بسم الله الرحمن الرحیم

تست های بیوشیمیایی برای تشخیص جنس های خانواده انتروباکتریاسه از همدیگر

IMViC

Indole, Methyl Red, Voges-Proskauer , i , Citrate

Morteza Khomeiri

IMViC tests

آزمون ها برای افتراق **باکتری های جنس های روده ای خانواده انتروباکتریاسه**

I = حرف اول کلمه ایندول **Indole** است که توانایی باکتری در تولید ایندول از تریپتوفان را آزمون می کند.

M = حرف اول کلمه متیل (رد) **Methyl red**است که توانایی تولید مخلوطی از اسیدها توسط باکتری از تخمیر گلوکز را تست می کند.

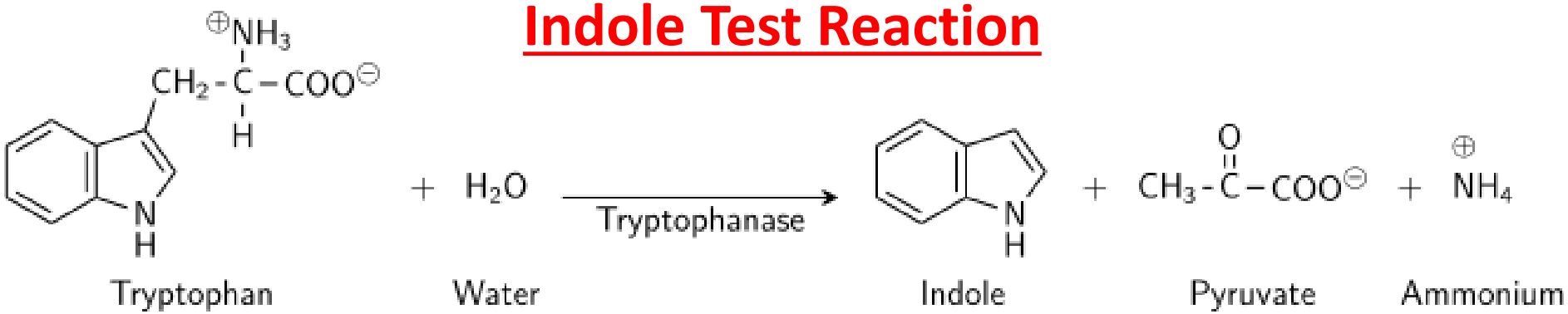
V = حرف اول عبارت وژس پروسکوئر **Voges- Proskauer** است. این آزمون توانایی تولید استوئین **Acetoin** توسط باکتری از گلوکز را آزمون می کند .

C = حرف اول سیترات **Citrate** است که توانایی یک باکتری در استفاده از سیترات به عنوان تنها منبع کربن را آزمون می کند.

Indole test: Principle

- Indole test is used to determine the ability of an organism to split amino acid tryptophan to form the compound indole. Tryptophan is hydrolysed by **tryptophanase** to produce three possible end products – one of which is indole. Indole production is detected by Kovac's or Ehrlich's reagent which contains **4 (p)-dimethylamino benzaldehyde**, this reacts with indole to produce a red coloured compound.

Indole Test Reaction



https://microbeonline.com/indole-test-principle-procedure-results/

Procedure

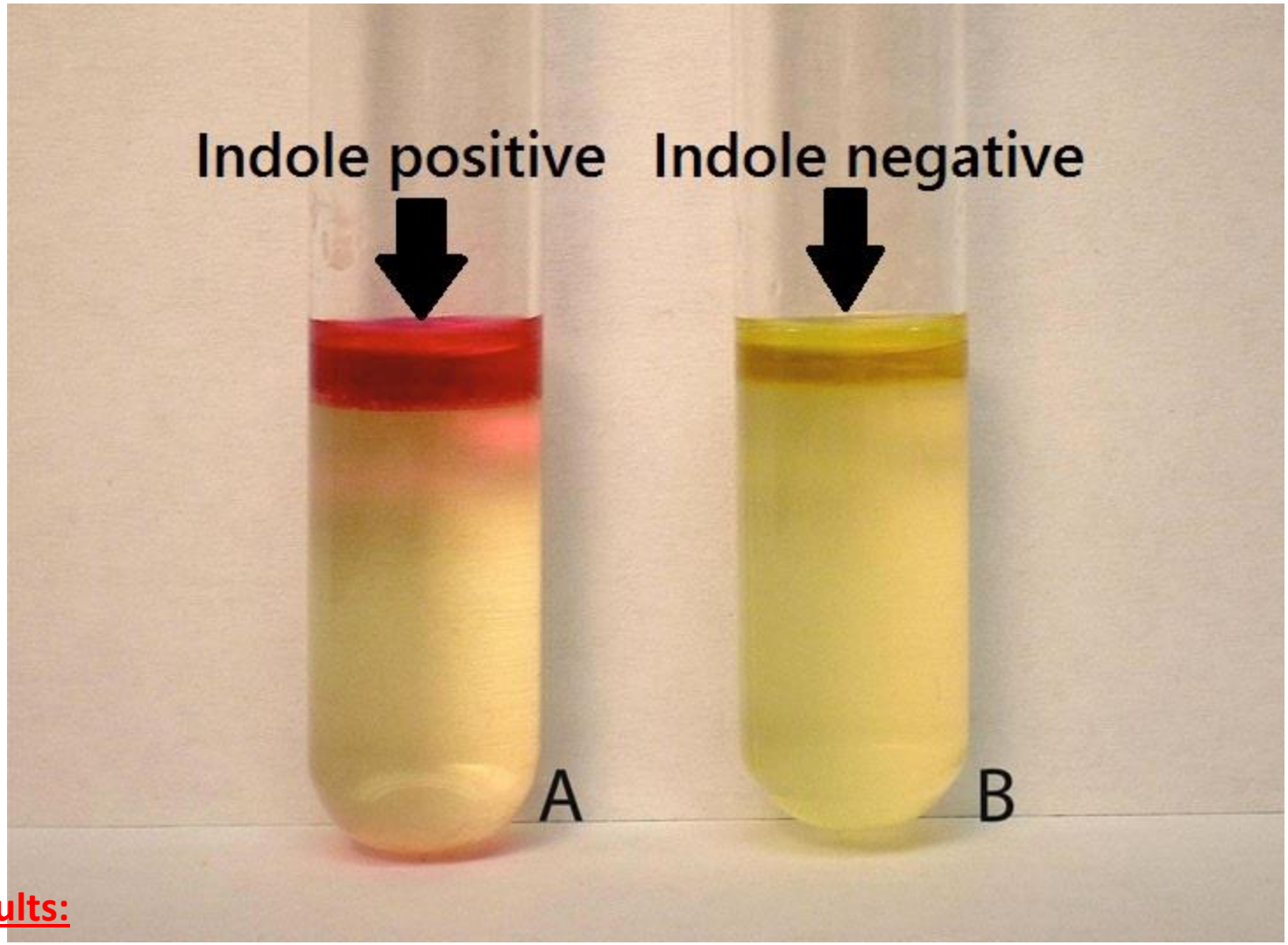
- **Two methods are in use;**
- **a conventional tube method requiring overnight incubation, which identifies weak indole producing organisms and**
- **a spot indole test, which detects rapid indole producing organisms**

Procedure of Conventional Tube method for Indole Test

- **a. Inoculate the tryptophan broth with broth culture or emulsify isolated colony of the test organism in tryptophan broth. (SIM medium Can be Used).**
- **b. Incubate at 37°C for 24-28 hours in ambient air.**
- **c. Add 0.5 ml of Kovac's reagent to the broth culture.**

https://microbeonline.com/indole-test-principle-procedure-results/

SIM Medium : Indole Test Results



Expected results:

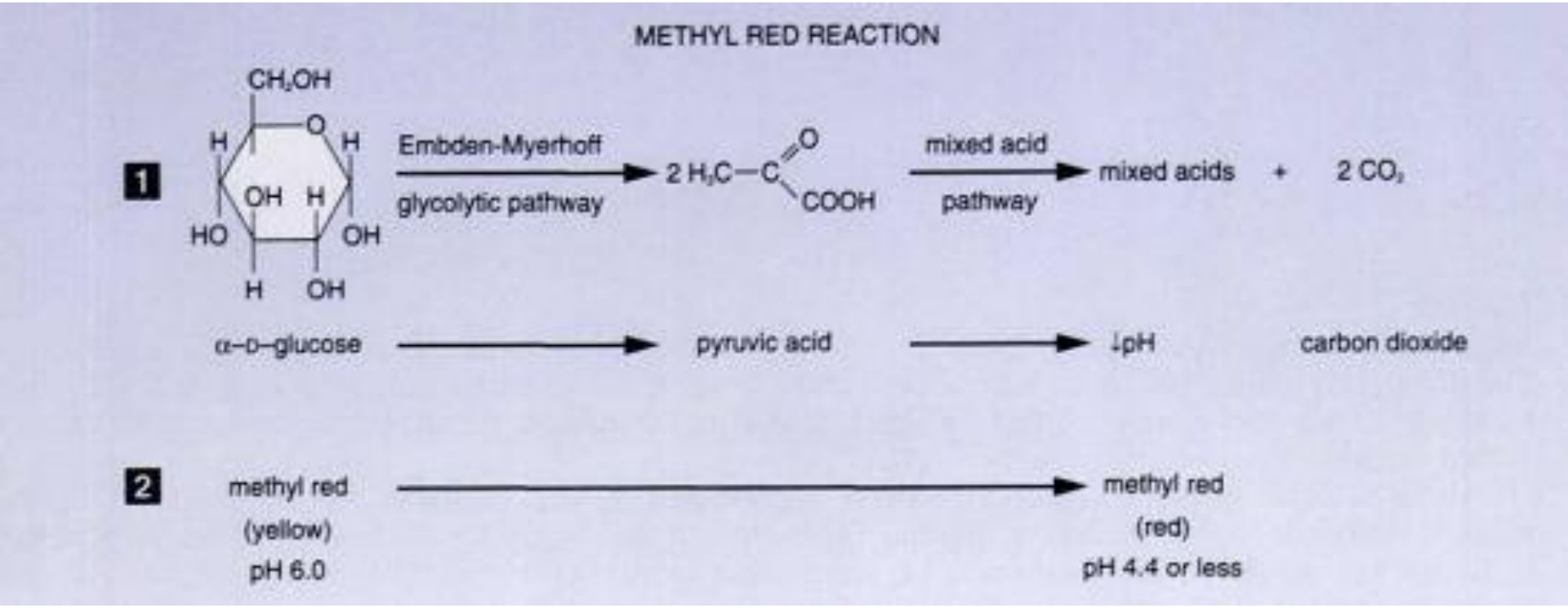
Positive: Pink colored rink after addition of appropriate reagent

Negative: No color change even after the addition of appropriate reagent. e.g. *Klebsiella pneumoniae*

Methyl Red (MR) test: Principle

- آزمون متیل رد نشان می دهد آیا میکروارگانیسم های مورد آزمون قادر است از تخمیر گلوکز مخلوطی از انواع اسیدها تولید کند یا خیر؟
- انواع و نسبت فراورده های تخمیری بی هوازی گلوکز یکی از ویژگی های کلیدی برای کمک به تشخیص جنسهای مختلف باکتریهای روده ای است.
- تخمیر مخلوط اسیدها یکی از دو الگوی مهم شناسایی این باکتریها محسوب می شود دومین مورد آنها تخمیر ۲-۳- بوتانیدول 2-3-butanediol است.
- در تخمیر مخلوط اسیدها سه اسید acetic، lactic و succinic اسید در مقادیر قابل توجهی تولید می شوند. در مسیر متابولیک این فرایند به ازای تخمیر هر مول گلوکز معمولا ۴ مول از مجموع اسیدها بخصوص لاکتیک و استیک اسید یک مول از فراورده های خنثی مانند اتانول، یک مول CO_2 یک مول H_2 تشکیل می شود.
- این مقدار اسید باعث کاهش قابل توجه در pH در محیط تا زیر ۴.۴ می شود که با استفاده از معرف pH یعنی متیل رد (p-dimethylaminoaeobenzene-O-carboxylic acid), شناسایی می شود این معرف pH های بالای ۵.۱ زرد است و در ۴.۴ قرمز.

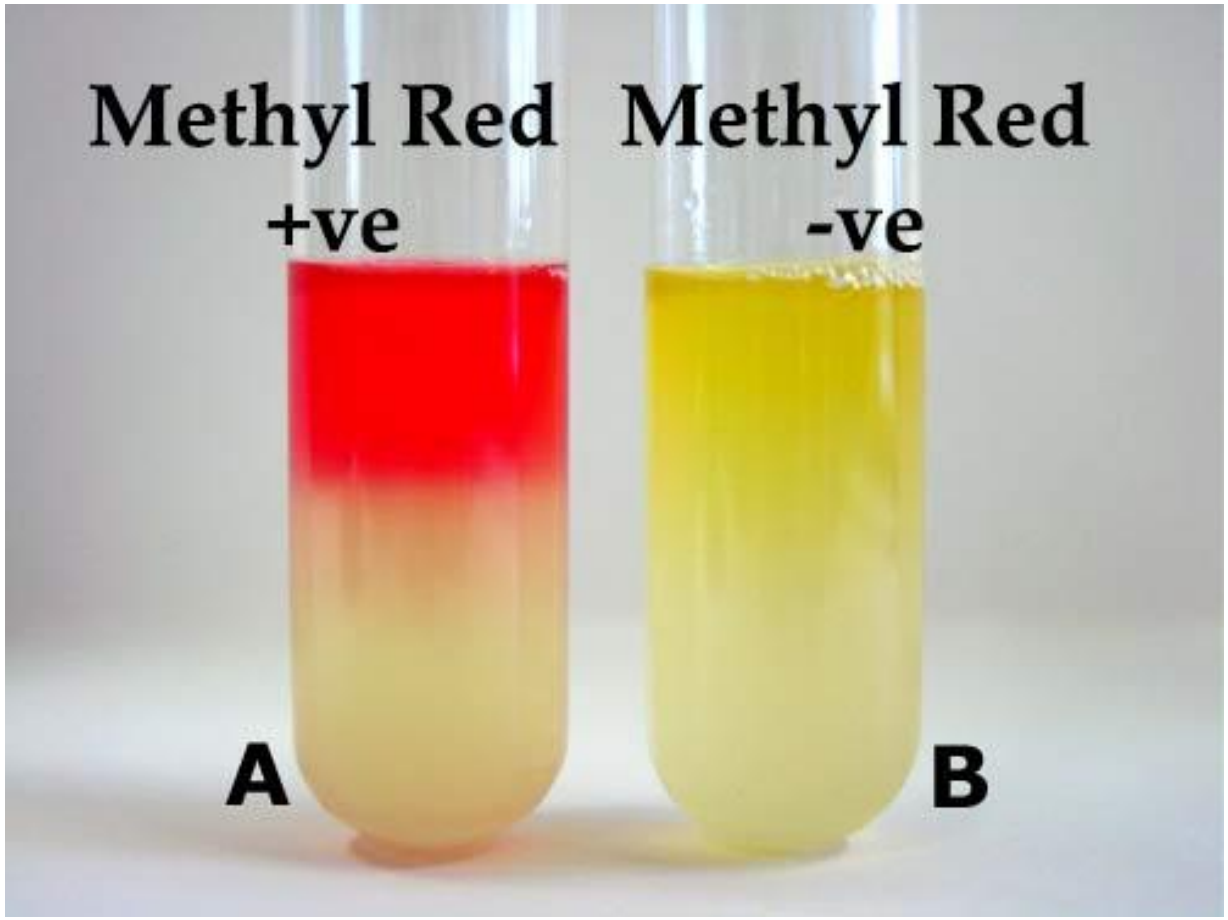
Methyl Red Reaction



Procedure of Methyl Red (MR) Test

1. Prior to inoculation, allow medium to equilibrate to room temperature.
2. Using organisms taken from an 18-24 hour pure culture, lightly inoculate the medium.
3. Incubate aerobically at 37 degrees C. for 24 hours.
4. Following 24 hours of incubation, aliquot 1ml of the broth to a clean test tube.
5. Reincubate the remaining broth for an additional 24 hours.
6. Add 2 to 3 drops of methyl red indicator to aliquot.
7. Observe for red color immediately.

Methyl Red test: Results



Positive Reaction: A distinct red color **(A) ;** **Examples:** *E. coli, Yersinia* sps, etc.

Negative Reaction: A yellow color **(B); Examples:** *Enterobacter aerogenes, Klebsiella pneumoniae,* etc.

https://microbiologyinfo.com/methyl-red-mr-test-principle-procedure-and-result-interpretation/

Voges Proskauer (VP) Test: Principle

- وژس- پروسکوئر متشکل از نام دو میکروبیولوژیست است که اوایل قرن بیستم روی این موضوع کار کردند. آنها ابتدا مشاهده کردند افزودن هیدروکسید پتاسیم موجب ایجاد رنگ قرمز در این محیط های کشت می شود. سپس کشف کردند که محیط کشت مورد آزمایش شان دارای ترکیب استیل متیل کربونیل است فراوده ای که مربوط به مسیبر متابولیکی بوتیلن گلایکول می باشد.

- در این مسیر ابتدا پیرویک اسید بعنوان ترکیب محوری در تجزیه گلوکز، تولید می شود که پس از آن در مسیرهای متابولیکی مختلف بر اساس انواع سیستم های آنزیمی موجود در میکرو ارگانیسم ها محصولات مختلفی از آن مشتق می شود.

- یکی از این ترکیبات استوئین یا همان استیل متیل کربونیل که یک محصول نهایی خنثی است تولید می شود.

- باکتریهایی شامل ***Klebsiella-Enterobacter-Hafnia-Serratia*** *قادر به تولید استوئین بعنوان محصول نهایی اصلی از گلوکز می باشند و مقادیر جزی از مخلوط اسیدها نیز تولید می کنند.*

- *استوئین در شرایط اکسیژن اتمسفری و در حضور هیدروکسید پتاسیم ۴۰٪ به دی استیل تبدیل می شود که در حضور آلفا نفتل بعنوان کاتالیزور به کمپلکسی قرمز رنک تبدیل می شود.*

https://microbeonline.com/voges-proskauer-test-principle-procedure-results/

Media and Reagents

- **Media**: The medium is MR/VP broth

- **Reagents:**
  - **Alpha-naphthol**, 5% color intensifier
    - Alpha Naphthol-5g
    - Absolute ethyl alcohol- 100 mL
  - **Potassium Hydrooxide**, 40%, oxidizing agent
    - Potassium hydroxide 40g
    - Distilled water to: 100 mL

https://microbeonline.com/voges-proskauer-test-principle-procedure-results/

Procedure of Voges Proskauer Test

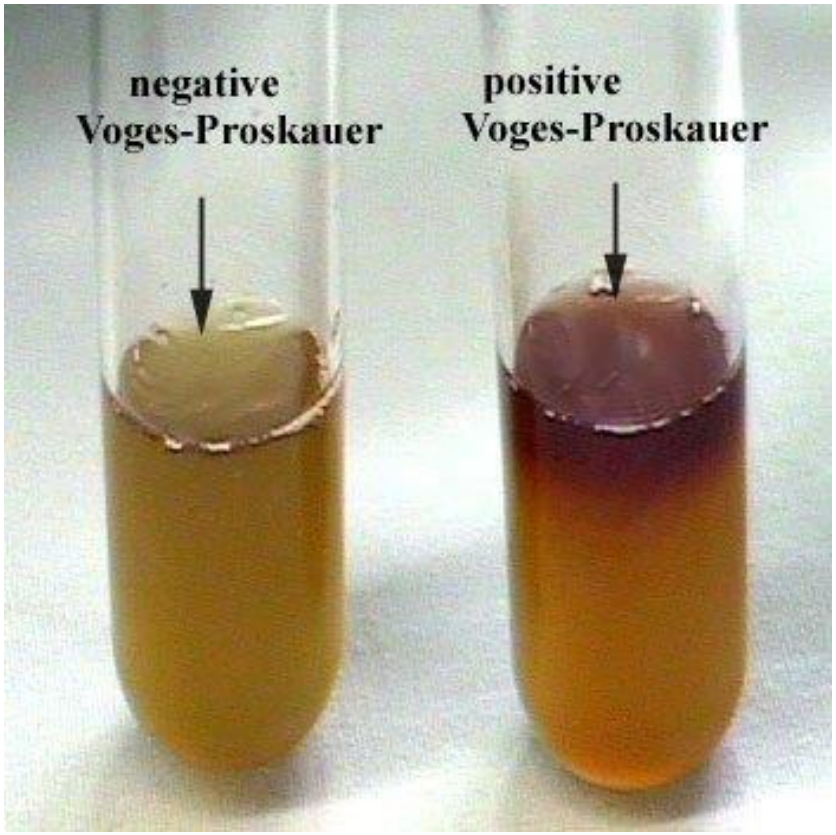
1. **Inoculate a tube of MR/VP broth with a pure culture of the test organism.**
2. **Incubate for 24 hours at 35°C**
3. **At the end of this time, aliquot 1 mL of broth to clean test tube.**
4. **Add 0.6mL of 5% alpha naphthol, followed by 0.2 mL of 40% KOH. *(Note: It is essential that the reagents be added in this order.)***
5. **Shake the tube gently to expose the medium to atmospheric oxygen and allow the tube to remain undisturbed for 10 to 15 minutes.**

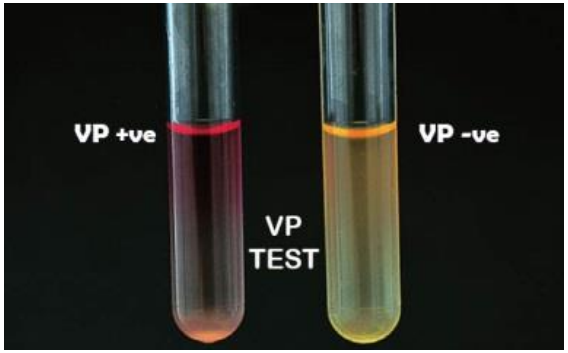
https://microbeonline.com/voges-proskauer-test-principle-procedure-results/

Results and Interpretation

- **A positive test is represented by the development of a red color 15 minutes or more after the addition of the reagents indicating the presence of diacetyl, the oxidation product of acetoin .**

- **The test should not be read after standing for over 1 hour because negative Voges-Proskauer cultures may produce a copper like color, potentially resulting in a false positive interpretation.**





https://microbeonline.com/voges-proskauer-test-principle-procedure-results/

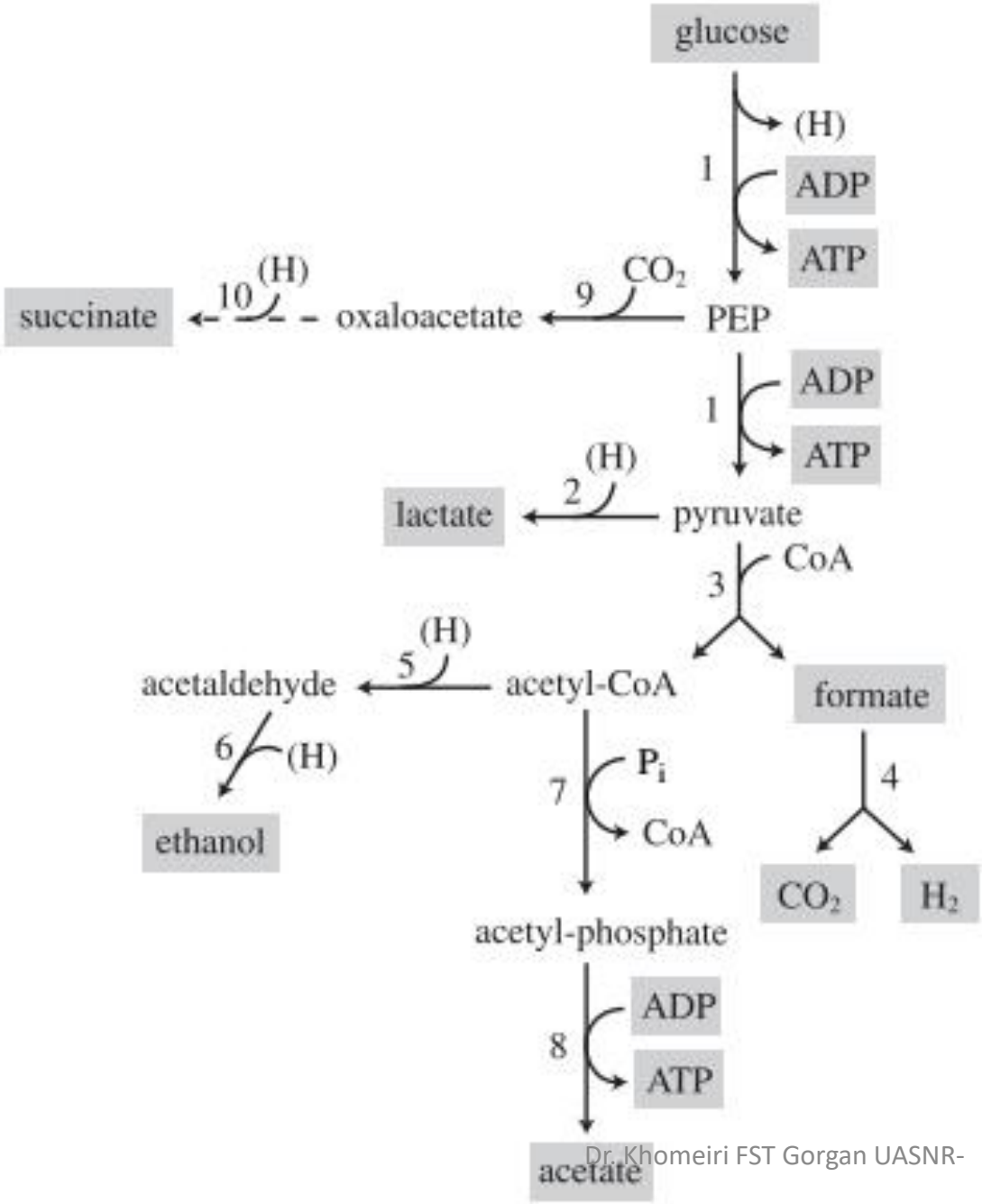
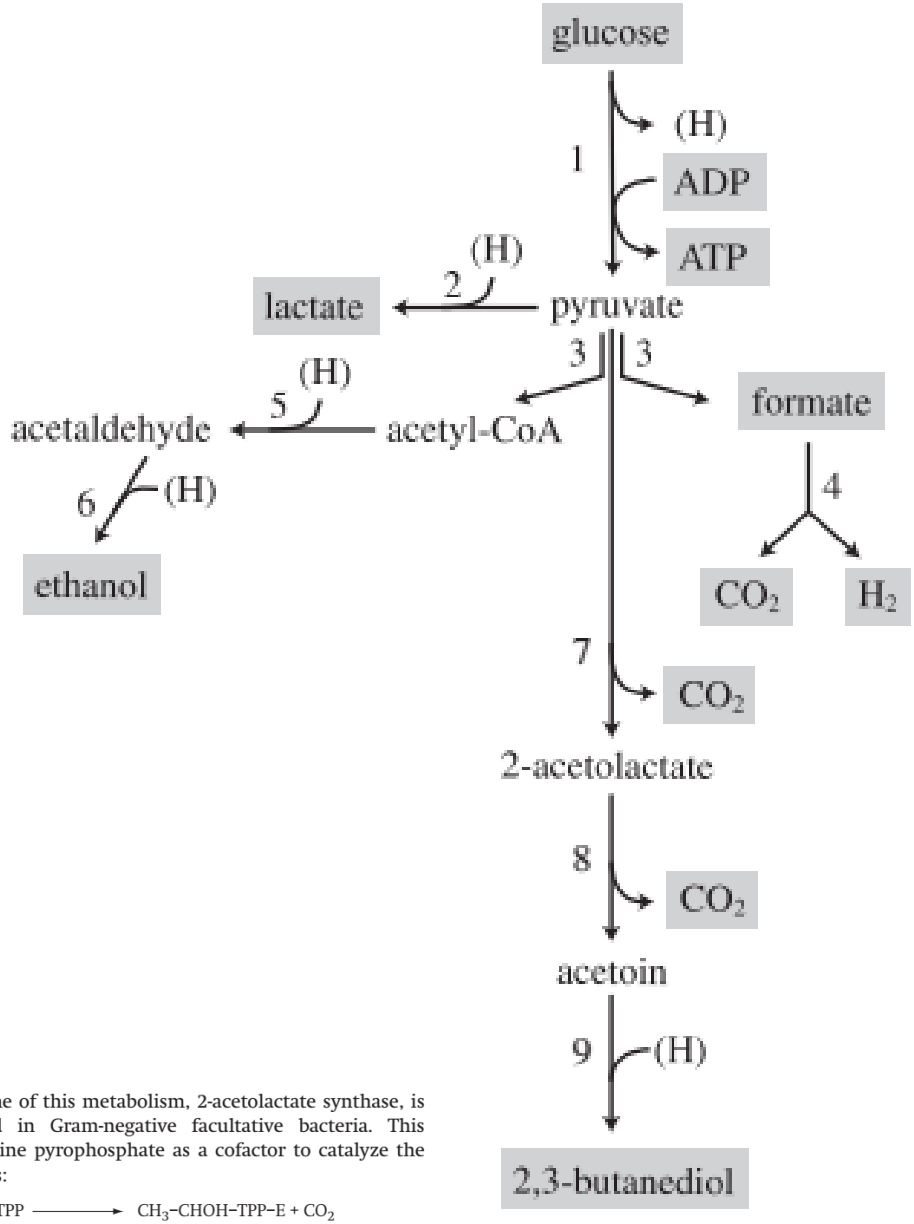


Figure 8.11 Mixed acid fermentation by some Gram-negative facultative anaerobic bacteria.

(Gottschalk, G. 1986, *Bacterial Metabolism*, 2nd edn., Figure 8.15. Springer, New York)

Facultative anaerobes belonging to the genera *Escherichia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Enterobacter* and others ferment sugars to lactate, acetate, formate, succinate and ethanol in the absence of electron acceptors.

1, EMP pathway; 2, lactate dehydrogenase; 3, pyruvate:formate lyase; 4, formate:hydrogen lyase; 5, acetaldehyde dehydrogenase; 6, alcohol dehydrogenase; 7, phosphotransacetylase; 8, acetate kinase; 9, phosphoenolpyruvate (PEP) carboxylase; 10, enzymes of the TCA cycle.



The first enzyme of this metabolism, 2-acetolactate synthase, is best characterized in Gram-negative facultative bacteria. This enzyme has thiamine pyrophosphate as a cofactor to catalyze the following reactions:

$$CH_3{-}CO{-}COOH + E{-}TPP \longrightarrow CH_3{-}CHOH{-}TPP{-}E + CO_2$$

$$CH_3{-}CHOH{-}TPP{-}E + CH_3{-}CO{-}COOH \longrightarrow \underset{\text{2-acetolactate}}{CH_3{-}\overset{O}{\overset{\|}{C}}{-}COH{-}COOH} + E{-}TPP$$

Figure 8.12 Butanediol fermentation by some Gram-negative facultative anaerobic bacteria.

(Gottschalk, G. 1986, *Bacterial Metabolism*, 2nd edn., Figure 8.15. Springer, New York)

Facultative anaerobes belong to the genera *Erwinia*, *Klebsiella* and *Serratia* and produce 2,3-butanediol in addition to lactate and ethanol.

1, EMP pathway; 2, lactate dehydrogenase;
3, pyruvate:formate lyase;
4, formate:hydrogen lyase;
5, acetaldehyde dehydrogenase;
6, alcohol dehydrogenase;
7, 2-acetolactate synthase;
8, 2-acetolactate decarboxylase;
9, 2,3-butanediol dehydrogenase.

Citrate test

- آزمون سیترات برای تعیین توانایی باکتری ها جهت استفاده از سیترات به عنوان تنها منبع کربن مورد استفاده قرار می گیرد. باکتری ها میتوانند نمک های سیترات (سیترات سدیم) را به اسیدهای آلی و دی اکسید کربن تبدیل کنند.
- دی اکسید کربن می تواند با سدیم آزاد شده از باز کونژگه ترکیب شود و تشکیل ترکیب بازی سدیم کربنات را دهد.
- محیط سیترات آگار دارای معرف pH برمو تیمول بلو Bromothymol blue برای تشخیص حضور قلیا در آن است که در این حالت رنگ محیط به آبی تغییر رنگ می دهد (پاسخ مثبت تست).

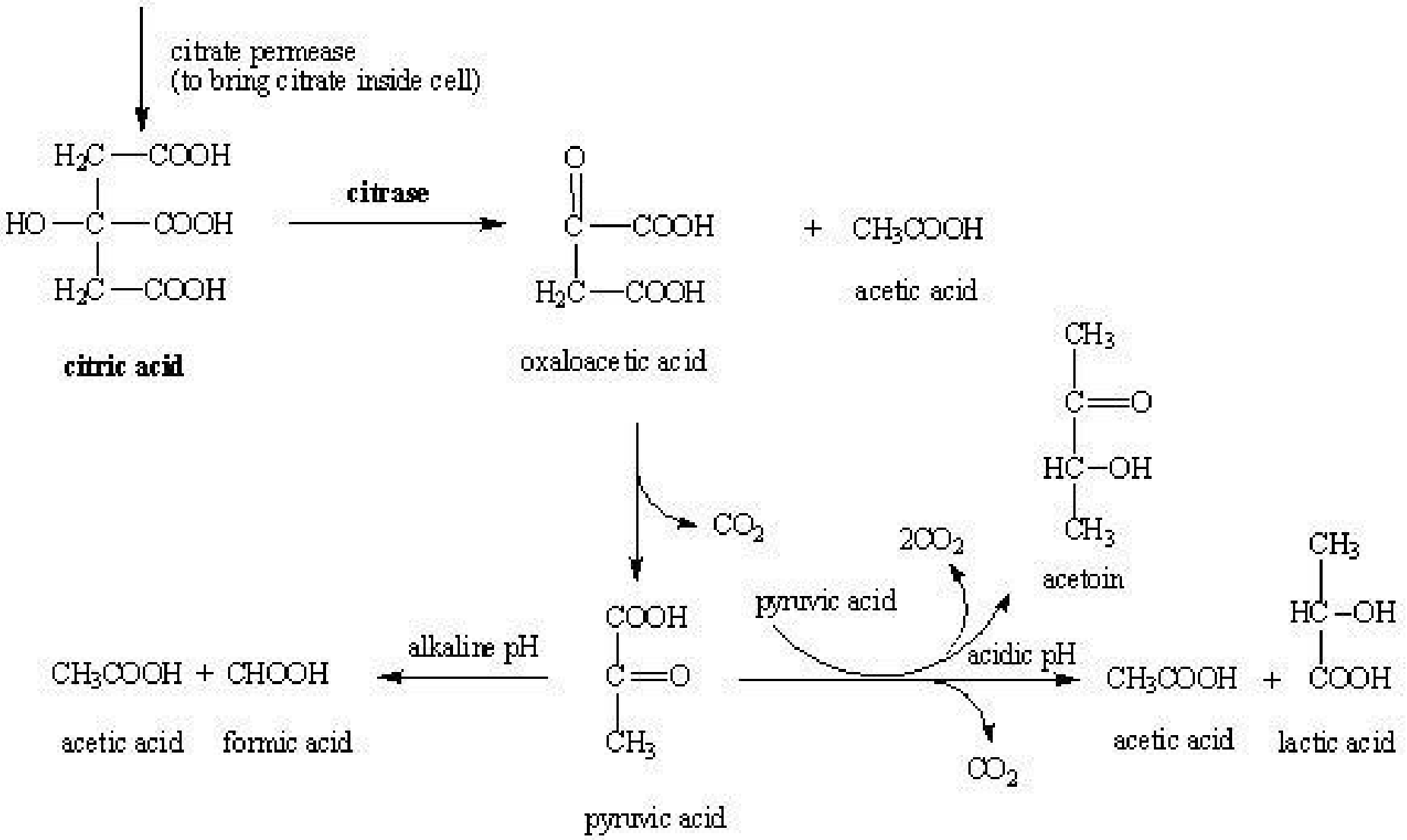
Citrate test: Principle

- وقتی که یک ترکیب اسید آلی مانند سیترات بعنوان تنها منبع کربن مورد استفاده قرار می گیرد ترکیبات قلیایی کربناته و بی کربنات تشکیل می شوند.
- بعلاوه چون از نمک های آمونیوم در محیط کشت بعنوان تنها منبع نیتروژن استفاده شده است لذا در اثر فعالیت میکروارگانیسمها هیدروکسید آمونیوم تشکیل می شود.
- استفاده از سیترات خارجی به وجود پروتئین انتقال دهنده سیترات (پرمه آز) نیاز دارد. پس از جذب این ترکیب در سلول سیترات به وسیله آنزیم سیترات لیاز تجزیه شده و تبدیل به استات و اگزالواستات می شود. پس از آن اگزالواستات به پیروات و CO_2 تبدیل می شود

- Citrate = oxaloacetate + acetate
- oxalacetate = pyruvate + CO_2
- پس از این مرحله فرایندهای متابوولیکی وابسته به pH است
- الف – در شرایط قلیا پیروات به استات و فومارات متابولیز می گردد.
- pyruvate = acetate + formate
- ب- در pH= 7 لاکتات و استوئین نیز تولید می شود
- pyruvate = acetate + lactate + CO_2
  pyruvate = acetoin + CO_2

- دی اکسید کربن آزاد شده وارد آب می شود و در حضور یون سدیم در محیط تولید سدیم کربنات قلیایی می کند که موجب افزایش pH می شود علاوه بر این هیدروکسید آمونیوم نیز بعنوان ترکیب قلیایی دیگر تشکیل می گردد.

Citrate Reaction



Procedure of citrate utilization test:

1. Inoculate **simmons citrate agar** lightly on the slant by touching the tip of a needle to a colony that is 18 to 24 hours old.

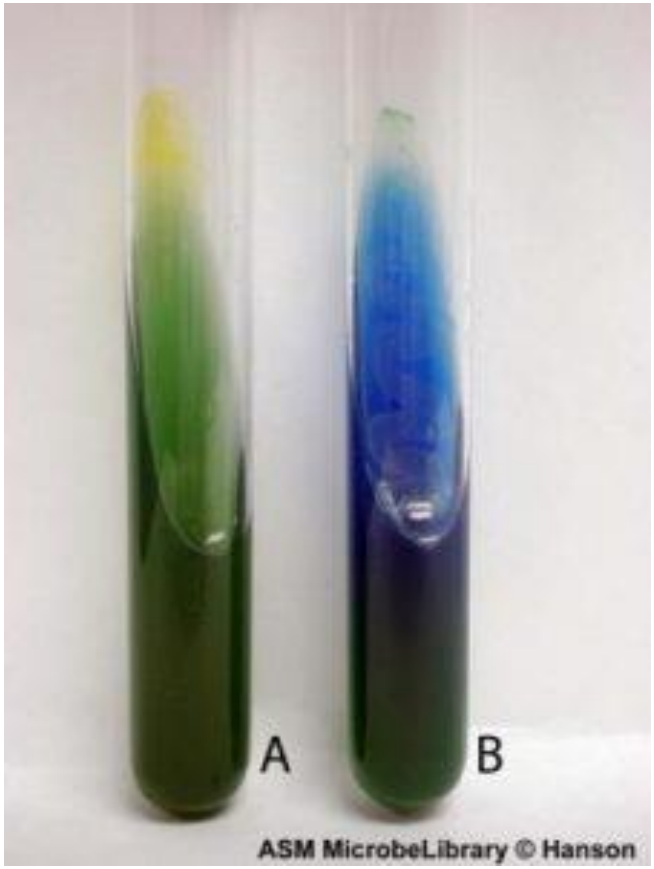
2. Incubate at 35°C to 37°C for 18 to 24 hours. Some organisms may require up to 7 days of incubation due to their limited rate of growth on citrate medium.

3. Observe the development of blue color; denoting alkalinization.

Expected results in citrate utilization test:

- **Citrate positive:** growth will be visible on the slant surface and the medium will be an intense Prussian blue. The alkaline carbonates and bicarbonates produced as by-products of citrate catabolism raise the pH of the medium to above 7.6, causing the bromothymol blue to change from the original green color to blue .

- **Citrate negative:** trace or no growth will be visible. No color change will occur; the medium will remain the deep forest green color of the uninoculated agar. Only bacteria that can utilize citrate as the sole carbon and energy source will be able to grow on the Simmons citrate medium, thus a citrate-negative test culture will be virtually indistinguishable from an uninoculated slant



Citrate test: Bacterial Ability

- **List of Bacteria which gives positive citrate utilization test**
- *Klebsiella pneumoniae*
- *Enterobacter* species (minority of strains gives negative result)
- *Citrobacter freundii*
- *Salmonella other than* Typhi and Paratyphi A
- *Serratia marcescens*
- *Proteus mirabilis* (minority of strains gives negative result)
- *Providencia*

- **Citrate Test: variable (different strains give different results)**
- *Proteus vulgaris*
- *Vibrio cholerae*
- *Vibrio parahaemolyticus*

- **Citrate test: negative**
- *Escherichia coli*
- *Shigella* spp
- *Salmonella* Typhi
- *Salmonella* Paratyphi A
- *Morganella morganii*
- *Yersinia enterocolitica*

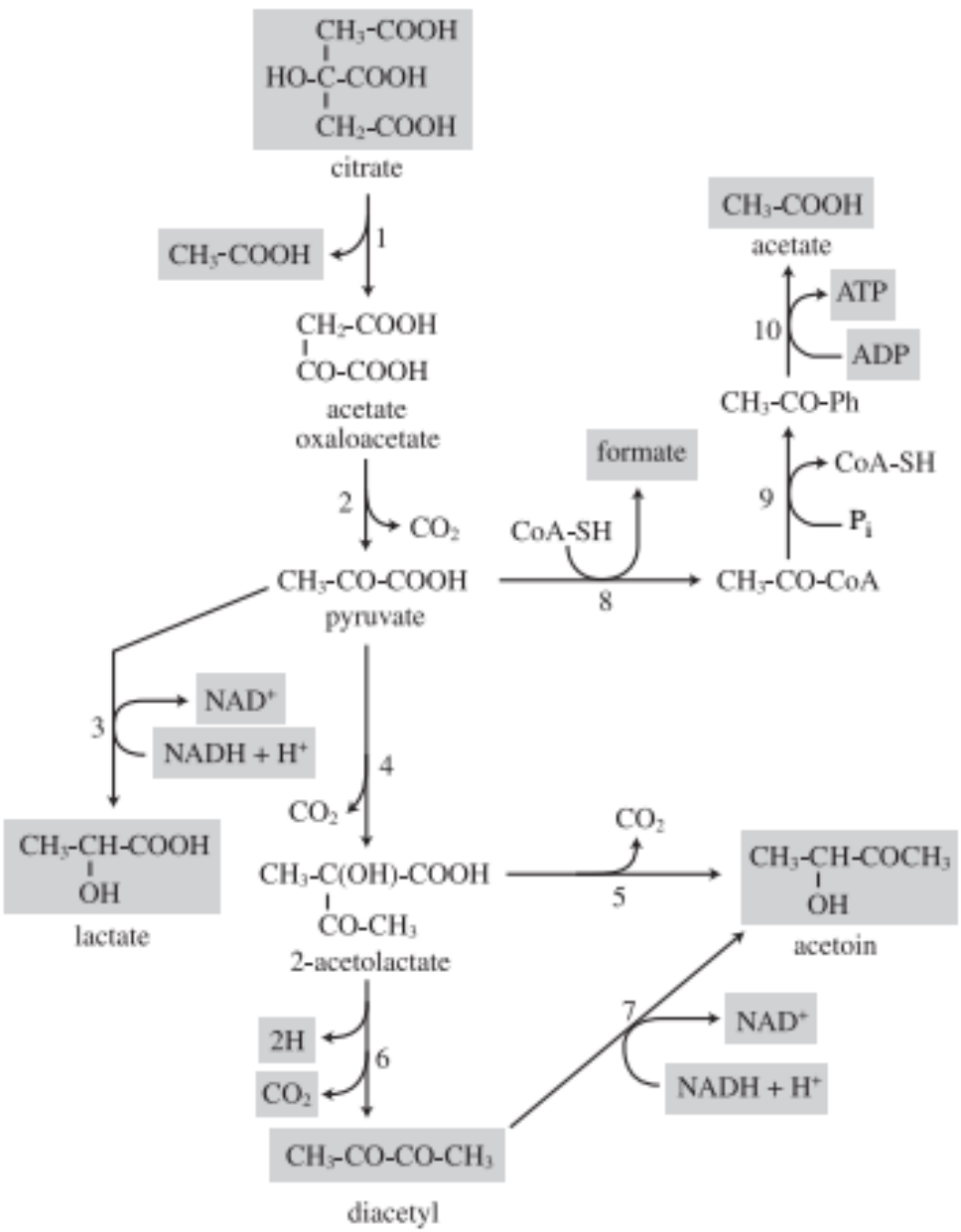
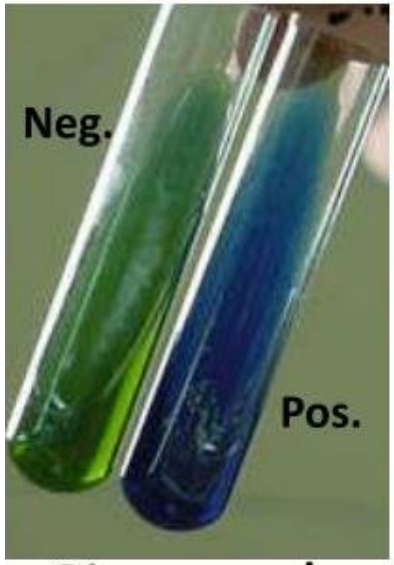


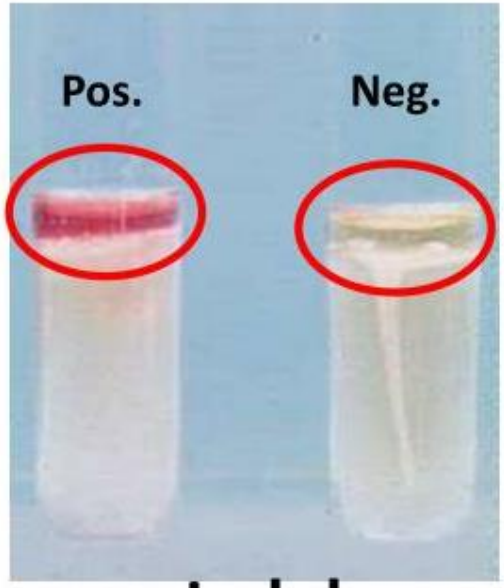
Figure 8.5 **Conversion of citrate to acetoin by lactic-acid bacteria during butter and wine maturation.**

1, citrate lyase; 2, oxaloacetate decarboxylase; 3, lactate dehydrogenase; 4, 2-acetolactate synthase; 5, 2-acetolactate decarboxylase; 6, spontaneous chemical reaction; 7, acetoin dehydrogenase; 8, pyruvate dehydrogenase complex; 9, phosphotransacetylase; 10, acetate kinase.

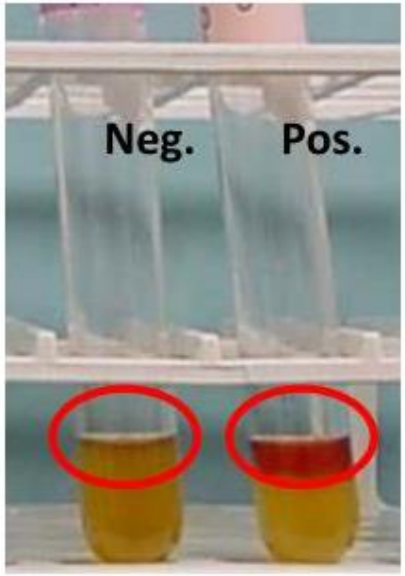
IMViC Tests

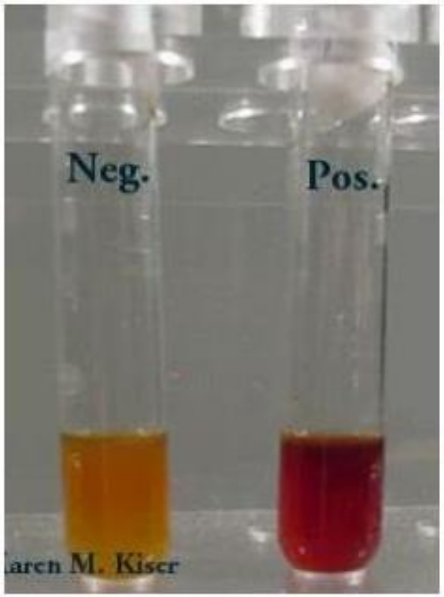


Simmon's
Citrate Agar



Indole





Methyl red (MR)

Voges Proskauer (VP)

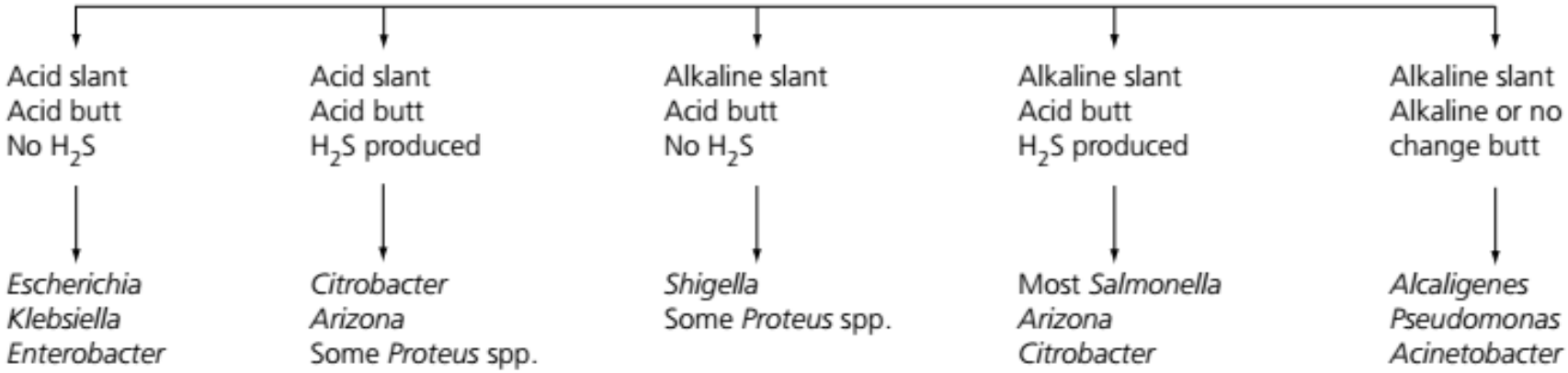
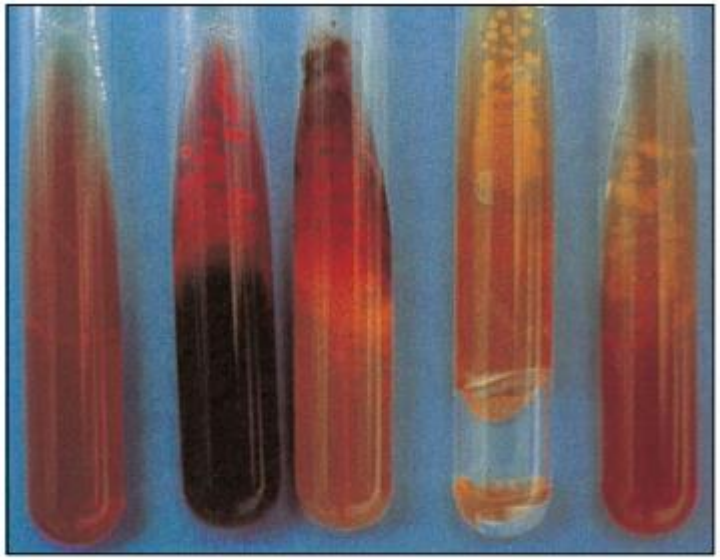


Figure 22.1 TSI reactions for differentiation of enteric microorganisms



(a) (b) (c) (d) (e)

Figure 22.2 Reactions in triple sugar–iron agar. **(a)** Uninoculated; **(b)** alkaline slant/acid butt, H_2S; **(c)** alkaline slant/acid butt; **(d)** acid slant/acid butt, gas; and **(e)** acid slant/acid butt.

For 1 liter of medium :

- Autolytic yeast extract .....3,0 g
- Meat extract .....3,0 g
- Peptone .....20,0 g
- Sodium chloride .....5,0 g
- Lactose .....10,0 g
- Sucrose .....10,0 g
- Glucose .....1,0 g
- Sodium thiosulphate.....0,3 g
- Iron (III) citrate .....0,3 g
- Phenol red ..... 24,0 mg
- Bacteriological agar .....9,0 g

Escherichia coli
Enterobacter aerogenes
Klebsiella pneumoniae

Lactose fermenters

Salmonella typhimurium
Shigella dysenteriae
Proteus vulgaris
Pseudomonas aeruginosa
Alcaligenes faecalis

Non–lactose fermenters

Enteric

Corynebacterium xerosis
Micrococcus luteus
Lactococcus lactis
Staphylococcus aureus
Bacillus cereus

Nonenteric

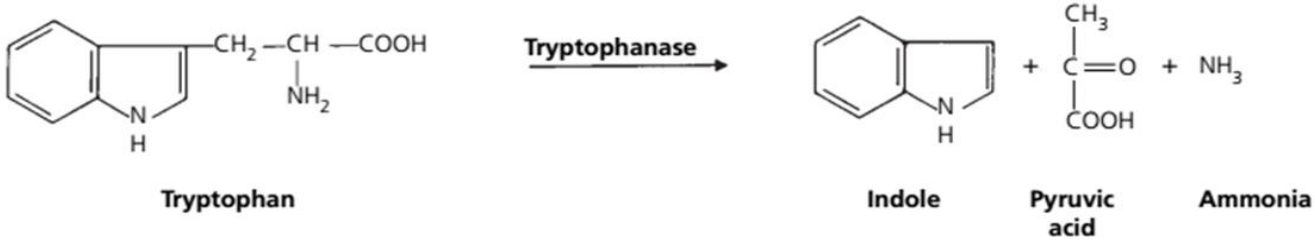


Figure 23.1 **Enzymatic degradation of tryptophan**

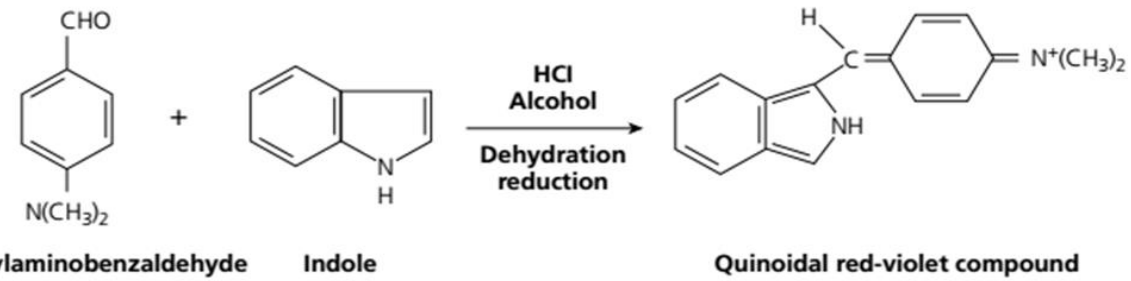


Figure 23.2 **Indole reaction with Kovac's reagent**

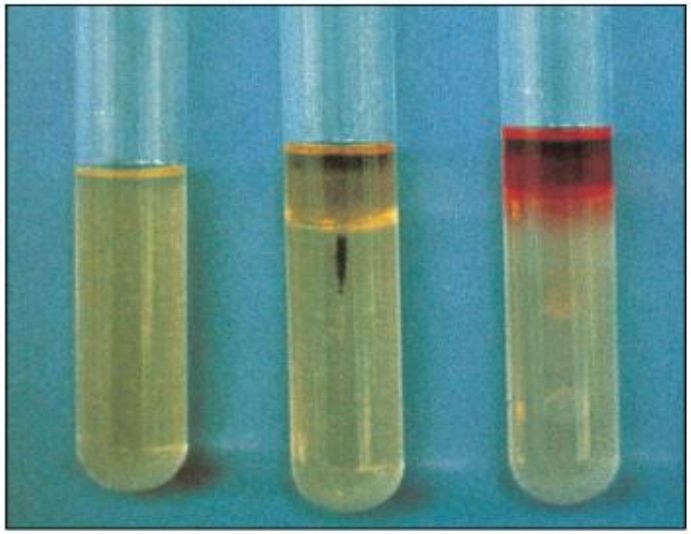
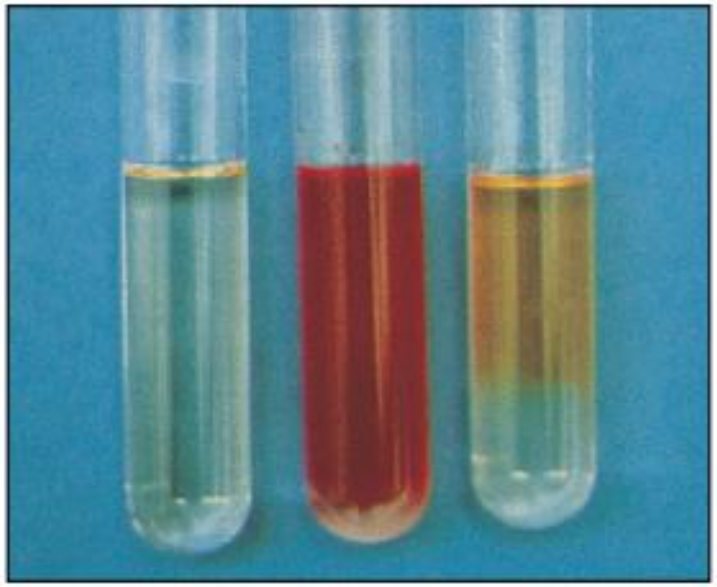


Figure 23.3 **Indole production test.** **(a)** Uninoculated, **(b)** negative, and **(c)** positive.

$$\text{Glucose} + H_2O \longrightarrow \left[\begin{array}{l}\text{Lactic acid}\\ \text{Acetic acid}\\ \text{Formic acid}\end{array}\right] + CO_2 + H_2 \ (\text{pH } 4.0) \longrightarrow \text{Methyl red indicator turns red color}$$

Figure 23.4 Glucose fermentation reaction with methyl red pH reagent



(a) **(b)** **(c)**

Figure 23.5 Methyl red test. (a) Uninoculated, **(b)** positive, and **(c)** negative.

$$\text{Glucose} + O_2 \longrightarrow \text{Acetic acid} \longrightarrow \left[\begin{array}{l}\text{2,3-butanediol}\\ \text{acetylmethylcarbinol}\end{array}\right] + CO_2 + H_2\ (\text{pH } 6.0)$$

Figure 23.6 Glucose fermentation by E. aerogenes

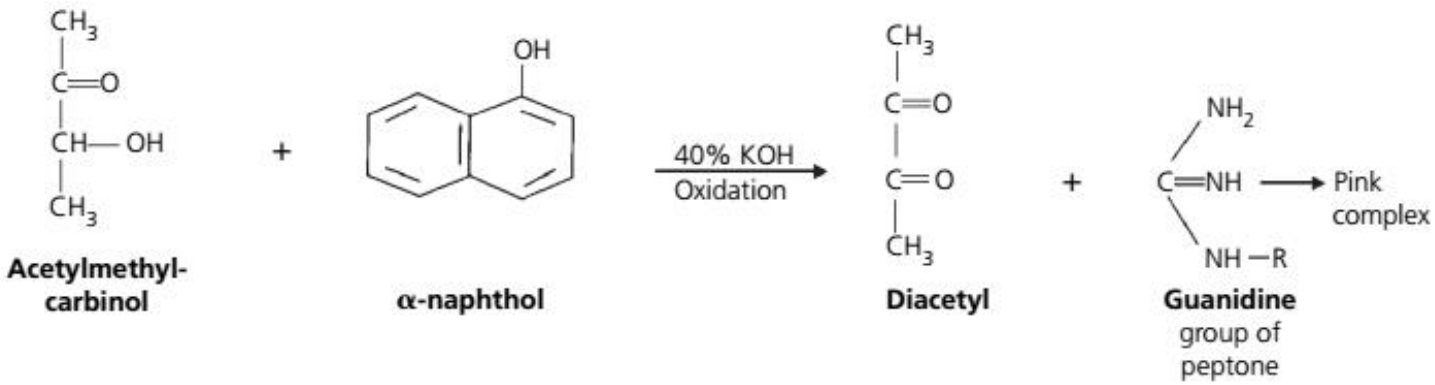
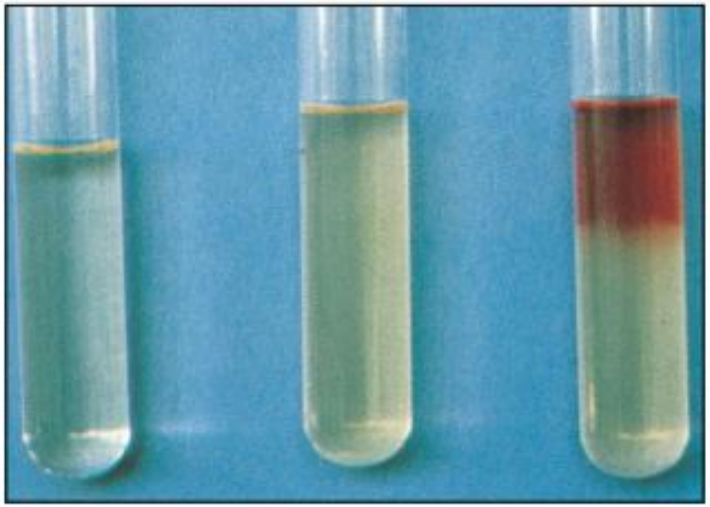


Figure 23.7 Acetylmethylcarbinol reaction with Barritt's reagent



(a) (b) (c)

Figure 23.8 Voges-Proskauer test
(a) Uninoculated, **(b)** negative, and **(c)** positive

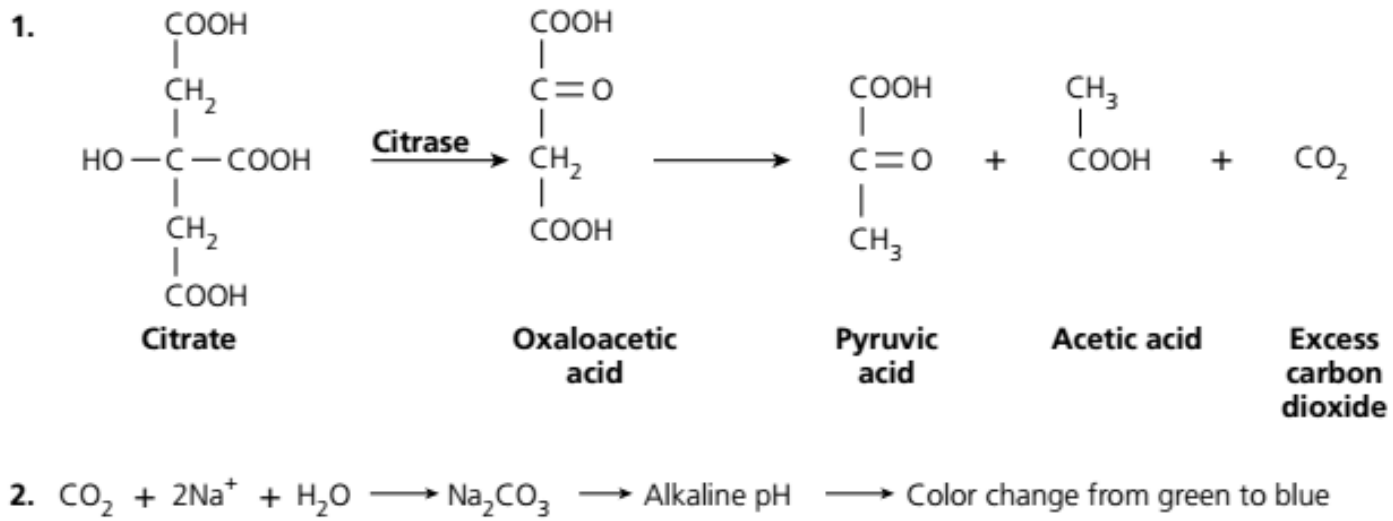


Figure 23.9 Enzymatic degradation of citrate

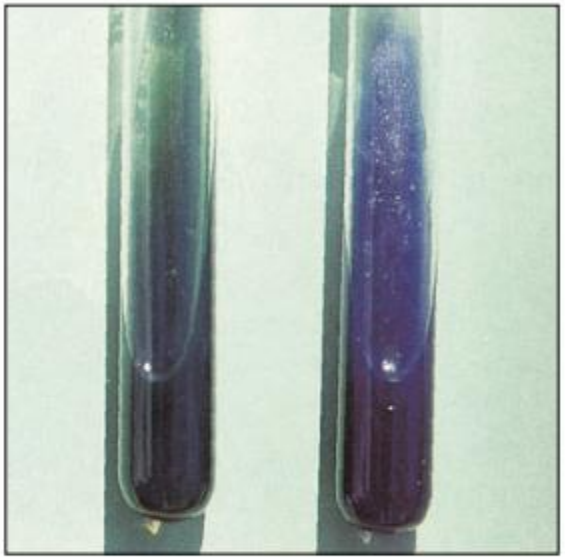


Figure 23.10 Citrate utilization test. (a) Tube is negative, showing no growth on slant surface. **(b)** Tube is positive, showing growth on slant surface.

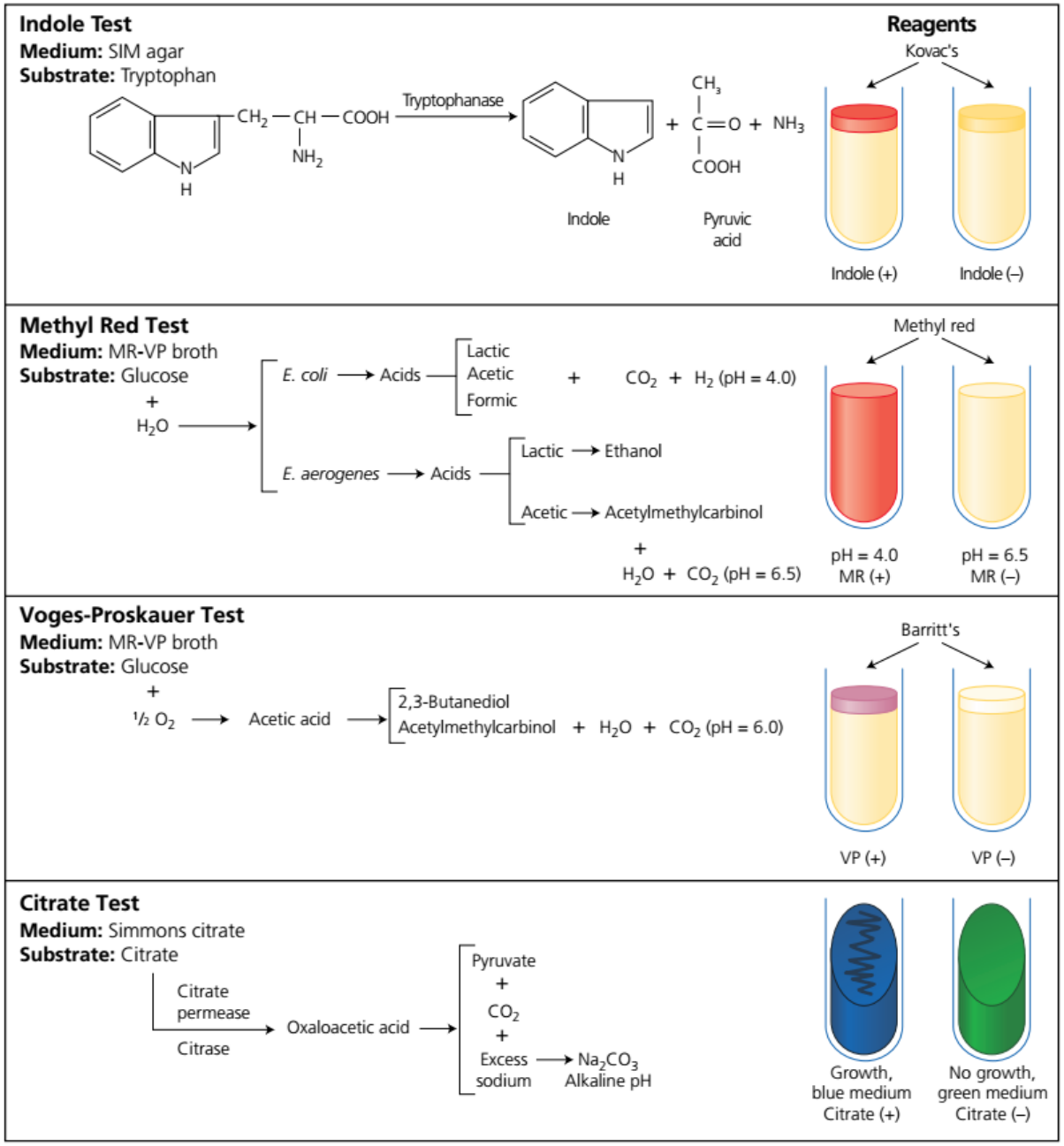
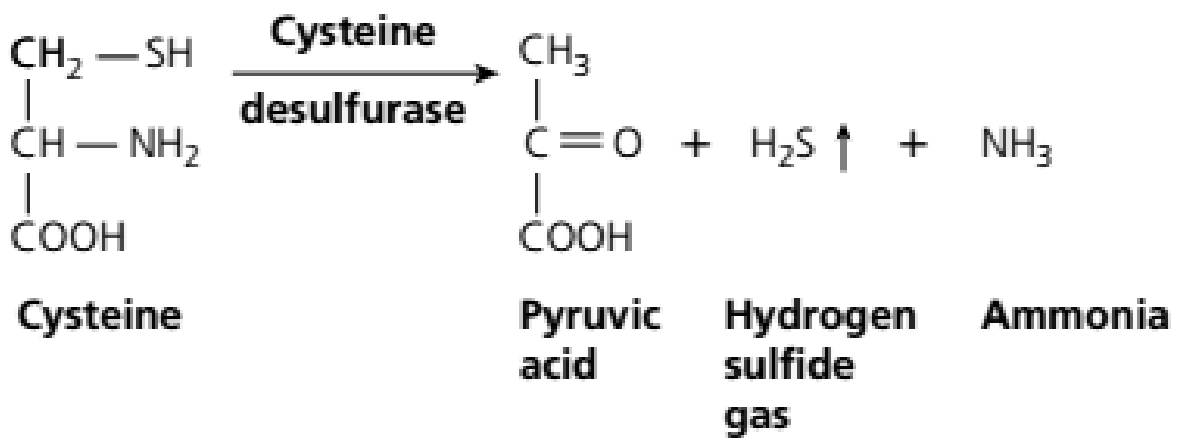


Figure 23.11 **Summary of IMViC reactions**

- **Pathway 1: Gaseous H2S may be produced by the reduction (hydrogenation) of organic sulfur present in the amino acid cysteine, which is a component of peptones contained in the medium.**
- **These peptones are degraded by microbial enzymes to amino acids, including the sulfurcontaining amino acid cysteine.**
- **This amino acid in the presence of a cysteine desulfurase loses the sulfur atom, which is then reduced by the addition of hydrogen from water to form bubbles of hydrogen sulfide gas (H2S c) as illustrated:**

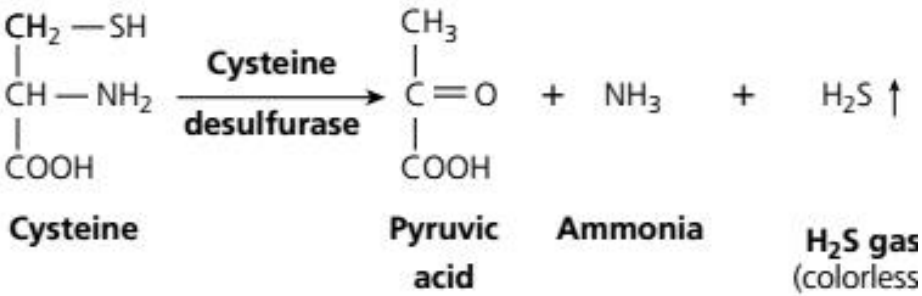


H_2S Test

- **Gaseous H2S may also be produced by the reduction of inorganic sulfur compounds such as the thiosulfates (S2O32−), sulfates (SO42−), or sulfites (SO32−).**
- **The medium contains sodium thiosulfate, which certain microorganisms are capable of reducing to sulfite with the liberation of hydrogen sulfide.**
- **The sulfur atoms act as hydrogen acceptors during oxidation of the inorganic compound as illustrated in the following:**

$$2S_2O_3^{2-} + 4H^+ + 4e^- \xrightarrow[\text{reductase}]{\text{Thiosulfate}} 2SO_3^{2-} + 2H_2S\uparrow$$

Thiosulfate **Sulfite** **Hydrogen Sulfide gas**



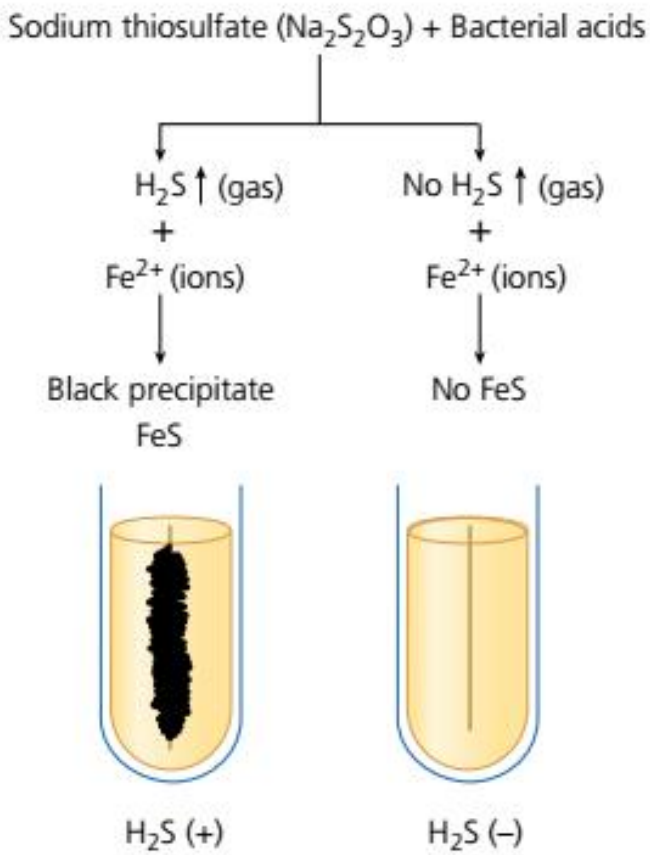


Figure 24.1 Detectivhydrogen sulphide

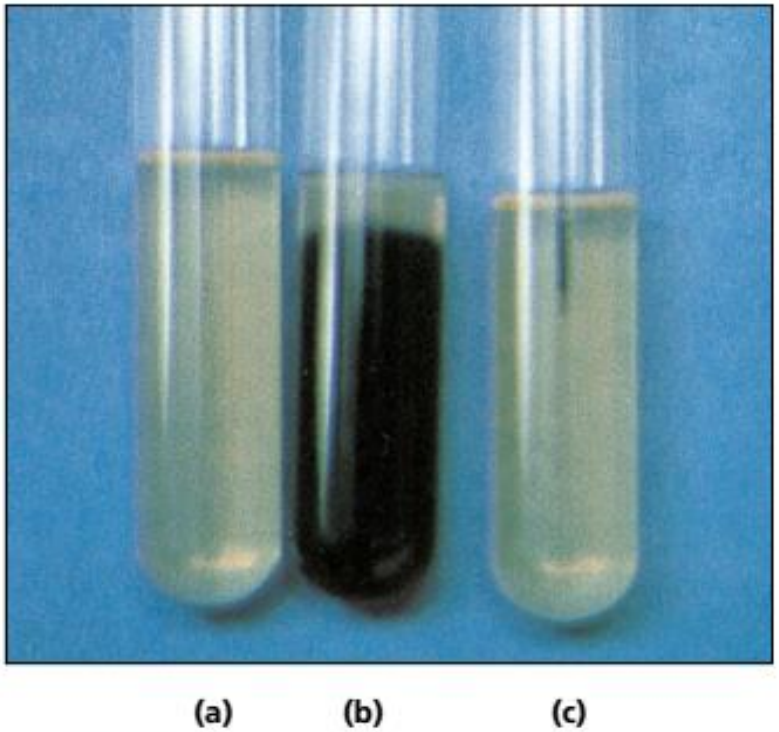


Figure 24.2 Hydrogen sulfide production test. **(a)** Negative, **(b)** positive with motility, and **(c)** positive with no motility

Urease Test

- **Urease, which is produced by some microorganisms, is an enzyme that is especially helpful in the identification of Proteus vulgaris.**
- **Although other organisms may produce urease, their action on the substrate urea tends to be slower than that seen with Proteus species.**
- **Therefore, this test serves to rapidly distinguish members of this genus from other non–lactose-fermenting enteric microorganisms.**
- **Urease is a hydrolytic enzyme that attacks the nitrogen and carbon bond in amide compounds such as urea and forms the alkaline end product ammonia.**
- **The presence of urease is detectable when the organisms are grown in a urea broth medium containing the pH indicator phenol red.**
- **As the substrate urea is split into its products, the presence of ammonia creates an alkaline environment that causes the phenol red to turn to a deep pink.**
- **This is a positive reaction for the presence of urease. Failure of a deep pink color to develop is evidence of a negative reaction**

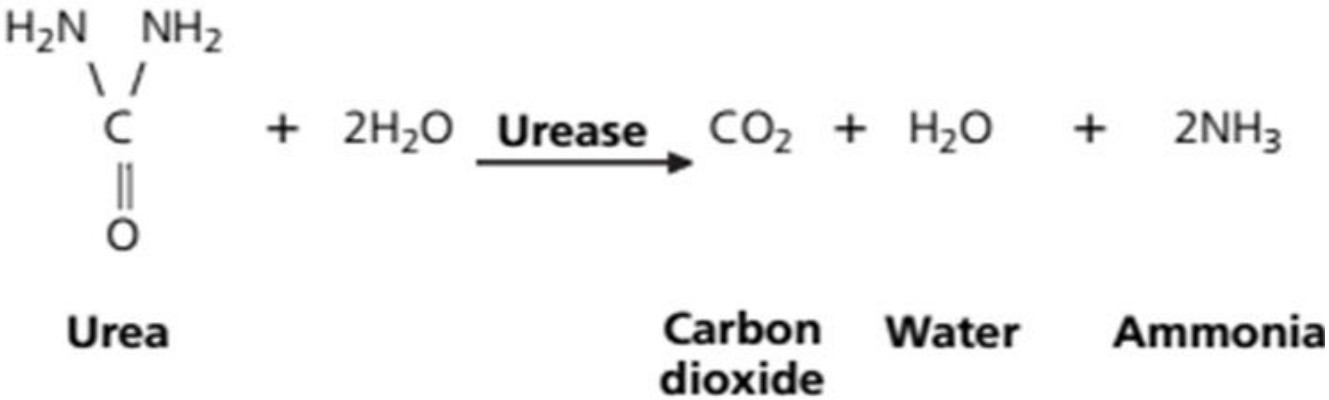
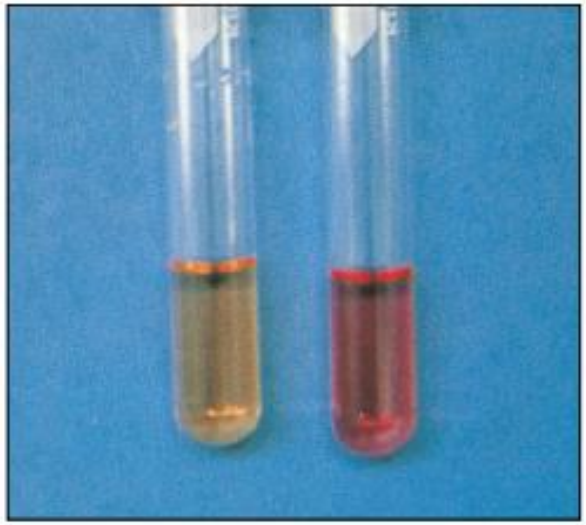


Figure 25.1 Enzymatic degradation of urea



(a) (b)

Figure 25.2 Urease test. (a) Negative and **(b)** positive