الجلسة العملية الخامسة

الاختبارات الكيميائية الحيوية

لا تكفي دراسة الخواص الشكلية والتلوينية مجهرياً أو الخواص المزرعية للجراثيم من أجل تشخيص الجراثيم الممرضة الموجودة في العينة المفحوصة، فهناك العديد من أنواع الجراثيم التابعة للجنس نفسه تتشابه من حيث الصفات الشكلية والمزرعية. وبما أن الجراثيم تقوم بكثير من النشاطات الاستقلابية الحيوية بمساعدة العديد من الإنزيمات النوعية (حيث تختلف الجراثيم عن بعضها بالإنزيمات التي تحويها أو بالطرق الاستقلابية التي تسلكها)، لذلك غالباً ما يلجأ إلى إجراء الاختبارات الكيمياحيوية والتي تعد عادة كافية لتحديد هوية الجرثوم. وكلما كان عدد الاختبارات المجراة أكبر كلما زادت نسبة التحقق من هوية الجرثوم.

أولا: اختبار الكاتالاز catalas test:

يوجد إنزيم الكاتالاز عند أغلب الجراثيم الحيهوائية واللاحيهوائية المخيرة، وظيفته تكمن في تخليص الخلية الجرثومية من الماء الأكسجيني الذي ينتج عن العمليات الاستقلابية كمركب نهائي من استقلاب السكريات باعتبار أن الماء الأكسجيني سام للجراثيم ويسبب موتها.

ويجرى الاختبار كالتالي:

يوضع قطرة من الماء الأكسجيني على صفيحة زجاجية و يوضع فوقها جزء من المستعمرة الجرثومية المراد إجراء الاختبار عليها فإذا حدث فوران (انطلاق الأوكسجين) فنتيجة الاختبار ايجابي وإذا لم يحدث تكون نتيجة الاختبار سلبي.

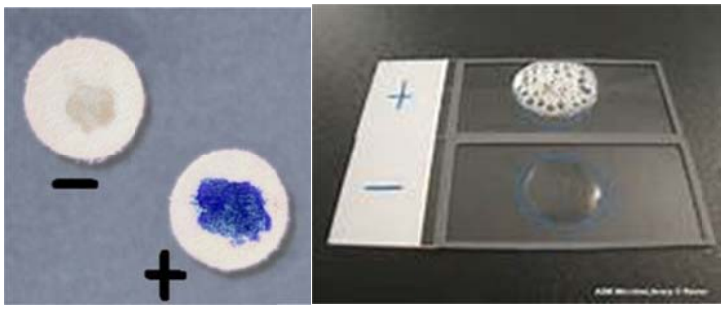
$2H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$ بوجود انزيم الكاتالاز

يستخدم هذا الاختبار للتميز بين المكورات العنقودية ايجابية الكاتالاز و المكورات العقدية سلبية الكاتالاز.

ثانياً: اختبار الأوكسيداز:

يزرع الجرثوم في البيئة الصلبة المائلة الملائمة ويحضن لمدة 18 ساعة، ثم يخلط حجمان من محلول ألفا نافتول مع ثلاث أحجام من محلول دي ميتيل بارافينيلين دي أمين هيدروكلوريد ومن هذا المزيج تنقط عدة نقاط على المستعمرات النامية على السطح المائل للبيئة. وفي الحالة الإيجابية (الجرثوم يمتلك إنزيم الأوكسيداز) يظهر لون أزرق خلال ثوان معدودة. وفي الحالة السلبية (الجرثوم لا يمتلك إنزيم الأوكسيداز) لا يحدث أي تلون.

وهناك حالياً أقراص ورقية أو أشرطة مشبعة بهذه المادة تباع جاهزة في الأسواق، ويكفي أن نضع عليها قطرة ماء قبل الاستخدام ثمَ يوضع عليها جزء من مستعمرة جرثومية. الضمات والزوائف إيجابية لاختبار الأوكسيداز. بينما الأمعائيات سلبية.



الجلسة العملية الخامسة

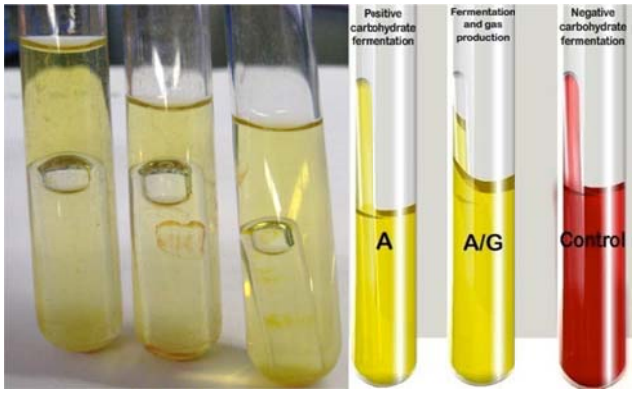
ثالثاُ: اختبار تخمر السكاكر وانطلاق الغاز Carbohydrate fermentation test:

تستخدم الجراثيم السكريات لإنتاج الطاقة اللازمة لكافة نشاطاتها الحيوية الضرورية لحياتها. يجرى هذا الاختبار للتعرف على قدرة الجرثوم على تخمير السكاكر وإنتاج حمض يرافقه أو لا يرافقه إنتاج غاز.

يجرى الاختبار في أنبوب يحوي وسط سائل مكون من ماء الببتون مع السكر المراد دراسته بتركيز 1%، مع مشعر للحموضة مثل كاشف أندريد (زهري بالوسط الحمضي وعديم اللون بالقلوي) أو كاشف حمرة الفينول (أصفر بالوسط الحمضي و أحمر بالقلوي), بالإضافة إلى أنبوب صغير يوضع بشكل مقلوب داخل أنبوب يدعى أنبوب دورهم (Durham tube) للدلالة على انطلاق الغاز، يتم زرع الأنبوب بالجرثوم المراد دراسته ثم نحضن على الدرجة 37 م ولمدة 24-48 ساعة أو أكثر حسب نوع الجرثوم.

النتيجة: إذا كان الجرثوم من النوع الذي يخمر السكر فإن المشعر سوف ينقلب لونه نتيجة تشكل الحمض وتغير تفاعل الوسط من القلوي إلى الحامضي. وإذا كان من النوع الذي يخمر السكر مع انطلاق غاز فإن فقاعات الغاز سوف تتجمع بشكل فقاعة كبيرة ظاهرة للعين تحت أنبوب دورهم.

مثال: تم حضن جرثومة الاشريكية الكولونية E.coli بوجود سكر اللاكتوز وكاشف حمرة الفينول، فتكون النتيجة انقلاب لون الوسط إلى اللون الأصفر (لأن الـ E.coli قامت بتخمير اللاكتوز وأصبح الوسط حمضيا) وأيضا نلاحظ تشكل فقاعات داخل أنبوب دورهم لأن الاختمار ترافق مع انطلاق لغاز CO_2.



الزوائف الزنجارية لا تخمر سكاكر ولا تطلق غاز

رابعاً: اختبار السيترات:

نستخدم وسط السيترات لسيمون للكشف عن الجراثيم القادرة على استهلاك الكربون من مصادر لا عضوية مثل السيترات الصوديوم، ويحتوي الوسط -بالإضافة للسيترات – على أملاح مثل فوسفات أحادية الأمونيوم و فوسفات ثنائية البوتاسيوم، وسلفات المغنزيوم، بالإضافة إلى مشعر أزرق برومو تيمول.

في حال نمت الجرثومة واستهلكت السيترات فإن نواتج الاستقلاب ستكون قلوية مما يؤدي إلى انقلاب لون الوسط من الأخضر إلى الأزرق، ونقول بأن اختبار السيترات ايجابي مثل جراثيم الكلبسيلا والسلمونيلا و الزوائف.

أما إذا بقي لون الوسط أخضر فنقول بأن اختبار السيترات سلبي مثل الاشريكية القولونية و الشغيلا.

الجلسة العملية الخامسة

خامساً: اختبار الكشف عن إنتاج غاز كبريت الهيدوجين (H2S) باستخدام بيئة كليجلر:

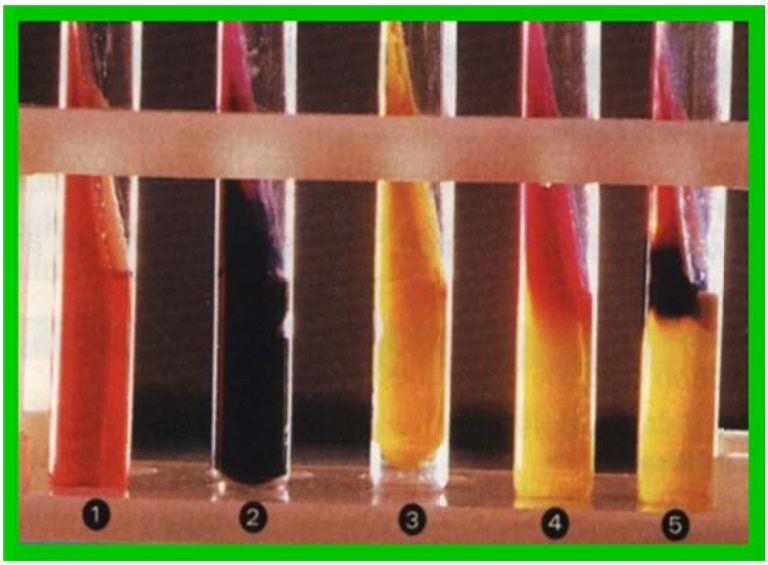
تعتمد على استخدام **بيئة كليجلر** والتي تسمح لنا أيضاً بدراسة تخمر **الغلوكوز واللاكتوز**؛ فهذه البيئة تحوي إضافةً إلى المكونات الأخرى على غلوكوز ولاكتوز وحمرة الفينول وسلفات الحديد، وهذا المركب هو الذي يتفاعل مع غاز كبريد الهيدروجين ليشكل **راسباً أسود من كبريد الحديد**، وبعد سكب هذه البيئة في أنابيب وتعقيمها توضع الأنابيب بشكل مائل حتى تبرد بحيث نحصل على وسط مائل، ثم تزرع الأنابيب بالجرثوم المراد دراسته. القسم المائل يزرع **بالفرش** أما القسم القائم فيزرع **بالوخز العميق**، ثم توضع الأنابيب المزروعة في الحاضنة بدرجة37 م° لمدة 24 ساعة وبعدها تقرأ النتائج:

* إذا بقي اللون في **أسفل** الأنبوب **أحمر** فمعنى ذلك أن **الغلوكوز لم يتخمر**، أما إذا أصبح **أصفر** فمعنى ذلك **تخمر الغلوكوز**، وإذا كان تخمر الغلوكوز يترافق مع **انطلاق غاز** فسوف نلاحظ وجود **فقاعات غازية**، وإذا كانت كمية الغاز المنطلقة كبيرة فسوف نلاحظ اندفاع الأغار بكامله نحو الأعلى.

* إذا بقي اللون في أعلى الأنبوب (السطح المائل) **أحمر** فمعنى ذلك أن **اللاكتوز لم يتخمر**، وإذا أصبح **أصفر** اللون فهذا يعني **تخمر اللاكتوز**، ويمكن أن يتخمر الغلوكوز واللاكتوز معاً، وهنا يصبح لون البيئة بكاملها أصفر.

* **انطلاق غاز كبريد الهيدروجين** يترافق بتلون البيئة **بلون أسود** وذلك في المنطقة الواقعة في منتصف الأنبوب، وإذا كان الجرثوم من النوع الذي يطلق كميات كبيرة من هذا الغاز فيمكن أن يتلون الأنبوب بكامله باللون الأسود.

معظم السلمونيلات وبعض المتقلبات تشكل غاز كبريد الهيدروجين، أما الاشريكية القولونية والشيغلة والكلبسيلة واليرسينية المعوية القولونية فلا تشكل غاز كبريد الهيدروجين.



الجلسة العملية الخامسة

سادساً: اختبار الأندول:

الهدف من الاختبار هو الكشف عن الجراثيم القادرة على استقلاب الحمض الأميني التريبتوفان وإطلاق غاز الأندول.
حيث يتم الاختبار عادة في وسط سائل أو نصف صلب مكون من ماء البيبتون المضاف له التريبتوفان ثم بعد زرع الجرثوم المراد اختباره يتم حضن الوسط على الدرجة 37م° لمدة 24 ساعة بعدها نقوم بإضافة عدة نقاط من كاشف كوفاك (بارا دي ميتيل أمينو بنزألدهيد) على سطح المنبت السائل المزروع وسوف يتفاعل مع غاز الأندول في حال وجوده ويعطي حلقة حمراء دليل على ايجابية التفاعل, مثل الاشريكية الكولونية والشغيلة.
أما إذا لم يتفكك التريبتوفان ولم ينطلق غاز الأندول فتتشكل حلقة صفراء دليل على سلبية التفاعل، مثل السلمونيلا والكلبسيلة.

سابعاً: اختبار حمرة المتيل وفوكس بروسكاور:

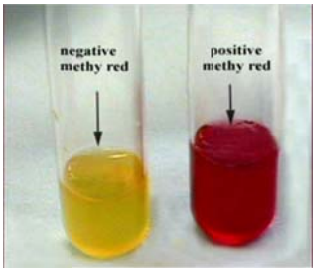
إن الجراثيم عند قيامها بتخمير الغلوكوز في البيئة الحاوية عليه فإنها تسلك أحد الطريقين الاستقلابيين التاليين:
إما الطريق **الحمضي** حيث تكون النواتج النهائية كميات كبيرة من الحموض (حمض الخل، حمض اللبن، حمض النمل...الخ) وتكون باهاء الوسط أقل من 4.2.

أو تسلك طريق تكون نتيجته النهائية مركب يدعى **أستوئين** (أستيل متيل كاربونيل) حيث يكون باها الوسط أكبر من 6.2.

نعتمد بهذا الاختبار على زرع الجرثوم المراد اختباره على وسط أحمر المتيل فوكس بروسكاور السائل (methyl red vogos proscaour broth) أو وسط كلارك –لوبس وتحضن بدرجة 37 م° لمدة 24 ساعة لتكتمل تفاعلات التخمر للغلوكوز ، ثم نقوم باختباري MP, VP ويتم ذلك أن نقسم أنبوب الزرع إلى **قسمين:**

1- قسم نضيف له كاشف حمرة المتيل فإذا ظهر لون أحمر نقول بأن التفاعل ايجابي MR^+ مثل الاشريكية القولونية و الشغيلة وبالتالي تكون الجراثيم قد سلكت الطريق الحمضي المختلط في استقلابها، أما إذا ظهر لون أصفر دل ذلك على سلبية التفاعل -MR مثل الزوائف والكلبسيلا

الجلسة العملية الخامسة



2- القسم الآخر نضيف له كاشف باريت (ألفا نفتول مع ماءات البوتاسيوم) فإذا تشكل لون أحمر بعد 5-10 دقائق دل ذلك على ايجابية تفاعل فوكس بروسكاور VP^+ مثل الكلبسيلة وبالتالي تكون الجرثومة قد سلكت طريق الأسيتوئين في استقلابها, وإذا ظهر لون أصفر دل ذلك على سلبية تفاعل فوكس بروسكاور -VP مثل الاشريكية القولونية و الشغيلا