وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
جامعة الأنبار – كلية الزراعة
قسم علوم الاغذية

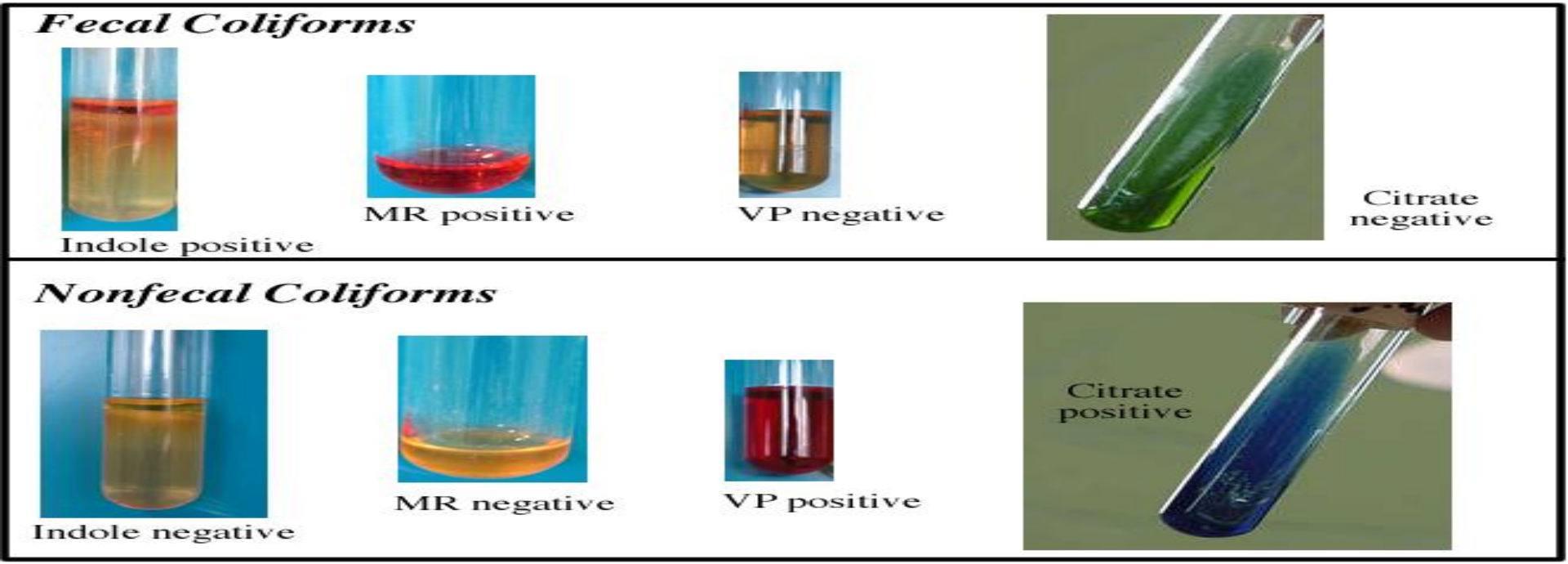
أحياء الألبان / عملي
المرحلة الثالثة

إعداد
م.م. بلال علي خشان
كلية الزراعة-قسم علوم الأغذية

أختبارات IMViC

- هذه الكلمة هي مختصر او جمع لأربعة اختبارات مصممة لتشخيص وتمييز أفراد عائلة Enterobacteriaceae العائلة المعوية وهي :

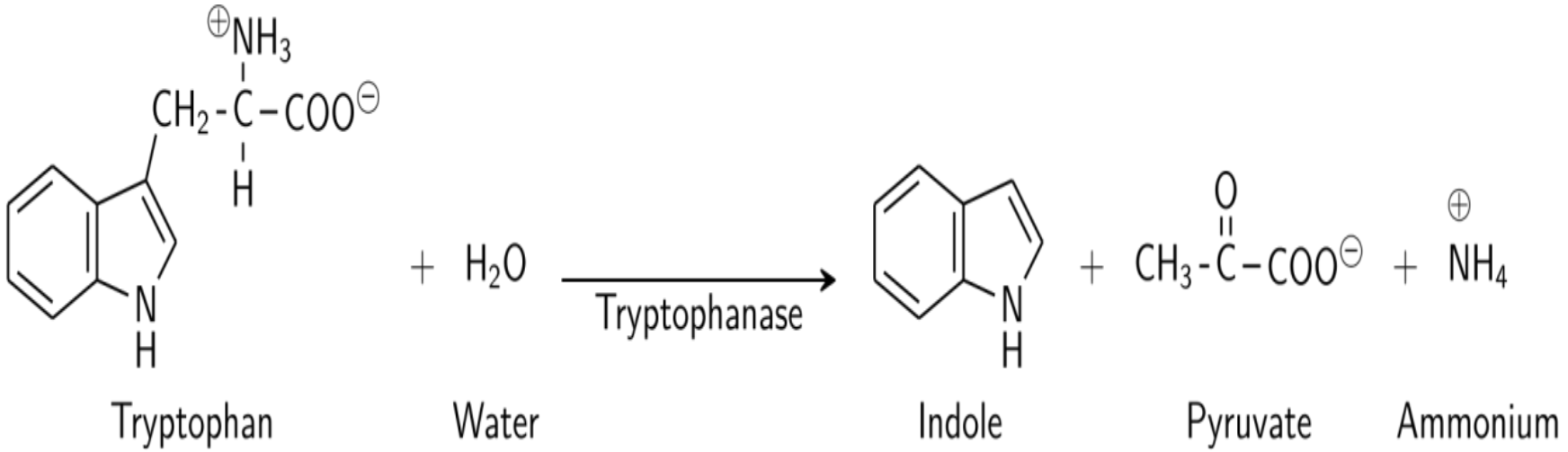
- Indole production test :(I) فحص انتاج الأندول.
- Methyl Red Test (M) فحص المثلين الأحمر.
- Voges Proskauer test (V)فحص فوكس –بروسكاور.
- For easier pronounciation (I) لسهولة اللفظ.
- Citrate utilization test :(C) فحص استهلاك السترات.



أولًا – Indole Production test اختبار إنتاج الأندول : يظهر هذا الاختبار قدرة بعض الأنواع البكتيرية على تحلل الحامض الأميني التربتوفان Tryptophan الإنتاج الاندول حيث يتم استعمال الاختبار كجزء من اختبارات IMViC المصممة للتمييز بين أفراد عائلة Enterobacteriaceae فمعظم سلالات E. coli وغيرها لها قدرة على تحطم الحامض الأميني التريبتوفان مع إنتاج حلقة الإندول.

أن أنواع البكتريا المنتجة لإنزيم Tryptophanase الذي يعمل على تحليل الحامض الاميني التريبتوفان الموجود في الوسط مع إزالة مجموعة الأمين ($-NH_2$) منه ليعطي الاندول مع حامض البايروفيك والامونيا حيث تستعمل البكتريا حامض البايروفيك والامونيا كجزء من متطلبات النمو للبكتريا ، أما الاندول فيتراكم في الوسط ويظهر بشكل حلقة حمراء اللون في اعلى سطح الوسط Pepton water بعد تفاعلة مع كاشف Kovac's reagent أصفر اللون . حيث يتكون كاشف Kovac's من :

- ١٠ غم Dimethylaminobenzaldehyde
- ٥٠ مل من ٣٧٪ Hydrochloric Acid و ١٥٠ مل من Amyl Alcohol .



طريقة عمل اختبار إنتاج الأندول Indole Production test :

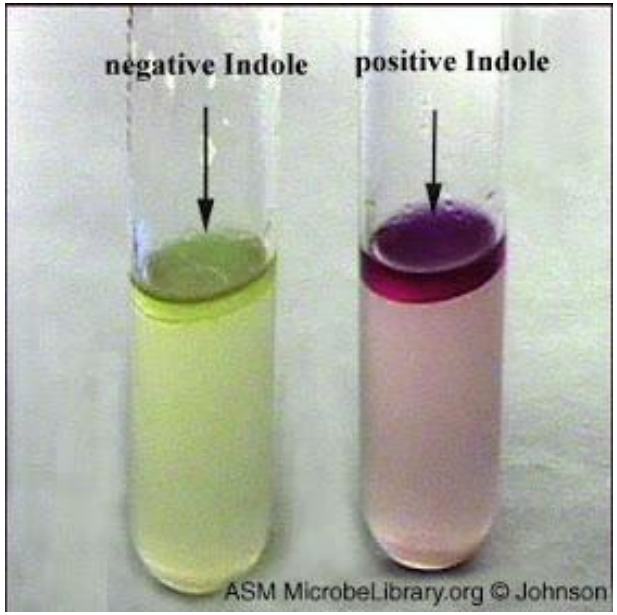
١- بواسطة الناقل تلقح انابيب وسط ماء الببتون المعقمة بالبكتريا المراد فحصها.

٢ – نحضن الانابيب لمدة ٢٤ ساعة بدرجة ٣٧ م في الحاضنة.

٣ – بعد انتهاء فترة الحضانة يتم اخراج الانابيب من الحاضنة.

٤ – تضاف ٥ قطرات من كاشف kovac ' s reagent الى كل انبوب من الانابيب

٥ – اقرا النتيجة ، تكون النتيجة إيجابية او سلبية .



النتيجة :

إيجابية : تكوين اللون الأحمر (**حلقة الكرز الأحمر**) بشكل حلقة اعلى سطح الوسط خلال ثوان من إضافة الكاشف .

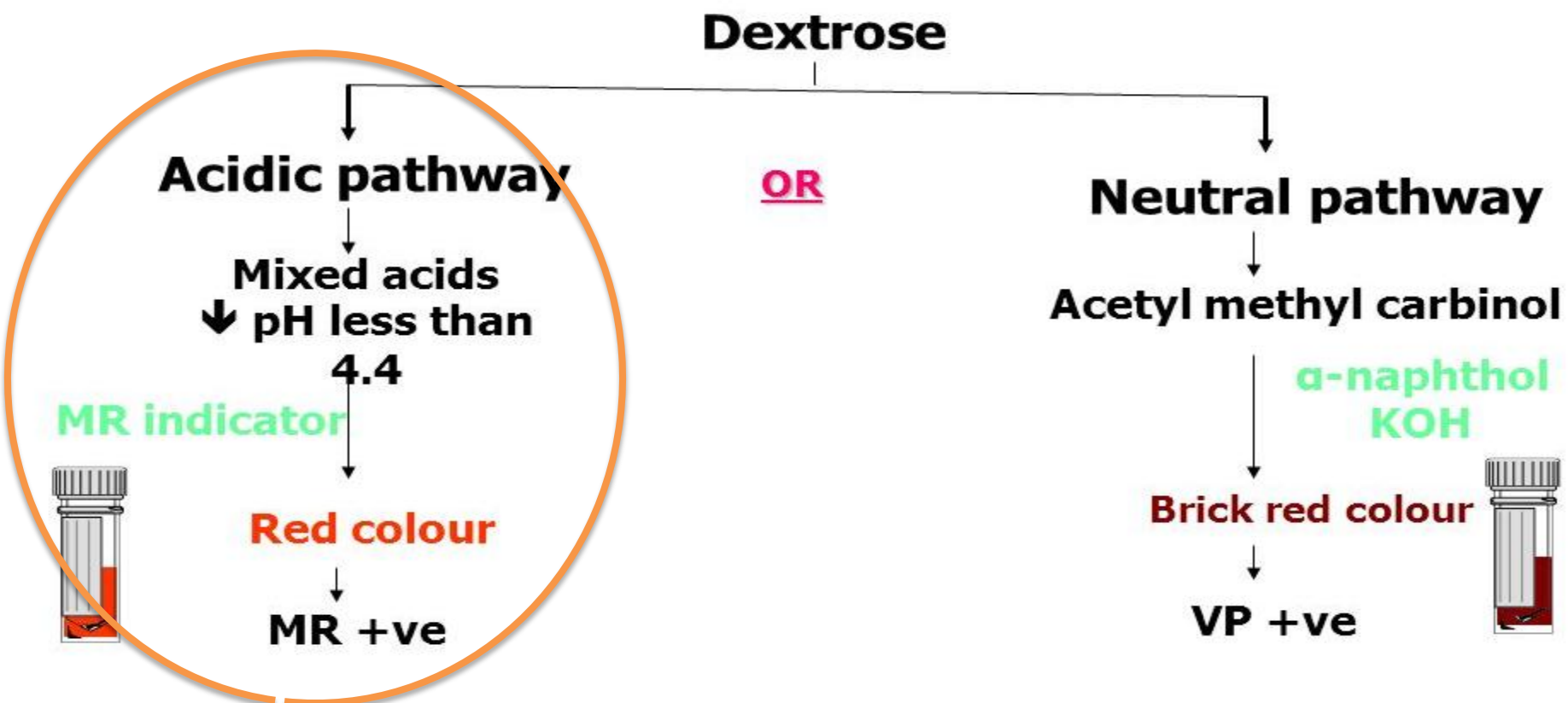
سلبية : لا يوجد تغيير في اللون (**تبقى حلقة صفراء اللون**) حتى بعد إضافة كاشف مناسب .

ملاحظات :

١ . لا ينبغي أن تستعمل الأوساط التي تحتوي على الكلوكوز في اختبار الإندول وكذلك لا ينبغي أيضا استعمال Mueller Hinton Agar .

٢ . تعد الأوساط التي تحتوي على صبغة مثل وسط MacConkey و EMB، مصادر غير مناسبة للتلقيح

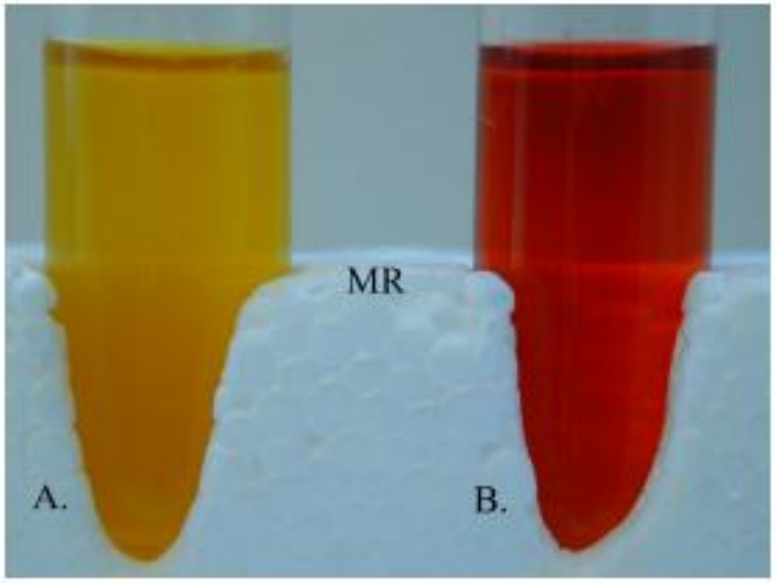
ثانيًا – اختبار Methyl Red: اختبار Methyl Red و Voges – Proskauer متلازمين او أن أحدهما مكمل لفحص الاخر الوسط المستعمل للفحصين هو نفسه و يمكن استعمال وسط MR – VP او وسط Glucose broth لكن تختلف الكواشف المستخدمة في كل فحص . كل أجناس عائلة البكتيريا المعوية يمكنها تحويل الكلوكوز إلى حامض البيروفيك عن طريق مسار إمبدن مايرهوف. لكن بعض أجناس عائلة البكتيريا المعوية يمكنها هدم حامض البيروفيك عن طريق مسار الأحماض المختلطة و الذي ينتج عنه أحماض بكمية كبيرة وبالتالي يجعل البيئة حامضية. يكشف **Methyl Red** تخمر الحامض المختلط الذي يقلل من درجة الحموضة في الوسط ، وبعدها يضاف كاشف أحمر الميثيل بعد الحضن عندها يعطي لونًا أحمر عند pH = 4.4 واللون الأصفر عند pH = 6.2. إذا كان الكائن ينتج كمية كبيرة من الأحماض العضوية التي تشمل حامض الفورميك ، وحامض الخليك ، وحمض اللبنيك من تخمر الكلوكوز ، فإن النتيجة تعطي لونًا أحمر بعد إضافة كاشف أحمر الميثيل.



كاشف اختبار Methyl Red

-أحمر الميثيل هو كاشف للرقم الهيدروجيني pH فعند إضافته إلى مزرعة الpH فيها 4.4 أو أقل فإن المزرعة تتخذ اللون الأحمر (نتيجة موجبة للاختبار)

-إذا كانت المزرعة رقم pH فيها 6.2 أو أكثر فإنها تتخذ اللون الأصفر (نتيجة سالبة للاختبار)

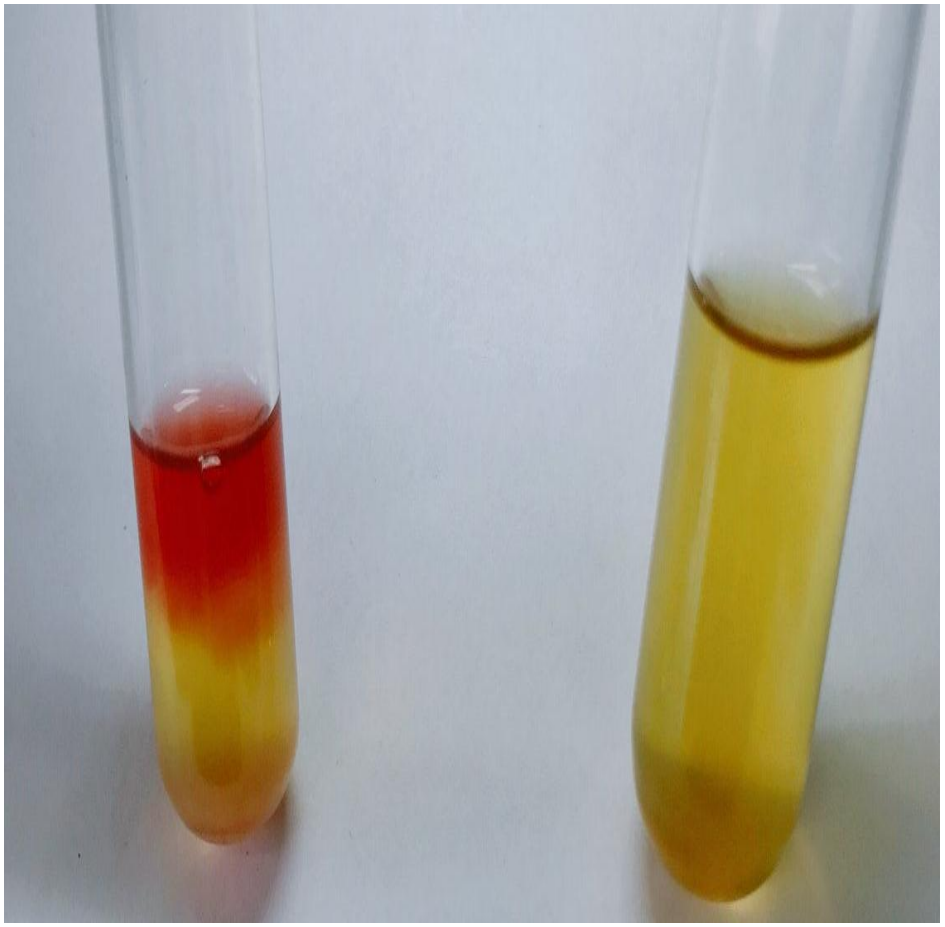


طريقة عمل اختبار المثيل الأحمر Methyl Red test :

١- تزرع البكتريا في وسط Glucose broth او وسط MR – VP المحضر في انابيب معقمة.

٢ – تحضن الانابيب لمدة ٤٨ ساعة بحرارة ٣٧ مئوية .

٣ – ببعد التحضين تضاف للانابيب ٠,٥مل من كاشف Methyl red ترج الأنابيب برفق وتترك المدة ١٥ دقيقة.

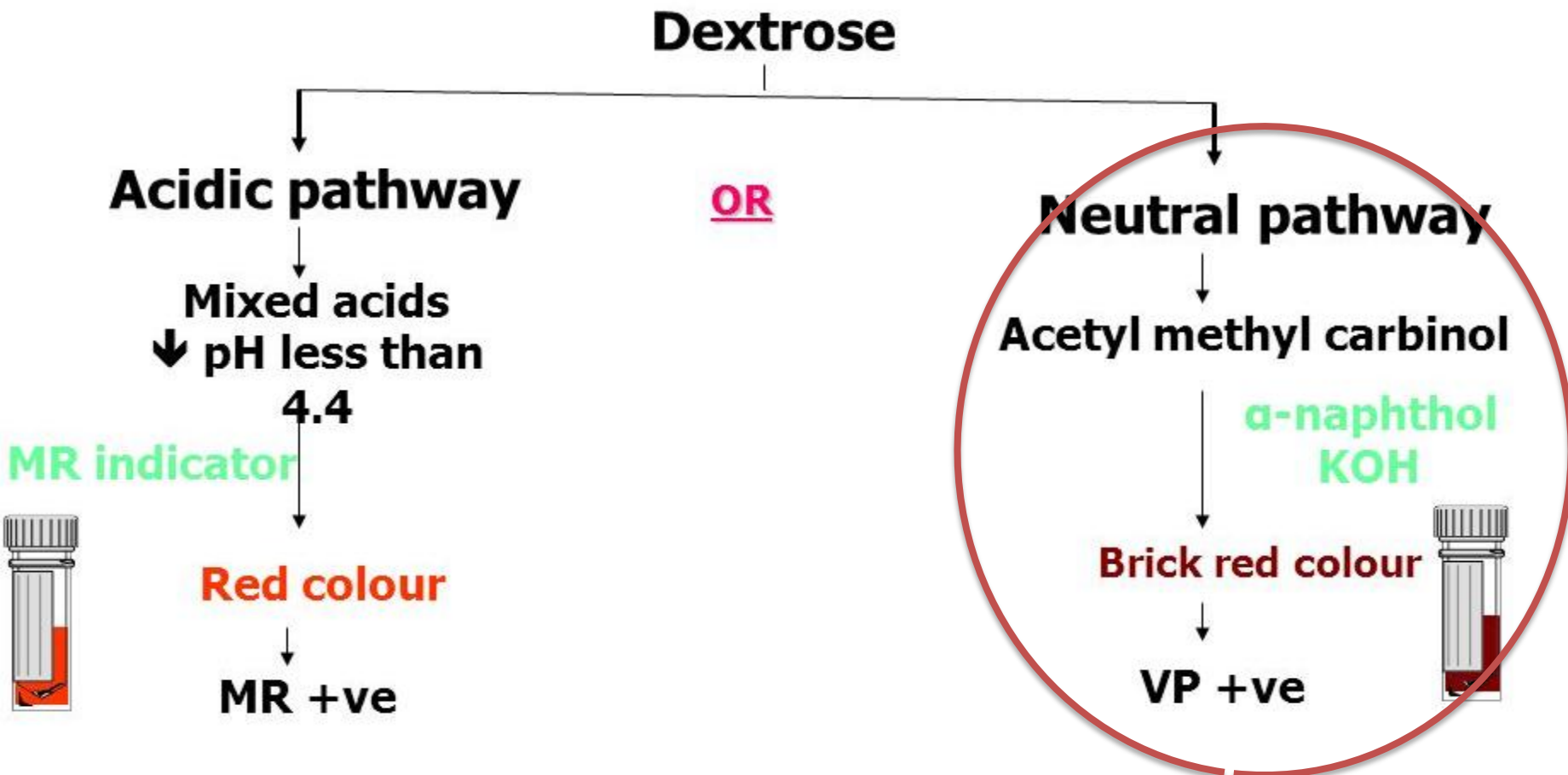


النتيجة :

إيجابية : تكوين اللون (**الأحمر**) خاصة في الطبقات العليا الملامسة للهواء من الوسط وعند رج الأنبوبة يتحول الوسط كله إلى اللون الأحمر حسب كمية ان الوسط المستخدم في هذا الاختبار .

سلبية : لا يوجد تغيير في اللون (**بقاء اللون الأصفر**) حتى بعد إضافة كاشف الخاص بالاختبار.

ثالثًا – اختبار Voges proskauer: يستعمل هذا الفحص لتحديد قدرة بعض الأنواع من البكتريا على انتاج مركب متعادل يسمى " Acetyl methyl carbonile (Acetoin) " من الكلوكوز ، حيث يتم تحطيم الجلوكوز جزئيا بواسطة البكتيريا لينتج حامض البيروفيك بمسار التحلل السكري ثم يتحول بعدها إلى مادة ال " Acetoin " بمسار يدعى تخمر Butandiol fermenters حيث يتكون في الوسط مركبات ال butandiol و acetoin وقليل من الحوامض العضوية مما يؤدي إلى انخفاض بسيط في PH الوسط هذه النواتج تميل الى التعادل ولها خاصية انتاج لون أحمر مع كاشف الالفانفثول الموجود في محيط قاعدي.



كاشف باريت Barrett's reagent

يتكون من ١مللتر من ٤٠ % KOH و ٣ مللتر من ٠,٠٥ الفا نفثول .

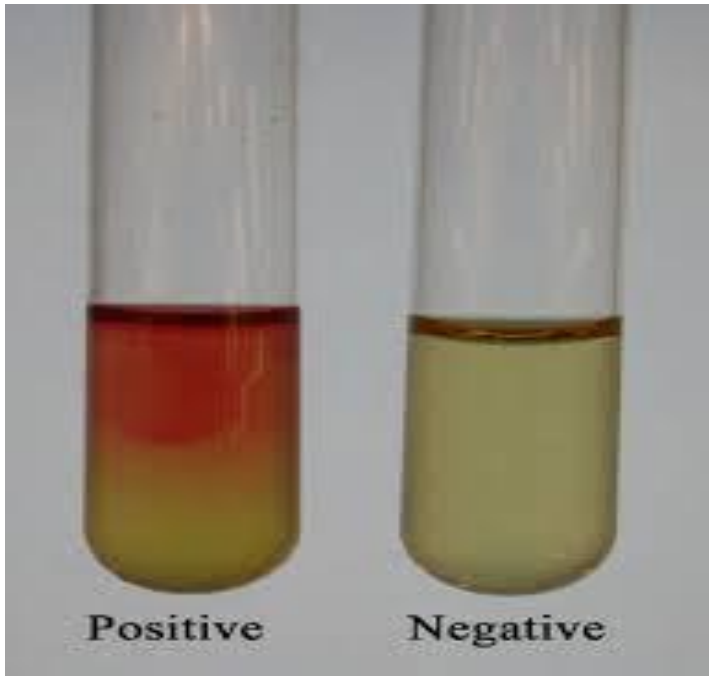
* يفضل هذا الكاشف عن غيره لانه يعتبر اسرع وادق واكثر

طريقة عمل اختبار Voges proskauer:

١- بواسطة Loop يلوث وسط MR-VP بالبكتريا المراد اختبارها.

٢ - يحضن الوسط لمدة ٢٤- ٤٨ ساعة بحرارة ٣٧ مئوية .

٣ - بعد انتهاء فترة الحضن تستخرج الانابيب من الحاضنة و يضاف كاشف باريت وذلك بإضافة الفا نفثول ثلاثة أضعاف ثم إضافة KOH ضعف واحد وترك الأنابيب لمدة ١٥ دقيقة .



النتيجة :

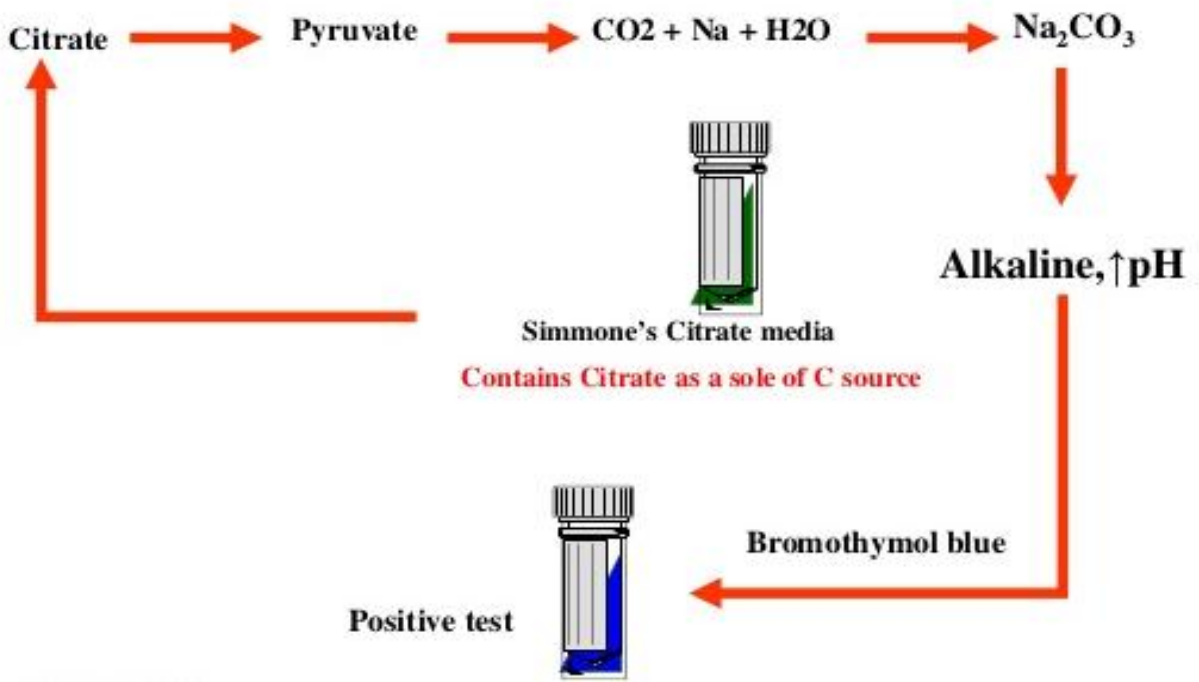
إيجابية : تكوين اللون (**الأحمر**)

سلبية : يتغير لون الوسط حتى بعد إضافة كاشف الخاص بالاختبار.

ملاحظة : البكتريا التي تعطي نتيجة موجبة لهذا الفحص تعطي سالبة للفحص السابق والعكس صحيح .

ثالثاً – اختبار استهلاك السترات Citrate utilization test: يستعمل الاختبار للكشف عن البكتريا القادرة على استهلاك (تخمر السترات كمصدر للكاربون والامونيا كمصدر وحيد للنيتروجين فعند غياب الكلوكوز أو اللاكتوز بعض البكتريا لها القدرة على استعمال السترات Citrate كمصدر كاربوني للحصول على الطاقة حيث أن هذه القدرة تعتمد على وجود انزيم permease الذي يقوم بنقل السترات من الوسط إلى داخل الخلايا حيث تكسر جزيئات السترات بأنزيمات داخل الخلايا للاستفادة من الكاربون كمصدر للطاقة .

ينتج عن هذه العملية ثاني أوكسيد الكاربون الذي يتفاعل مع الصوديوم والماء ليعطي كاربونات الصوديوم القاعدية وبذلك ترتفع درجة PH للوسط مما يؤدي إلى تغير لون الكاشف من الأخضر إلى الأزرق ، يستعمل وسط Simmons Citrate Agar وهو وسط صلب اخضر اللون ، هذا الوسط هو الوحيد ضمن أوساط اختبارات IMViC يحتوي على الكاشف الذي يكون ضمن مكونات الوسط نفسه ، أن اسم الكاشف هو Bromo thymol Blue الذي يكون لونه اخضر في الوسط المتعادل في pH = ٦.٩ ، ازرق بالقاعدي في في pH = ٧.٦ ، أصفر بالوسط الحامضي.



طريقة عمل اختبار Citrate utilization test:

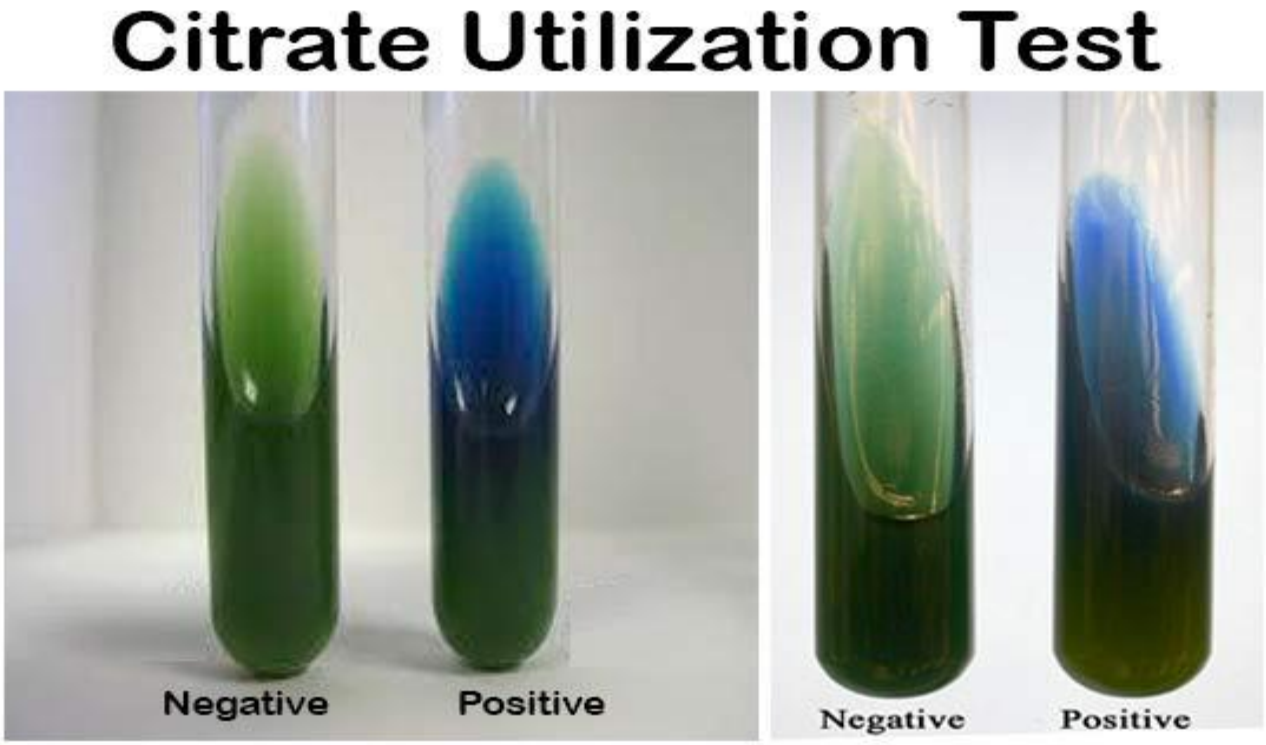
١- تلقح انابيب Simmons Citrate Agar بالبكتريا وتحضن بالحاضنة بدرجة ٣٧ م لمدة ٢٤ساعة.

٢ - بعد انتهاء فترة الحضانة تستخرج الانابيب من الحاضنة وتقرا النتائج مباشرة.

النتيجة :

إيجابية : تحول اللون الوسط من الأخضر الى الأزرق كما في بكتريا *Enterobacter aerogenes*.

سلبية : تكون ببقاء لون الوسط الأخضر كما في حال بكتريا *Escherichia coli*.



Species	Indole	Methyl Red	Voges-Proskauer	Citrate
Escherichia coli	Positive	Positive	Negative	Negative
Shigella spp. [2]	Negative	Positive	Negative	Negative
Salmonella spp.	Negative	Positive	Negative	Positive
Klebsiella spp.	Negative	Negative	Positive	Positive
Enterobacter aerogenes	Negative	Negative	Positive	Positive

References

- https://biologyreader.com/methyl-red-test.html
4\5\2020 9:20 PM
https://thevirtualedge.weebly.com/imvic-test.html
5\5\2020 12:00 AM

رابط فيديو شرح المحاضرة على اليوتيوب

https://youtu.be/xRDAr1zbr-M