

به نام خدا

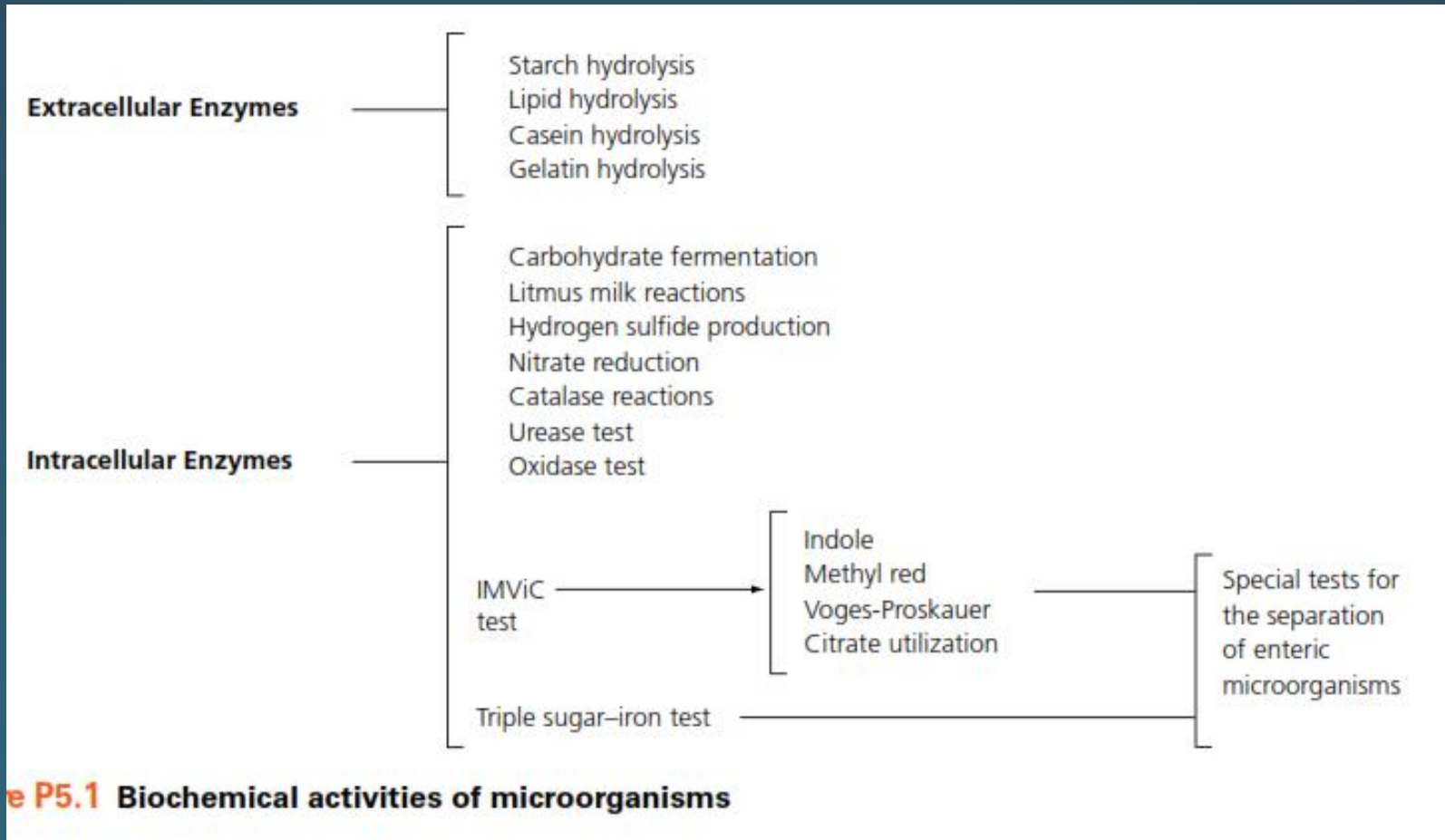


IMViC tests

MICROBIOLOGY LAB

By: **Dr. A. Mohammadi**

Department of Biology,
Faculty of science,
University of Alzahra



IMViC tests:

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



1-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 می‌دهد 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.



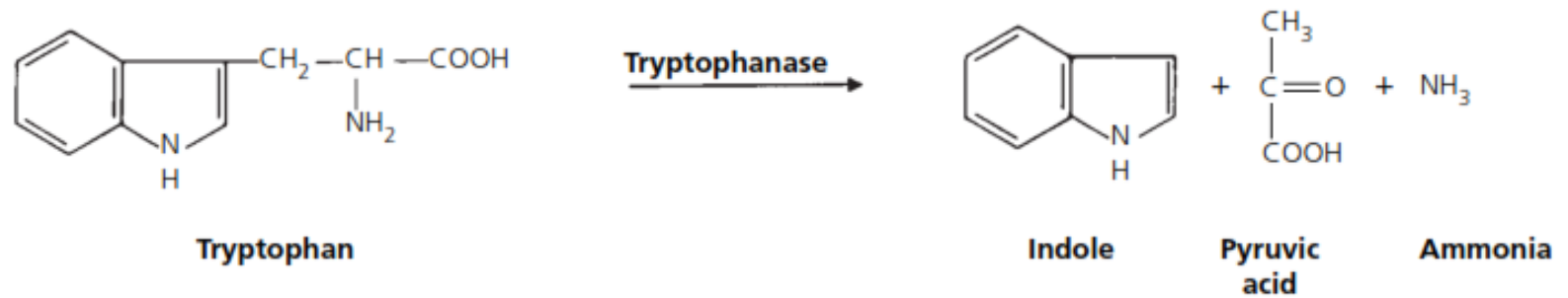


Figure 23.1 Enzymatic degradation of tryptophan

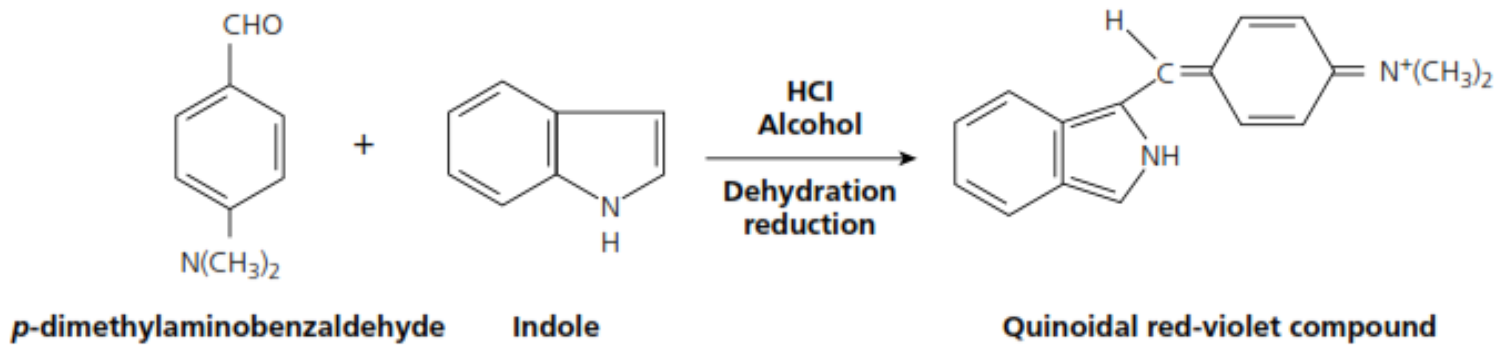
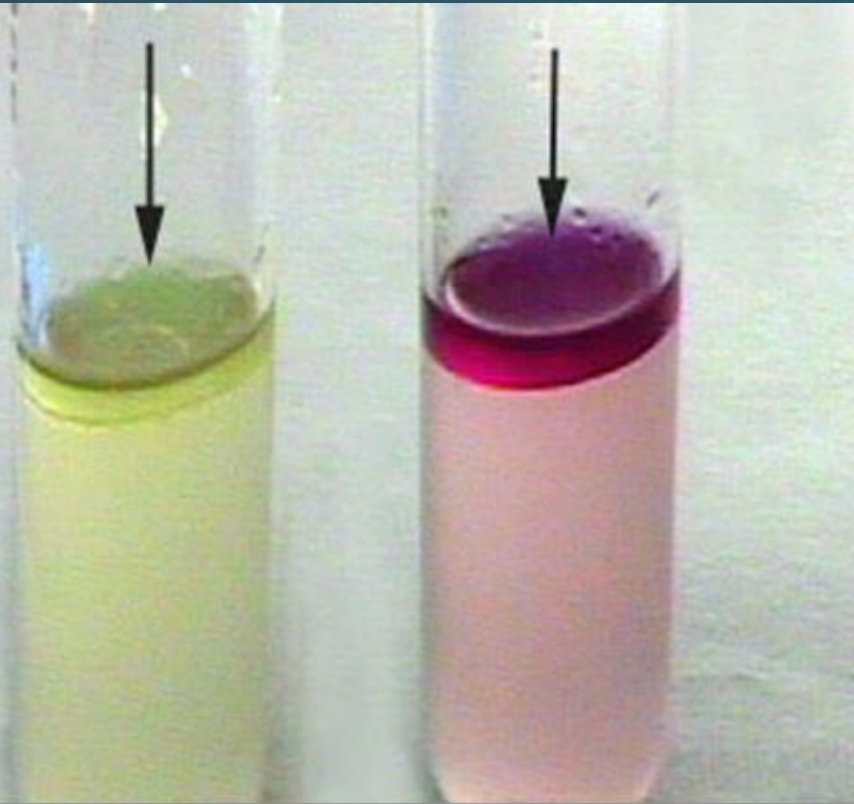


Figure 23.2 Indole reaction with Kovac's reagent

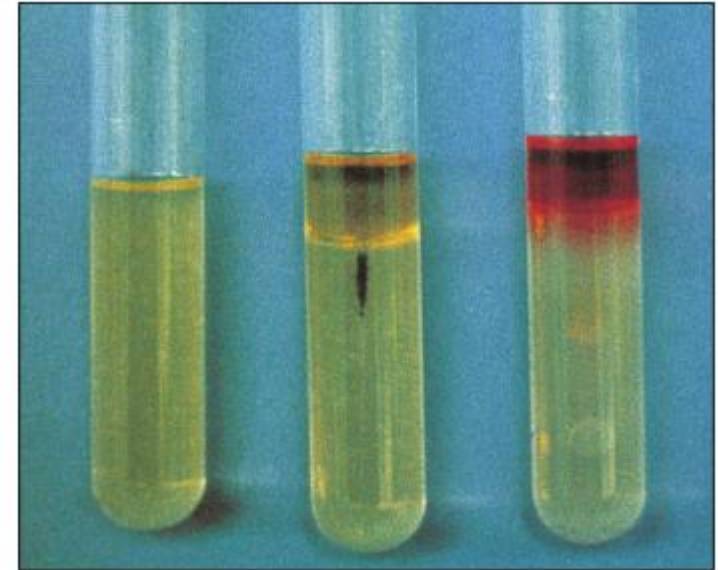


Indole production test



Negative

Positive



(a)

(b)

(c)

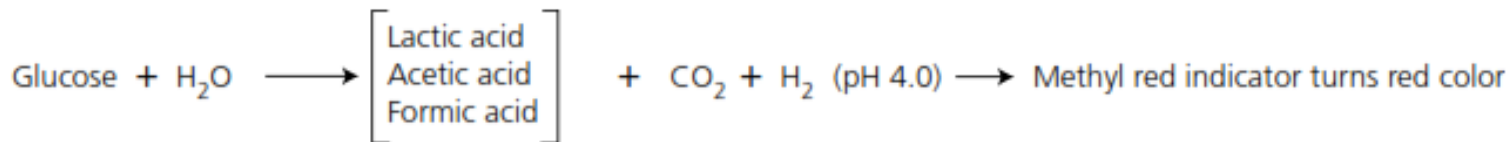
Figure 23.3 Indole production test.

(a) Uninoculated, **(b)** negative, and **(c)** positive.



2-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 pH محیط می‌شوند.
- تخمیر اسیدی مخلوط با افزودن معرف متیل رد پس از مرحله انکوباسیون تأیید می‌شود. معرف متیل رد یک اندیکاتور pH است که در pH= 4.4 به رنگ قرمز، pH= 6.2 به رنگ زرد و در محدوده بین این دو pH به رنگ نارنجی با سایه‌های مختلف می‌باشد.
- رنگ قرمز تنها نشانه صحیح واکنش مثبت (تشکیل مخلوط اسید) است. نارنجی حاکی از منفی یا بی‌نتیجه بودن تست است. رنگ زرد نیز حاکی از منفی بودن نتیجه تست است.



3.4 Glucose fermentation reaction with methyl red pH reagent

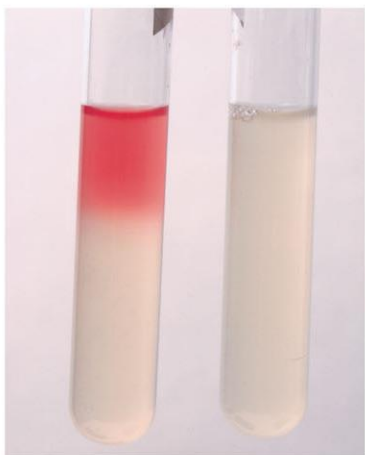


محیط MR-VP محیطی است که به دو منظور بکار می‌رود تا توانایی یک موجود در انجام یک یا هر دو مسیر تخمیر را بررسی کنیم. با تست متیل رد (MR) می‌توان تخمیر اسیدی مخلوط^۱ را شناسایی کرد. تست وُژز-پروسکوئر (VP) به شناسایی باکتری‌هایی کمک می‌کند که قادرند استوئین را به عنوان بخشی از تخمیر ۲ و ۳-بوتانیدیول^۲ را تولید نمایند.

Contains: peptone, glucose, and buffer (buffer will neutralize weak acids so only strong stable acids will be detected by methyl red)

Distinguishes ability to catabolize glucose into stable mixed acids (lactic, acetic, and formic acids) in the mixed acid pathway

w-Hill Companies, Inc. Permission requ



Methyl Red Test

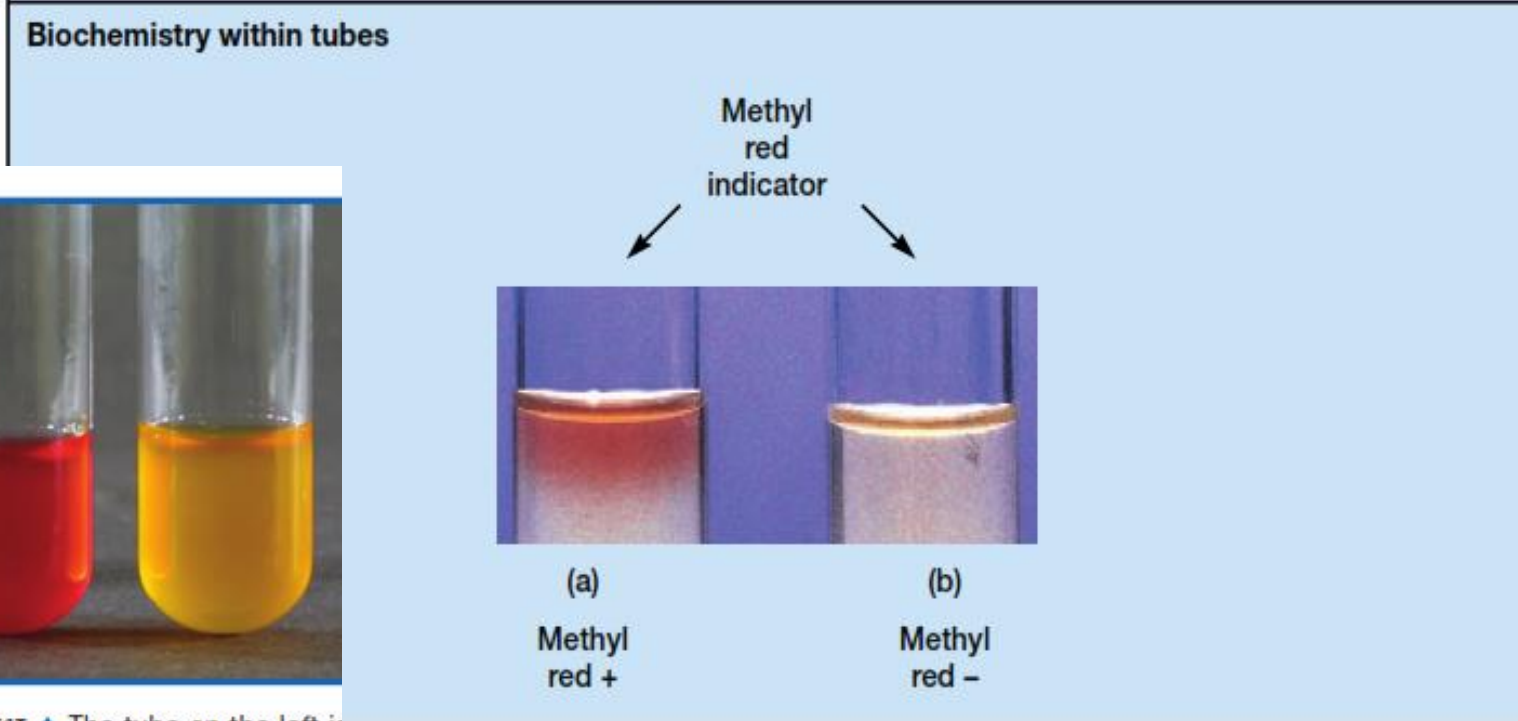
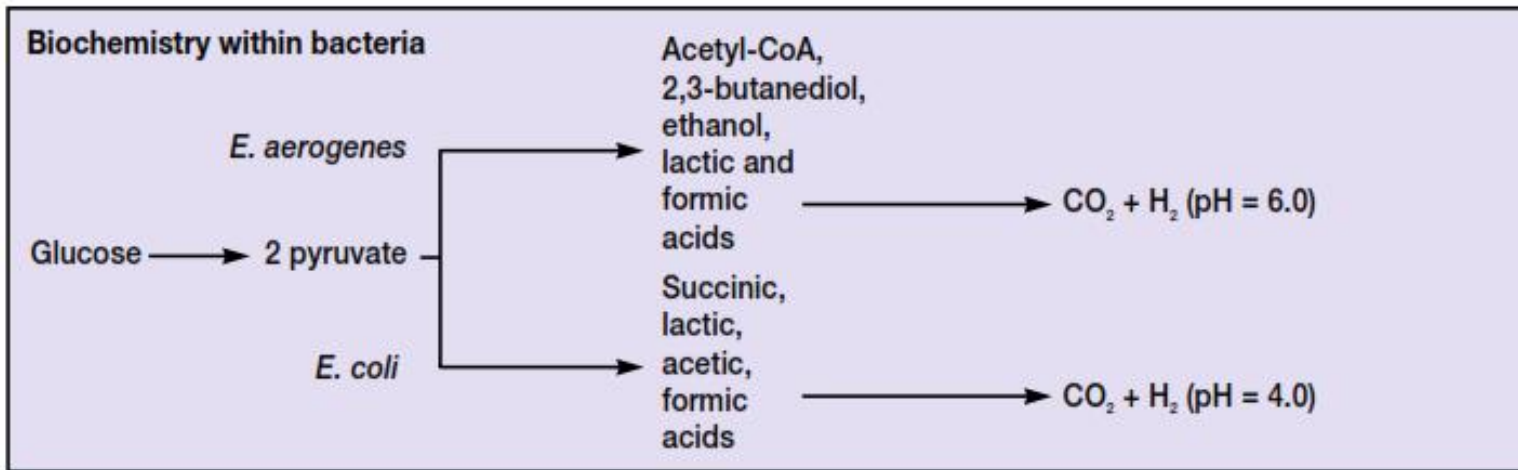
Tube on left is positive (*E. coli*);
tube on right is negative.



Dr A.MOHAMMADI

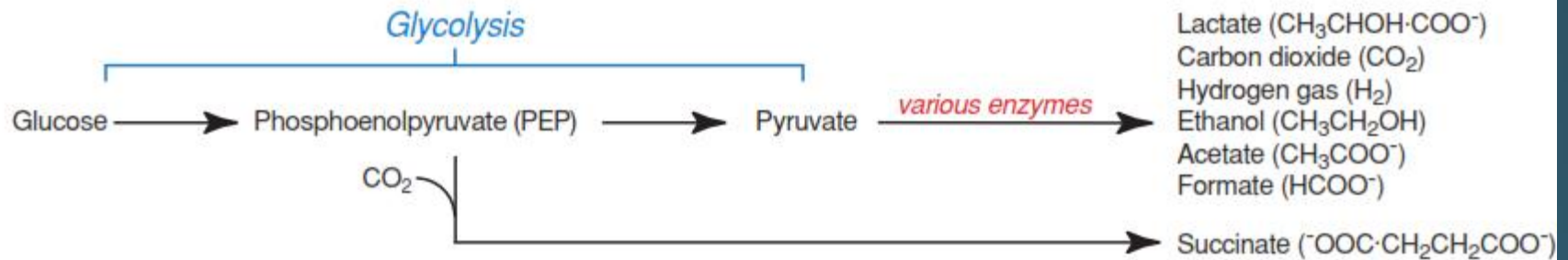


Methyl Red Test. (a) *Escherichia coli*, MR+. (b) *Enterobacter aerogenes*, MR-.



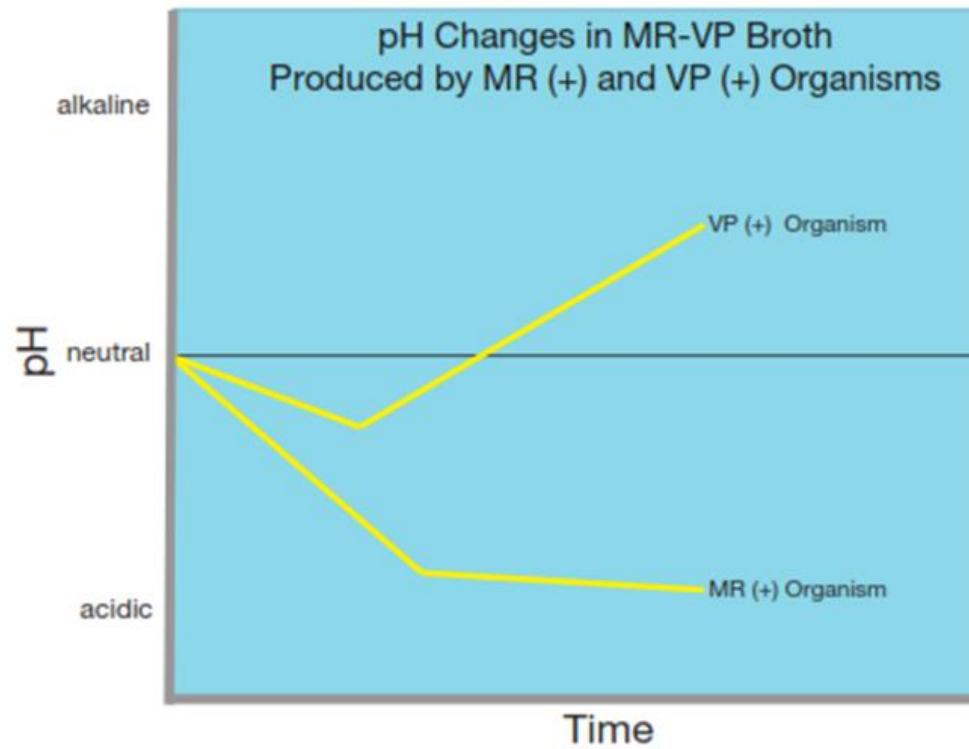
5-10 METHYL RED TEST ♦ The tube on the left is MR-positive. The tube on the right is MR-negative.

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.



3-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 محیط باشد) به دی استیل می‌شود که به نوبه خود با هسته‌های گوانیدین پپتون واکنش داده و یک رنگ **قرمز** ایجاد می‌کند

- نتیجه مثبت تست VP با 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.



MR-VP Medium: Voges-Proskauer Test

Inoculation method: loop transfer

Contains: peptone and glucose

Additional reagents added: Barritt's A (alpha naphthol) and Barritt's B (KOH) (will react with acetoin to produce a red product, alone produce a copper colored product)

Distinguishes the ability to catabolize glucose into the neutral end product butanediol (the oxidized product is acetoin) in the butylene glycol pathway

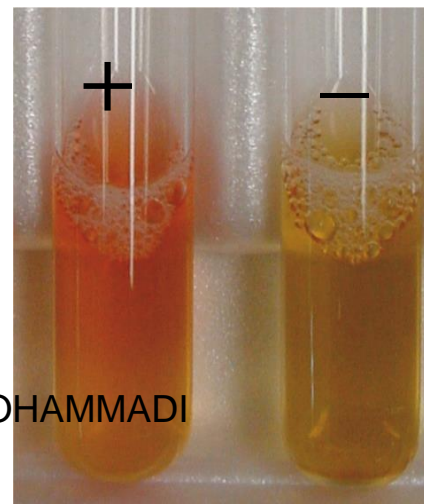
Results: Red = positive for acetoin and thus for 2,3-butanediol production

Yellow/Orange = no acetoin, negative for 2,3-butanediol production

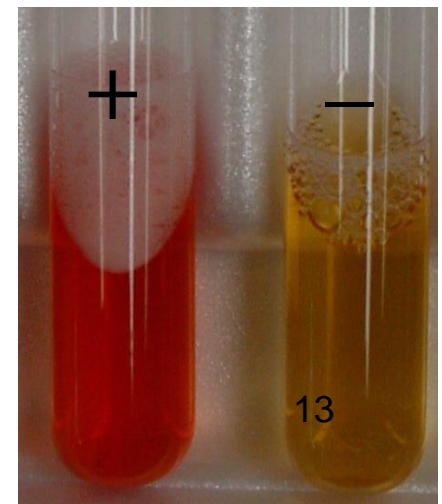


Voges-Proskauer Test

Tube on left is positive (*E. aerogenes*); tube on right is negative.



Dr A.MOHAMMADI



13

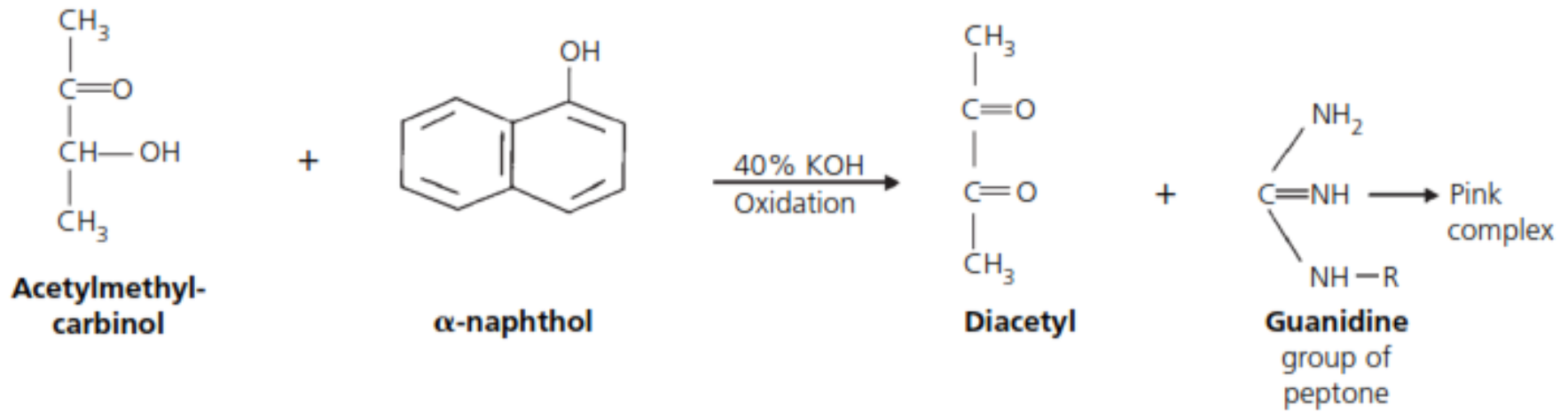
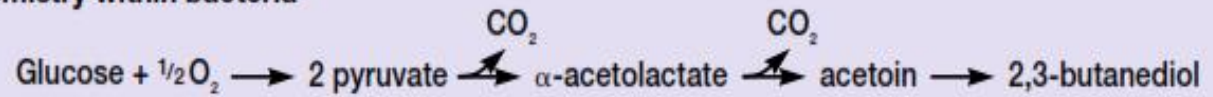


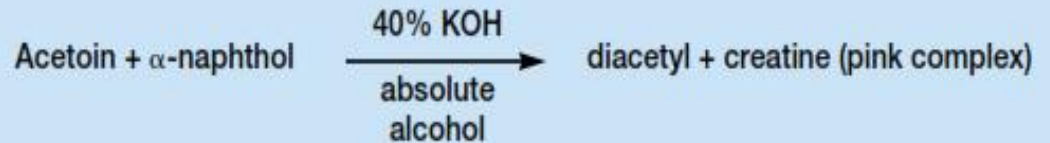
Figure 23.7 Acetylmethylcarbinol reaction with Barritt's reagent

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

Biochemistry within bacteria



Biochemistry within tubes



Barritt's reagent

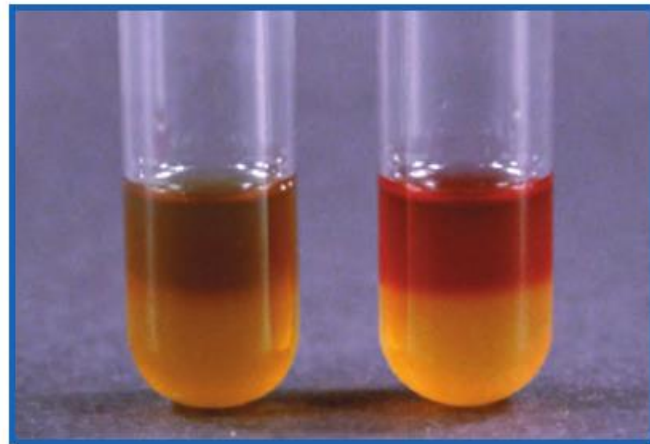


(a)

VP+

(b)

VP-



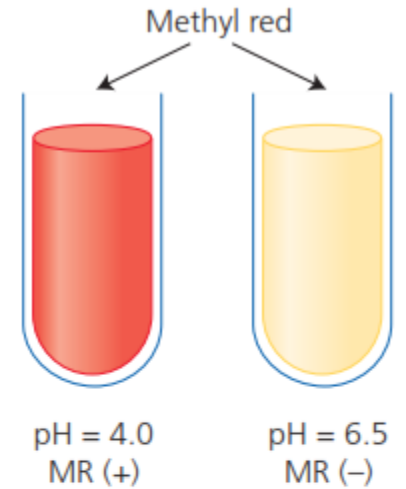
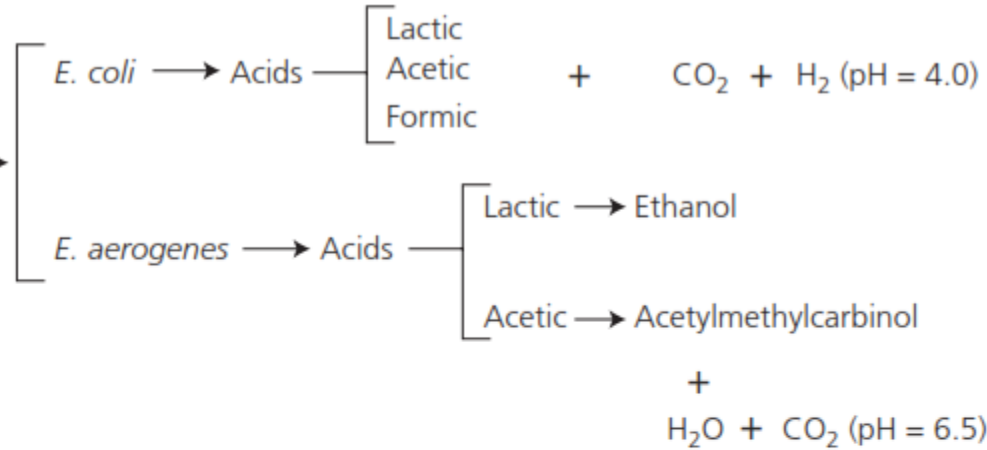
5-13 THE VOGES-PROSKAUER TEST ♦ The tube on the left is VP-negative. The tube on the right is VP-positive. The copper color at the top of the VP-negative tube is the result of the reaction of KOH and α -naphthol and should not be confused with a positive result.

Methyl Red Test

Medium: MR-VP broth

Substrate: Glucose

+
H₂O

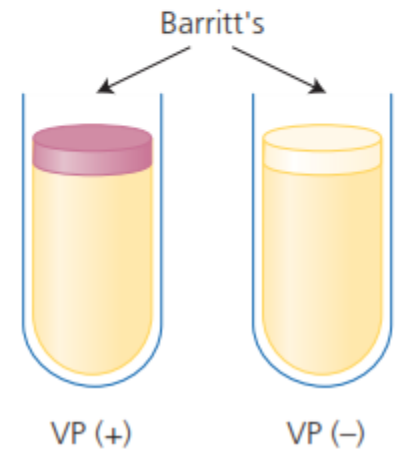
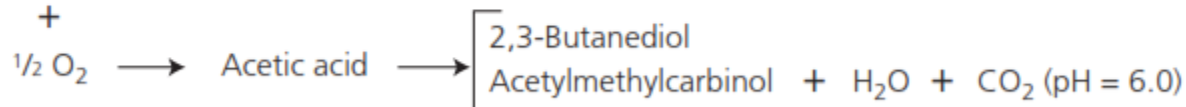


Voges-Proskauer Test

Medium: MR-VP broth

Substrate: Glucose

+
1/2 O₂



1. Inoculate with pure culture.



2. Incubate at $35 \pm 2^\circ\text{C}$ 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.

MR(+) turn red immediately.

MR(-) do not change color.

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.

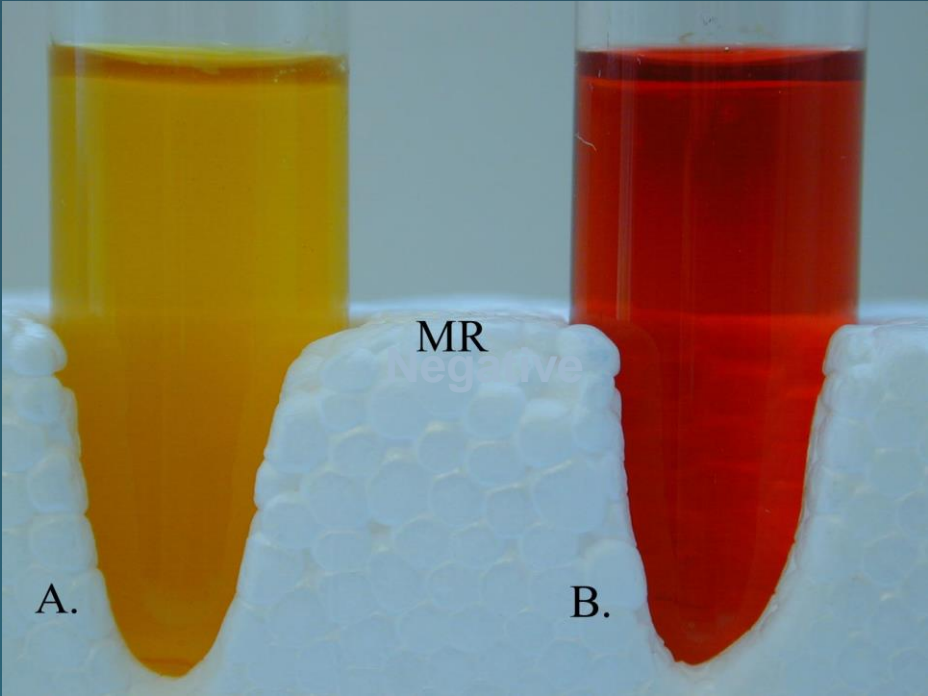
VP(+) are red in 60 minutes.

VP(-) are unchanged after 60 minutes.

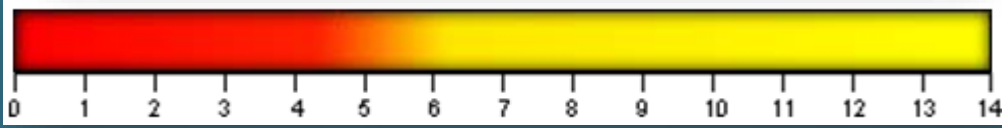


Methyl Red test

Negative

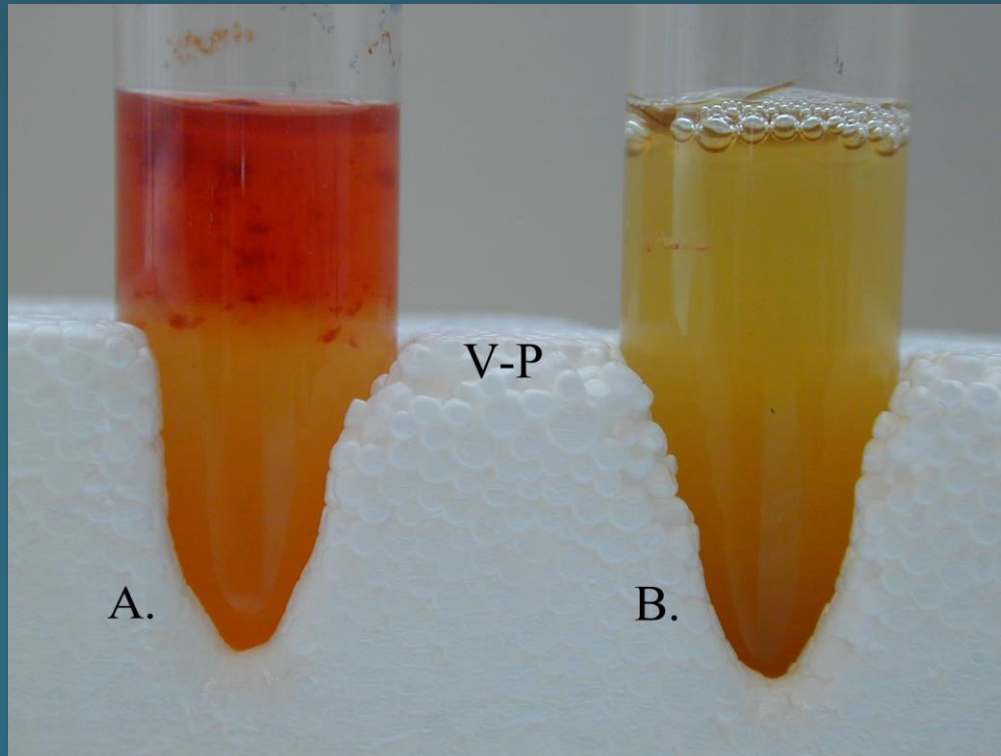


Positive



Voges-Proskauer test

Positive



Negative



کار عملی ۱: تست ایندول

مواد و ابزار مورد نیاز:

- چهار لوله حاوی محیط SIM
- معرف کواکس
- سوزن تلقیح (آنس)
- جای لوله آزمایش
- مارکر یا مداد شمعی
- چراغ گاز
- کشت تازه از باکتری‌های:

Escherichia coli

Salmonella typhimurium (BSL-2)

Klebsiella pneumoniae (BSL-2)



کار عملی ۱: تست ایندول

- (۱) تهیه ۴ لوله حاوی محیط SIM. سه لوله را با نام باکتری‌ها، نام خودتان و تاریخ نام‌گذاری کرده و یک لوله هم به عنوان کنترل برجسب‌گذاری کنید.
- (۲) سه لوله را با باکتری‌ها تلقیح کنید. در این تلقیح، سوزن را به روش عمقی تا سه‌چهارم محیط آگار (تا اندازه ۱ سانتی‌متر از انتهای لوله) تلقیح کنید. دقت کنید که هنگام خارج کردن سوزن، در راستای همان خط تلقیح اصلی خارج شود. در لوله‌ی کنترل هیچ تلقیحی انجام نشود.
- (۳) تمام لوله‌ها در شرایط هوازی، در دمای $2 \pm 35^{\circ}\text{C}$ به مدت ۲۴-۴۸ ساعت گرمخانه‌گذاری شوند.

آزمایشگاه دوم:

- (۱) لوله‌ها را از نظر رشد انشعابی از خط تلقیح و تشکیل رسوب سیاه در محیط بررسی کنید. هر گونه تولید H_2S و یا حرکت را در دفتر نتایج ثبت کنید.
- (۲) معرف کواکس را داخل هر لوله (با عمق ۲-۳ میلی‌متر) اضافه کنید. بعد از چند دقیقه رنگ قرمز در لایه معرف را بررسی کنید.
- (۳) نتایج خود را در نمودار آماده شده در دفتر نتایج ثبت کنید.



کار عملی ۱: تفسیر نتایج

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	-



کار عملی ۲: MRVP

مواد و ابزار مورد نیاز:

- معرف متیل رد
 - معرف های A و B و ژز پروسکوئر
 - سه محیط کشت متیل رد / وژز پروسکوئر (MR-VP)
 - کشت تازه باکتری های:
- شش لوله آزمایش غیراستریل
 - سه پی پت ۱ میلی لیتری غیراستریل

Escherichia coli
Enterobacter aerogene
Klebsiella pneumoniae (BSL-2)



کار عملی ۲: MRVP

جلسه نخست:

- (۱) سه لوله از MR-VP براث آماده کنید. نام نمونه یا باکتری مورد آزمایش، نام خودتان و تاریخ را بر دو عدد آن درج کنید. لوله سوم را کنترل برچسب گذاری کنید.
- (۲) دو لوله براث را با باکتری‌های مورد آزمون تلقیح کنید. نمونه‌های کنترل را تلقیح نکنید.
- (۳) تمام لوله‌ها را در دمای $2 \pm 35^{\circ}\text{C}$ ، به مدت ۴۸ ساعت گرمخانه گذاری کنید.

جلسه دوم:

- (۱) هر لوله براث را به خوبی مخلوط کنید. ۱ میلی‌لیتر از هر لوله را به لوله‌های غیر استریل منتقل کنید. پی‌پت‌ها بایستی استریل باشند لیکن برای لوله‌ها ضرورتی ندارد. به مراحل ذکر شده در تصویر بعد توجه کنید.
- (۲) به سه جفت لوله‌های مورد آزمایش، معرف‌ها را به ترتیب زیر اضافه کنید.

لوله ۱: تست متیل رد

- ✓ سه قطره معرف متیل رد بیافزایید. نتیجه واکنش را فوراً بخوانید. تشکیل رنگ قرمز نشانه‌ی مثبت بودن آزمایش برای مسیر تخمیر اسیدی مخلوط است.
- ✓ با کمک جدول تفسیر تست متیل رد، نتایج خود را ثبت کنید.



کار عملی ۲: MRVP

لوله ۲: تست وُژز پروسکوئر

- ✓ ۱۵ قطره (۰/۶ میلی لیتر) معرف A وُژز پروسکوئر بیافزایید. محیط را کاملاً مخلوط کنید تا اکسیژن رسانی شود.
- ✓ ۵ قطره (۰/۲ میلی لیتر) معرف B وُژز پروسکوئر بیافزایید. محیط را کاملاً مخلوط کنید تا اکسیژن رسانی شود.
- ✓ لوله‌ها را در جای ثابتی (جای لوله‌ای) قرار داده و از نظر تغییرات رنگی هر ۱۰ دقیقه یک بار و به مدت ۱ ساعت مورد بررسی قرار دهید. محیط را در فواصل گفته شده مجدد مخلوط کنید تا اکسیژن رسانی شود.
- ✓ با کمک جدول تفسیر VP، نتایج خود را ثبت کنید. گاهی اوقات تفکیک واکنش‌های ضعیف مثبت از واکنش‌های منفی دشوار است. معمولاً واکنش‌های VP منفی، رنگ مسی و واکنش‌های ضعیف VP مثبت، رنگ صورتی ایجاد می‌کنند. قوی‌ترین تغییر رنگ باید در سطح باشد.



کار عملی ۲: تفسیر نتایج

نتایج آزمون متیل رد و تفسیر آن

نتایج	تفسیر	شناسایی
قرمز	تخمیر مخلوط اسیدی	+
عدم تغییر رنگ	عدم تخمیر مخلوط اسیدی	-

نتایج آزمون وُز-پروسکوئر و تفسیر آن

نتایج	تفسیر	شناسایی
قرمز	تخمیر ۲ و ۳- بوتانادیول (تولید استوئین)	+
عدم تغییر رنگ	عدم تخمیر ۲ و ۳- بوتانادیول (عدم تولید استوئین)	-



نکات

- در تست متیل رد، گرمخانه گذاری کمتر از ۴۸ ساعت ممکن است منجر به نتیجه‌ی منفی کاذب شود چرا که در این مدت ممکن است محصولات اسیدی به حد کافی در محیط تولید نشود.
- برخی از انتروباکتریاسه فقط در ابتدای دوره انکوباسیون تولید اسید می‌نمایند ولی تنها باکتری‌هایی که قادر باشند برای مدت طولانی طی انکوباسیون (۴۸-۷۲ ساعت) pH محیط را در حد پایین حفظ نمایند دارای واکنش مثبت می‌باشند.
- معرف‌های VP که با استوئین واکنش می‌دهند قادرند در حضور اکسیژن یک محصول قرمز رنگ تشکیل دهند. لذا بهتر است با ضربه زدن به ته لوله‌ها یا تکان دادن آن‌ها، محیط را هوادهی کنید. البته بایستی مراقب باشید که محیط به بیرون پاشیده نشود.
- اگر لوله‌های تست VP به خوبی هوادهی نشوند، اکسیژن موجود در لوله‌ها برای واکنش معرف‌ها با استوئین کافی نبوده و لذا نتیجه به صورت منفی کاذب گزارش شود.
- گرمخانه گذاری نبایستی کمتر از ۴۸ ساعت باشد چرا که در تست VP، برخی از باکتری‌ها برای تولید استوئین به این مدت نیاز دارند.
- هر دو معرف VP، سمی هستند لذا در هنگام حمل حتماً از دستکش استفاده کنید.



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

