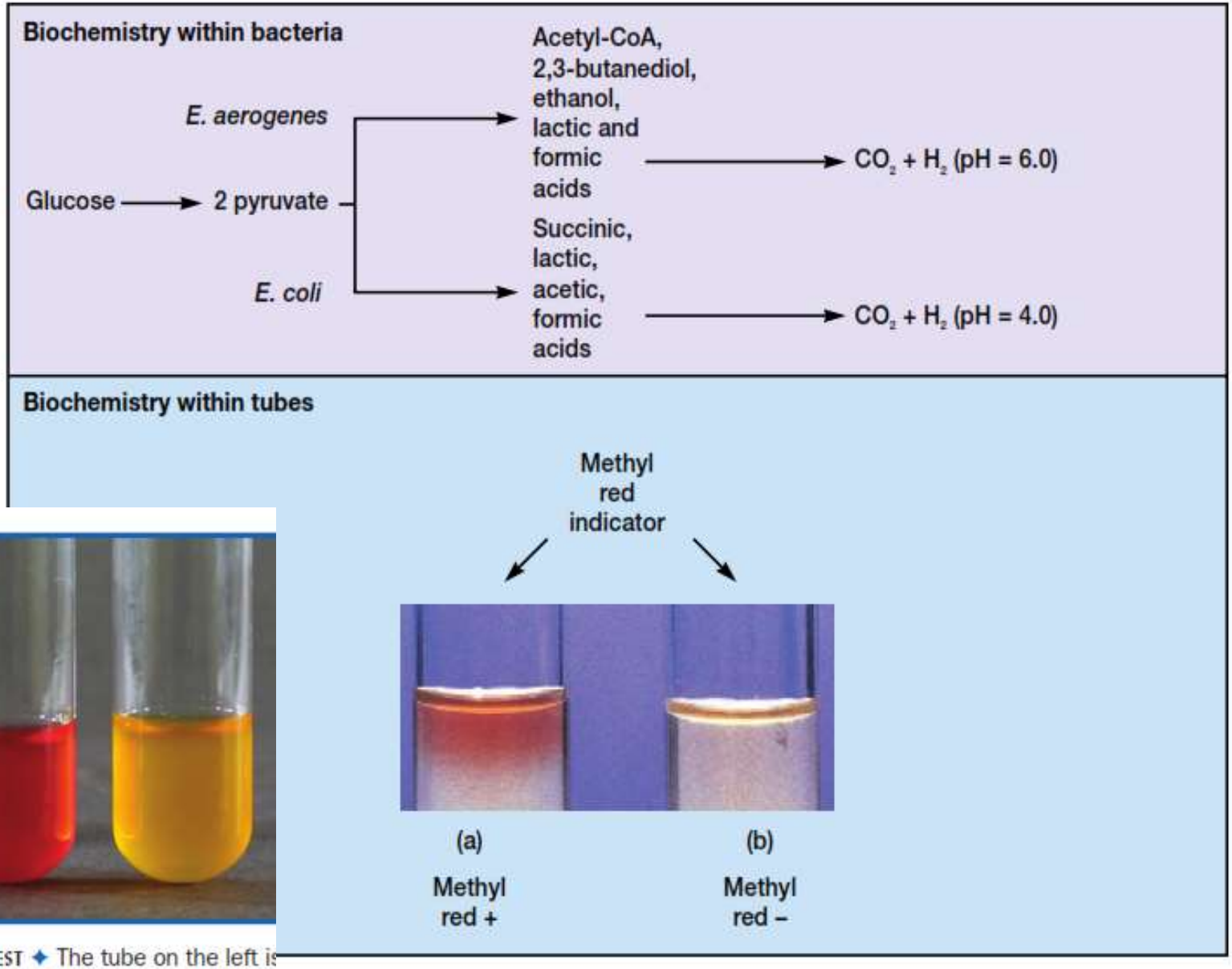
Methyl Red test

- 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= 4.4َبه رنگ قرمز، pH= 6.2به رنگ زرد و در محدوده بین این دو pHبه رنگ نارنجی با سایه‌های مختلف می‌باشد.

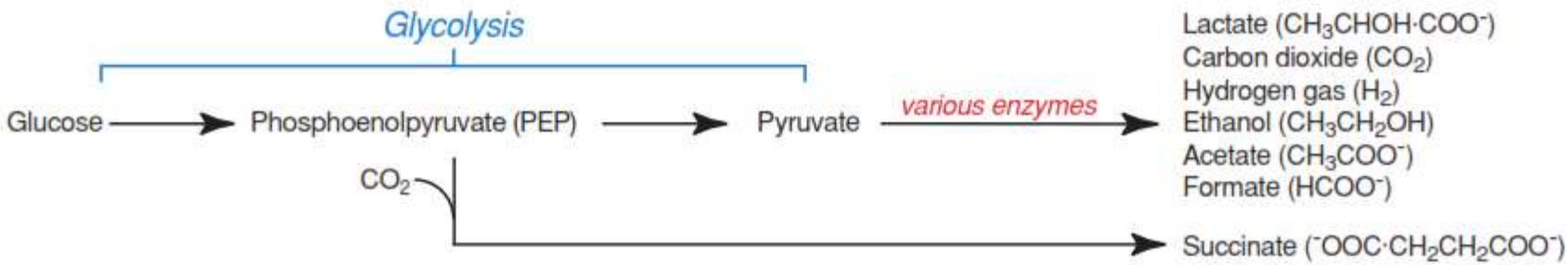
- رنگ قرمز تنها نشانه صحیح واکنش مثبت است. نارنجی حاکی از منفی یا بی‌نتیجه بودن تست است. رنگ زرد نیز حاکی از منفی بودن نتیجه تست است.

Methyl Red Test. (a) *Escherichia coli*, MR+. (b) *Enterobacter aerogenes*, MR–.

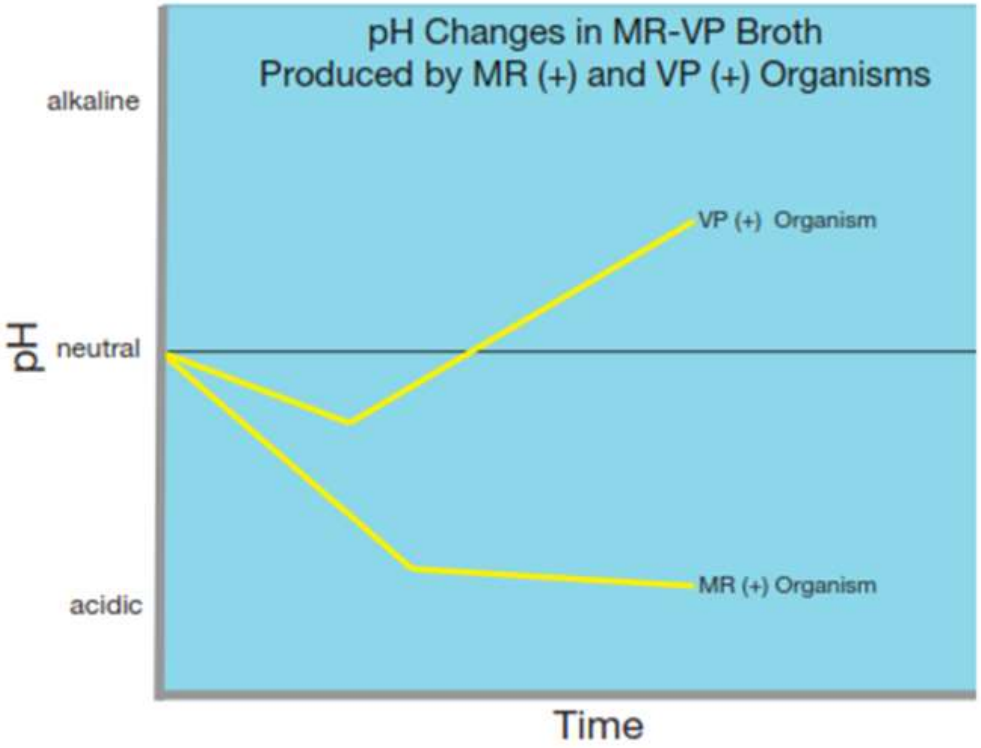


5-10 Methyl Red Test ✦ The tube on the left is
The tube on the right is MR-negative.

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.



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.

Voges-Proskauer Test. (a) *Enterobacter aerogenes*, VP+. (b) *Escherichia coli*, VP–.

Biochemistry within bacteria

Glucose + $^1/_2O_2$ → 2 pyruvate —(CO_2)→ α-acetolactate —(CO_2)→ acetoin → 2,3-butanediol

Biochemistry within tubes

Acetoin + α-naphthol —(40% KOH, absolute alcohol)→ diacetyl + creatine (pink complex)

Barritt's reagent

(a) VP+ (b) VP–

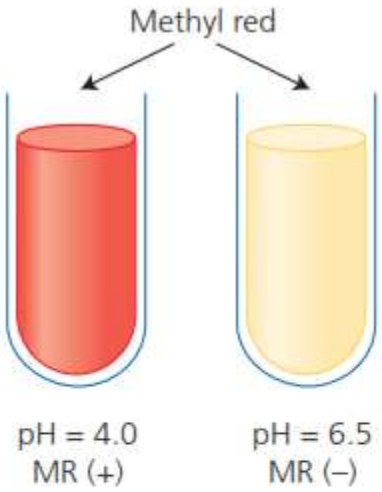
5-13 The Voges-Proskauer Test ✦ The tube on the left is VP-negative. The tube on the right is VP-positive. The copper color at the top of the VP-negative tube is the result of the reaction of KOH and α-naphthol and should not be confused with a positive result.

Methyl Red Test

Medium: MR-VP broth
Substrate: Glucose
+
H_2O

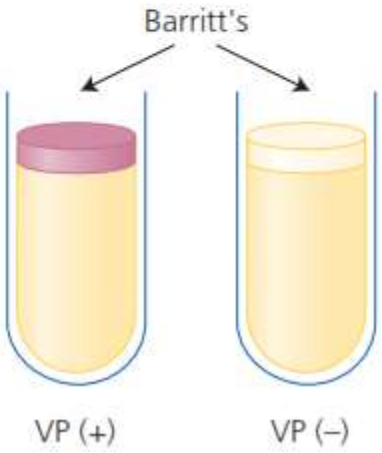
E. coli → Acids → Lactic, Acetic, Formic + CO_2 + H_2 (pH = 4.0)

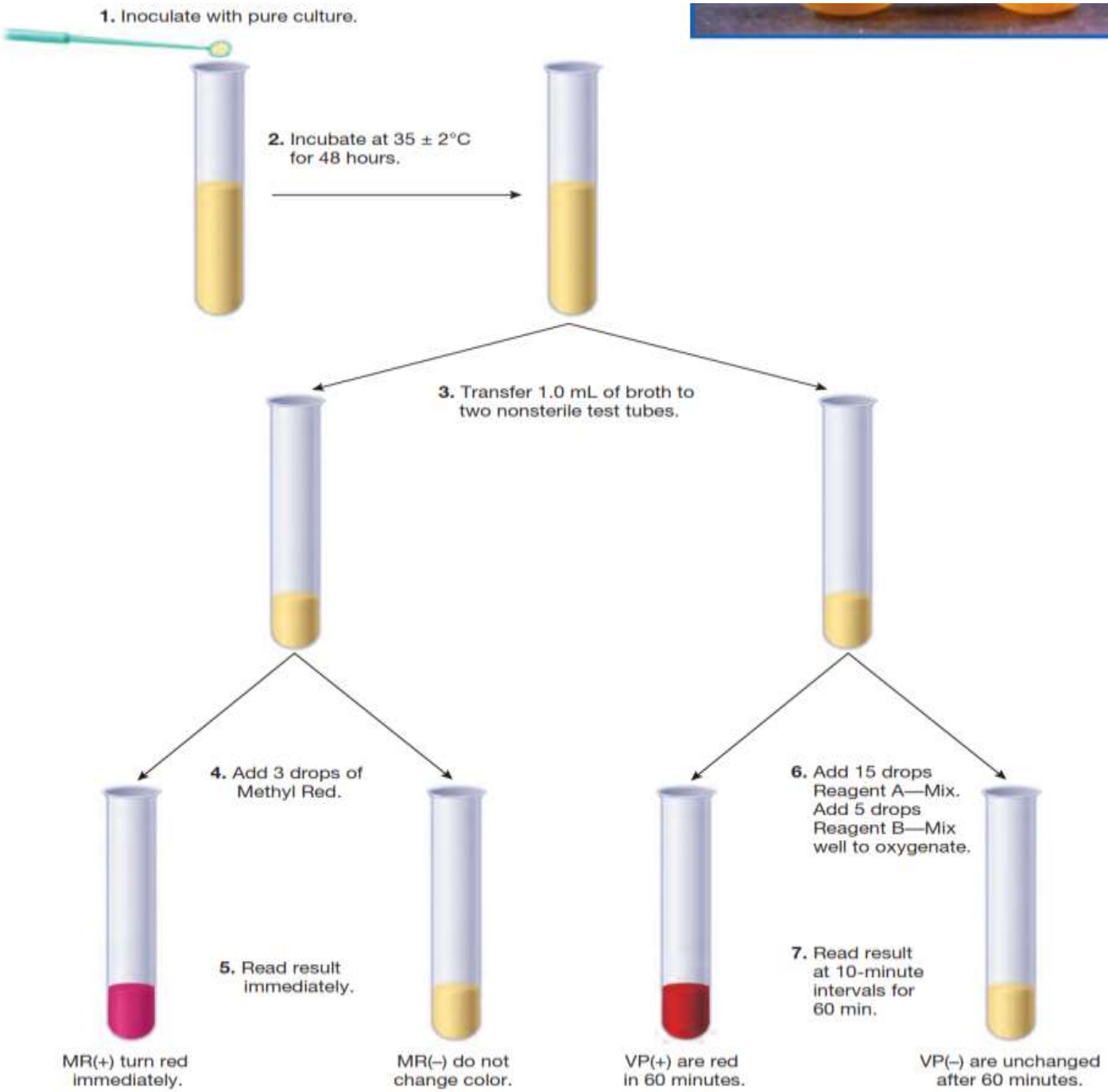
E. aerogenes → Acids → Lactic → Ethanol; Acetic → Acetylmethylcarbinol
+
H_2O + CO_2 (pH = 6.5)



Voges-Proskauer Test

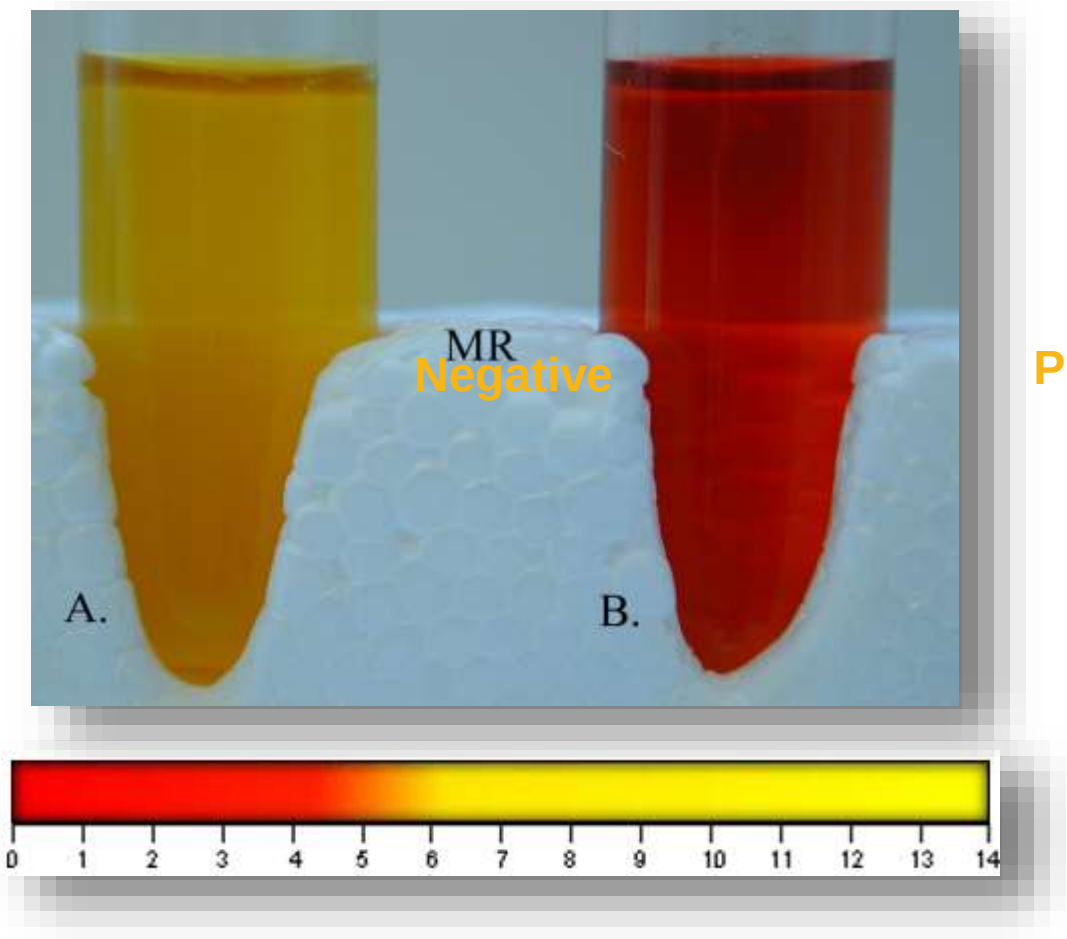
Medium: MR-VP broth
Substrate: Glucose
+
$½ O_2$ → Acetic acid → 2,3-Butanediol, Acetylmethylcarbinol + H_2O + CO_2 (pH = 6.0)




1. Inoculate with pure culture.
2. Incubate at 35 ± 2°C for 48 hours.
3. Transfer 1.0 mL of broth to two nonsterile test tubes.
4. Add 3 drops of Methyl Red.
5. Read result immediately.
6. Add 15 drops Reagent A—Mix. Add 5 drops Reagent B—Mix well to oxygenate.
7. Read result at 10-minute intervals for 60 min.
MR(+) turn red immediately.
MR(–) do not change color.
VP(+) are red in 60 minutes.
VP(–) are unchanged after 60 minutes.

Methyl Red test

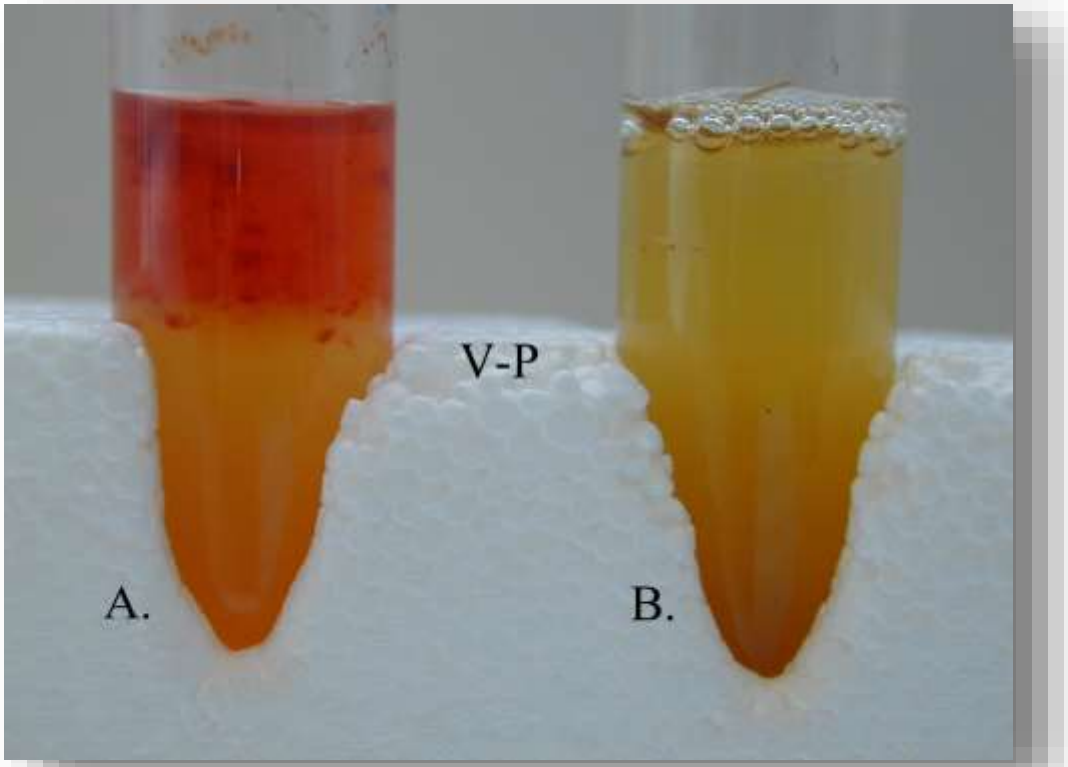
Negative



Positive

Voges-Proskauer test

Positive



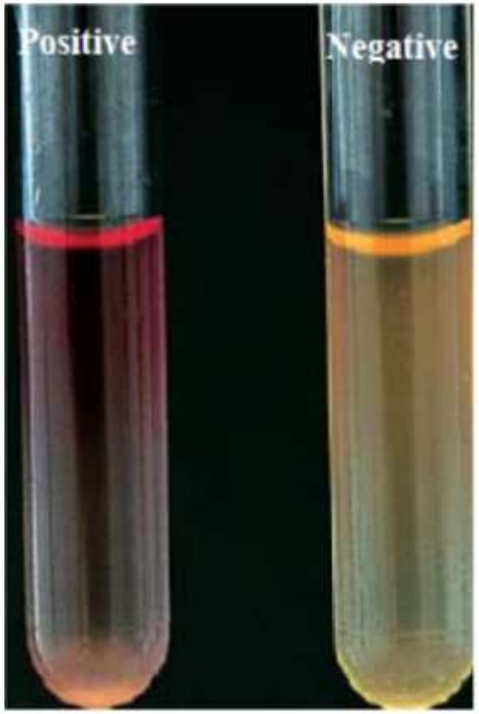
Negative

اشریشیا کلی

کلبسیلا پنومونیه

کنترل منفی (بیرنگ)

کنترل مثبت (رنگ قرمز)



شکل۱۰-۷: آزمایش وژزپروسکوئر (VP)

شکل۱۰-۶: آزمایش متیل رد (MR)

کار عملی

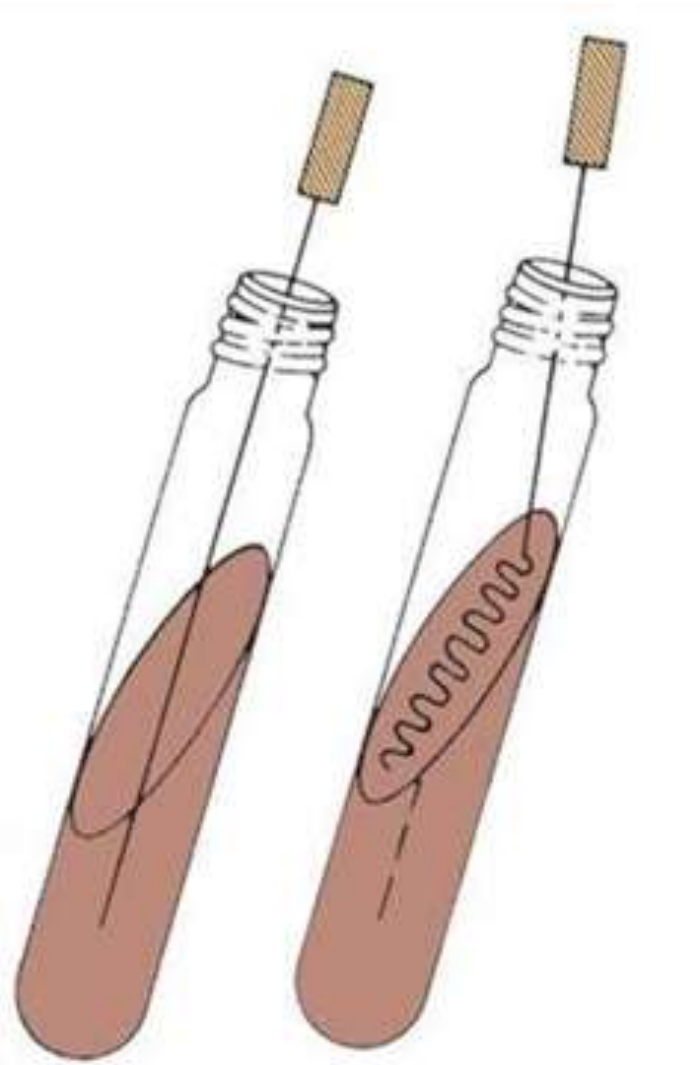
۲ گروه کشت کلبسیلا و شیگلا

۲ گروه کشت اشرشیا کلی و سالمونلا

۲ گروه کشت انتروکوک و پروتئوس

۱۴-محیط TSI

- محیط تریپل شوگر آیرون آگار یک محیط غنی می‌باشد که برای جداسازی باکتری‌ها بر اساس توانایی تخمیر گلوکز، لاکتوز و ساکاروز و نیز احیا سولفور طراحی شده است.
- علاوه بر این سه کربوهیدرات، این محیط کشت حاوی پروتئین‌های حیوانی به عنوان منابع کربن و نیتروژن و سولفات فروس و سدیم تیوسولفات به عنوان منابع سولفور اکسید شده می‌باشد. اندیکاتورهای تغییر pHو سولفید هیدروژن در این محیط به ترتیب فنل رد و آهن به شکل سولفات فروس می‌باشند.
- آگار موجود در این محیط به صورت آگار شیب‌دار با ضخامت کم به همراه عمق زیاد در انتهای لوله است که شرایط رشد برای باکتری‌های هوازی و بی‌هوازی را فراهم می‌کند.
- تلقیح باکتری در این محیط به این صورت است که ابتدا به صورت عمقی و سپس سطح آن را به صورت خطی مارپیچ کشت می‌دهند. زمان گرمخانه‌گذاری به منظور تخمیر کربوهیدرات، ۱۸ تا ۲۴ ساعت و برای واکنش‌های سولفید هیدروژن بیشتر از ۴۸ ساعت می‌باشدAgar .



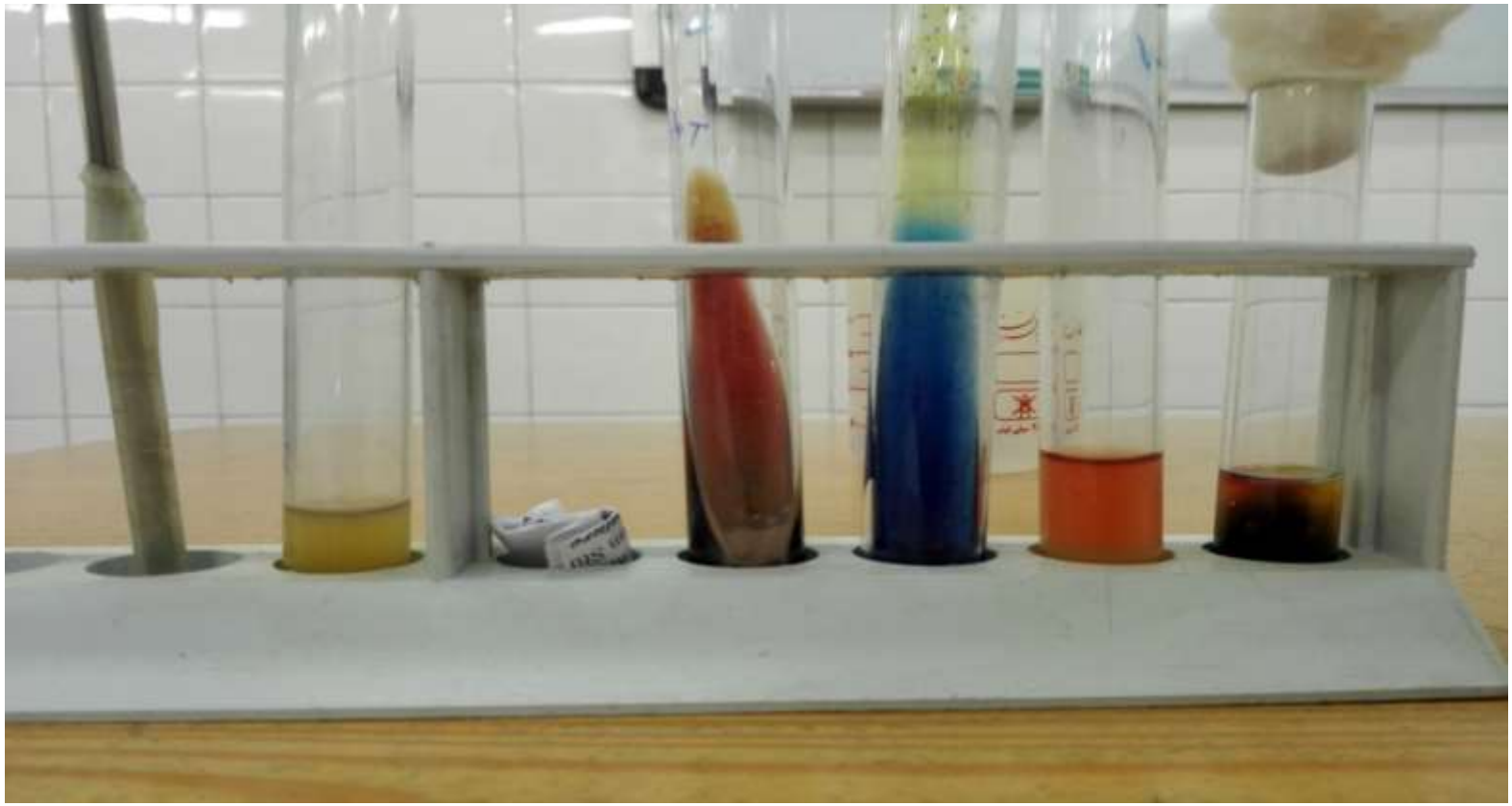
نتیجه	تفسیر	علامت
سطح زرد/ عمق زرد -- KIA	تخمیر گلوکز و لاکتوز به همراه تجمع اسید در سطح شیب‌دار و عمق	A/A
سطح زرد/ عمق زرد -- TSIA	تخمیر گلوکز و لاکتوز و/ یا ساکاروز به همراه تجمع اسید در سطح شیب‌دار و عمق	A/A
سطح قرمز/ عمق زرد	تخمیر گلوکز به همراه تولید اسید. پروتئین‌ها در شرایط هوازی (در سطح شیب‌دار) با تولید محصولات قلیایی (reversion) تجزیه می‌شوند.	K/A
سطح قرمز/ عمق قرمز	هیچ تخمیری صورت نگرفته است. پپتون در شرایط هوازی و بی‌هوازی با تولید محصولات قلیایی تجزیه می‌شوند. باکتری مورد نظر از خانواده انتروباکتریاسه نیست.	K/K
سطح قرمز/ عمق بدون تغییر	هیچ تخمیری صورت نگرفته است. پپتون در شرایط هوازی با تولید محصولات قلیایی تجزیه می‌شوند. باکتری مورد نظر از خانواده انتروباکتریاسه نیست.	K/NC
سطح شیب‌دار بدون تغییر/ عمق بدون تغییر	باکتری دارای رشد آهسته می‌باشد. از خانواده انتروباکتریاسه نیست.	NC/NC
رسوب سیاه در آگار	احیا سولفور. (در شرایط اسیدی، از تخمیر گلوکز یا لاکتوز، رسوب سیاه در عمق ایجاد می‌شود حتی اگر رنگ زرد به‌واسطه رسوب سیاه نامشخص و مبهم باشد.	H_2S
ایجاد شکاف در آگار یا بلند شدن آگار	تولید گاز	

Dr A.Mohammadi

Triple Sugar Iron agar

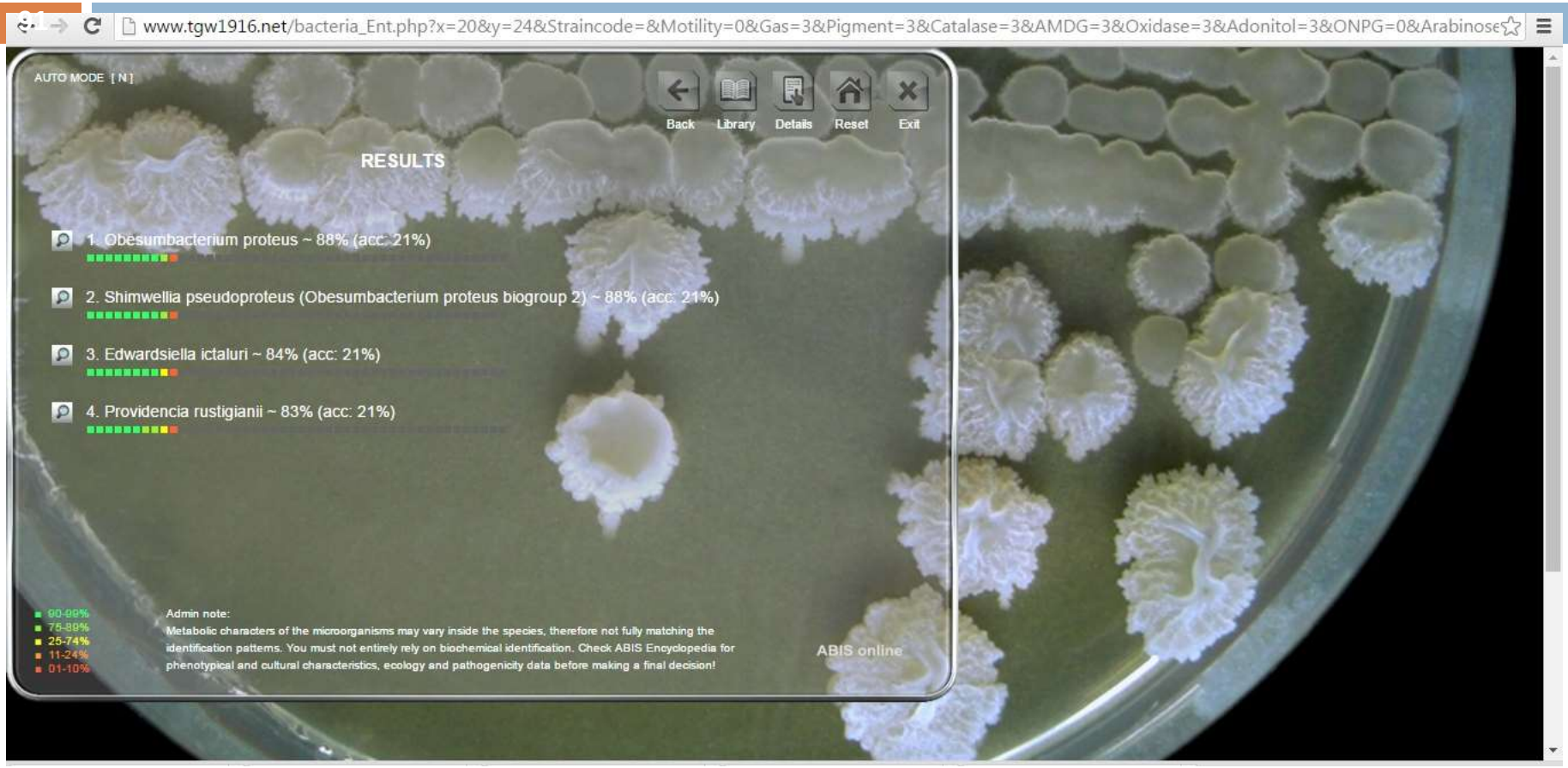
سالمونلا

پروتئوس



جدول ۱۰-۳: خلاصه شده ای از نتایج کشت های انجام شده در جلسه آنترو باکتریاسیه

باکتری	MacConkey	KIA	MR	VP	INDOLE	MOTILITY	UREA	SWARMING	PIGMENT
اشزشیاکلی	+	A/A G+/ H2S -	+	−	+	+	−	−	−
کلبسیلا پنومونیه	-	ALK /A G+/ H2S -	−	+	−	−	−	−	−
شیگلا سونئی	-	ALK /A G - / H2S -	+	−	−	−	−	−	−
سالمونلاتیفی	−	ALK /A G – H2S +	+	−	−	+	−	−	−
سالمونلا پاراتیفی A	−	ALK /A G + /H2S-	+	−	−	+	−	−	−
سالمونلا پاراتیفی B	−	Alk / A G + / H2S +	+	−	−	+	−	−	−
پروتئوس میرابیلیس	-	ALK / A G + / H2S +	+	−	−	+	+	+	−
انتروباکتر	-	ALK /A G+/ H2S -	−	+	−	+	−	−	+


www.tgw1916.net/bacteria_Ent.php?x=20&y=24&Straincode=&Motility=0&Gas=3&Pigment=3&Catalase=3&AMDG=3&Oxidase=3&Adonitol=3&ONPG=0&Arabinose
AUTO MODE [N]
Back
Library
Details
Reset
Exit
RESULTS
1. Obesumbacterium proteus ~ 88% (acc: 21%)
2. Shimwellia pseudoproteus (Obesumbacterium proteus biogroup 2) ~ 88% (acc: 21%)
3. Edwardsiella ictaluri ~ 84% (acc: 21%)
4. Providencia rustigianii ~ 83% (acc: 21%)
90-99%
75-89%
25-74%
11-24%
01-10%
Admin note:
Metabolic characters of the microorganisms may vary inside the species, therefore not fully matching the identification patterns. You must not entirely rely on biochemical identification. Check ABIS Encyclopedia for phenotypical and cultural characteristics, ecology and pathogenicity data before making a final decision!
ABIS online

تست های اضافی

fppt.com

محیط کلیگلر آیرون آگار(Kligler Iron Agar:KIA)

هدف آزمایش: بررسی تخمیر قندهای های گلوکز، لاکتوز، تولید گاز (H_2, CO_2) و سولفید هیدروژن (H_2S) توسط باکتری می باشد.

اساس آزمایش: این محیط حاوی پروتئین، کلرورسدیم، لاکتوز، گلوکز، یک منبع گوگرد(تیوسولفات سدیم)، معرف آهن دار (فریک آمونیوم سیترات)، معرف فنل رد و آگار است. میزان لاکتوز ده برابر گلوکز است. باکتریهایی که از گلوکز استفاده می نمایند، اسید تولید کرده و رنگ محیط را از قرمز به زرد تبدیل می کنند. طی استفاده از گلوکز، اسید ایجاد شده و در ساعات اولیه، کشت رنگ محیط زرد می شود. در ضمن این باکتری ها از دکربوکسیلاسیون اکسیداتیو (Oxidative decarboxylation) پپتون های محیط، ترکیبات قلیایی ایجاد می نمایند که سطح محیط را خنثی نموده ولی قادر به خنثی کردن اسید در عمق لوله نیستند. در نتیجه بعد از انکوباسیون ۲۴ ساعته، رنگ قرمز در سطح و رنگ زرد در ته لوله نمایانگر تخمیر گلوکز و عدم تخمیر لاکتوز است. باکتریهایی که علاوه بر گلوکز، لاکتوز را نیز مصرف می کنند، مقادیر زیادی از اسید ایجاد می کنند که بوسیله محصولات قلیایی حاصل از پپتون ها خنثی نمی گردد، در نتیجه سطح و ته لوله ، هر دو به رنگ زرد باقی می ماند. تولید گاز (CO_2 و H_2) به صورت شکاف یا حبابهایی در ته لوله مشخص می گردد (شکل ۱۰-۳).

fppt.com

تولید H_2S به علت احیای تیوسولفات است. این گاز بیرنگ بوده و با حضور معرف آهن دار مشخص می گردد. H_2S با یون فریک ترکیب و رسوب سیاه سولفید فرو (FeS) تولید می گردد. احیای تیوسولفات در شرایط اسیدی صورت می گیرد و رنگ سیاه غالباً در انتهای محیط دیده می شود.

دستور کار:

الف- با استفاده از آنس سر سوزنی استریل، باکتری مجهول خودر را برداشت نموده، ابتدا تا ۲/۳ عمق و سپس در سطح شیب دار به صورت خطوط زیگزاک کشت دهید.

ب- لوله کشت داده شده را برای مدت۲۴- ۱۸ ساعت در گرمخانه ۳۷° C قرار دهید.

ج- در جلسه بعد بر اساس توضیحات فوق الذکر باکتری مجهول خودرا شناسایی کنید

fppt.com

جدول ۱۰-۱: تفسیر محیط KIA

تخمیر گلوکز و لاکتوز Glucose+ Lactose fermented	**اسید در عمق، اسید در سطح** Acid slant/Acid butt.	**زرد – زرد** Yellow / Yellow(لوله ۴ شکل)
تخمیر گلوکز Glucose Fermented	**اسید در عمق ، قلیا در سطح** Alkaline slant/Acid butt.	**زرد – قرمز** Red / yellow (لوله ۲و۳ شکل)
عدم تخمیر گلوکز و لاکتوز Glucose & Lactose nonfermenter	**قلیا در عمق ، قلیا در سطح** Alkaline slant/Alkaline butt.	**قرمز – قرمز** Red / Red(لوله ۱ شکل)
*تولید گاز ← تشکیل حباب و یا ترک خوردن محیط *تولید گاز هیدروژن سولفوره ← رسوب سیاه رنگ		

fppt.com

شکل ۱۰-۳: محیط KIA (الگوی تخمیر قندهای های گلوکز و لاکتوز)

fppt.com

جدول۱۰-۲: نتایج کشت در محیط های مک کانگی و KIA

نام باکتری	رنـگ کلنـی در محیط Mac	تخمیر لاکتوز در محیط KIA	تخمیر گلوکز در محیط KIA	ایجاد گاز در محیط KIA	ایجاد H_2S در محیط KIA	خلاصه
اشریشیاکلی	صورتی	+	+	+	-	A*/A Gas+ H_2S -
شیگلا سونئی	بی رنگ	-	+	-	-	K/A Gas- H_2S -
کلبسیلا پنومونیه	بی رنگ	-	-	+	-	K/A Gas+ H_2S -
سالمونلاتیفی	بی رنگ	-	+	-	+	K/A Gas- H_2S +
سالمونلا پارا A	بی رنگ	-	+	+	-	K/A Gas+ H_2S -
سالمونلا پارا B	بی رنگ	-	+	+	+	K/A Gas+ H_2S +
پروتئوس	بی رنگ	-	+	+	+	K/A Gas- H_2S +
انتروباکتر	بی رنگ	-	+	+	-	K/A Gas+ H_2S -

A: Acid

K: Alkaline

fppt.com

۷- پدیده سوارمینگ

اساس آزمایش :

یکی از پدیده هایی که به تشخیص جنس پروتئوس کمک شایان توجهی می نماید کشت نقطه ای پروتئوس در سطح پلیت حاوی ژلوز ساده یا بلاد آگار است که با تشکیل پرده ای مواج (پدیده سوارمینگ) خود را نمایان می سازد (شکل ۱۰-۱۲) .

شکل ۱۰-۱۲:ایجاد سوارمینگ توسط پروتئوس

fppt.com

دستور کار:

الف- با استفاده از لوپ از باکتری مجهول برداشت نموده وبه صورت نقطه ای در گوشه ای از پلیت کشت دهید.

ب- پلیت کشت داده شده را برای مدت۲۴- ۱۸ ساعت در گرمخانه ۳۷° C قرار دهید .

ج- در جلسه بعد بر اساس توضیحات فوق الذکر باکتری مجهول خودرا شناسایی کنید.

fppt.com

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