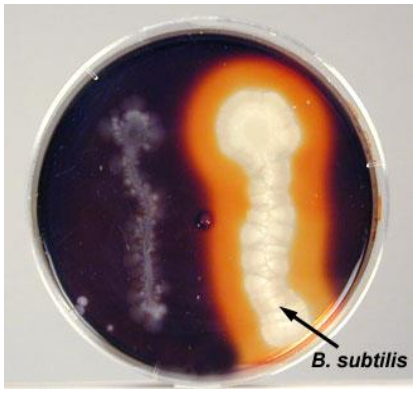
الاختبارات الكيموحيوية المستخدمة في تعريف البكتيريا (الإنزيمات البكتيرية)
Biochemical activity tests for bacterial identification (Enzymes)

تقوم الكائنات الدقيقة (كالبكتيريا) بافراز انواع عديدة من الانزيمات لتحليل الكثير من المواد المعقدة الكربوهيدراتية والبروتينية والدهنية لتحوله الى جزيئات صغيرة الحجم يمكن امتصاصها

التحلل المائي للنشا Starch hydrolysis

اسم التجربة: اختبار قدرة البكتيريا على تحليل النشا
الهدف من التجربة: التمييز بين الكائنات الدقيقة عن طريق قدرتها على تحليل النشا
- من المعروف إن النشا مادة كربوهيدراتية عبارة عن نوعين من الوحدات:
• **اميلوز** Amylose (سلاسل مستقيمة من الجلوكوز) **و اميلوبكتين** Amylopectin (سلاسل متفرعة من الجلوكوز)
- لكي يتمكن الكائن من تحليل النشا لابد من إفراز الإنزيمات:
α-B amylase (يكسر سلاسل الاميلوز المستقيمة إلى وحدات الجلوكوز)
amilo 1-6 glucosidase (يكسر سلاسل الاميلوبكتين المتفرعة الى وحدات الجلوكوز)

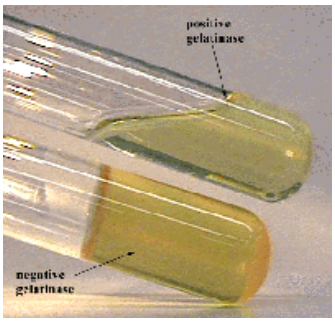
طريقة العمل: تحت ظروف التعقيم
1- كل مجموعة لديها 2 طبق بتري يحتوي على بيئة اجار النشا
2- يلقح منتصف الطبق بمزرعة بكتيرية حديثة العمربواسطة ابرة تلقيح ويترك الطبق الاخر كنترول للمقارنة
3- يحضن الطبق مقلوب عند 37م لمدة 24-48ساعة
4- يكشف عن قدرة البكتيريا على تحلل النشا باسخدام اليود, حيث يغمر سطح البيئة بكمية مناسبة من اليود. وجود هالة شفافة حول النمو البكتيري يدل على ان البكتيريا قادرة على تحلل المشا (نشا +يود ←لون أزرق) أي انها تفرز انزيم الأميليز للوسط الخارجي الذي يكسر النشا الى سكريات بسيطة (الجلوكوز) وبالتالي تظهر المنطقة الشفافة الخالية من النشا
5- اذا لم يوجد منطقة عديمة اللون حول النمو يعني ان عدم قدرة البكتيريا على تحليل النشا



اسالة الجيلاتين Gelatin Liquefaction

اسم التجربة: دراسة قدرة البكتيريا على تحلل الجيلاتين
الهدف من التجربة: التعرف على البكتيريا القادرة على اسالة الجيلاتين
الجيلاتين مادة بروتينية محضر من التحلل المائي للكولاجين
بعض أنواع البكتيريا قادرة على انتاج انزيم خارجي Gelatinase الذي يحلل الجيلاتين

طريقة العمل: تحت ظروف التعقيم
1- كل مجموعة لديها 2 انبوبة تحتوي على كمية مناسبة من بيئة الجيلاتين المغذي nutrient gelatin
2- تلقح الانبوبة بمزرعة بكتيرية حديثة العمر بطريقة الوخز(الانبوبة الثانية كنترول)
3- تحضن الانبوبة عند 30-37م لمدة من 48-72ساعة
4- يكشف عن قدرة البكتيريا على تحلل الجيلاتين بوضع الانابيب في وعاء يحتوي على ثلج ويترك لمدة 15 دقيقة, ثم تمسك الانبوبة ويتم امالتها, اذا وجدت ان البيئة مازالت متماسكة يعني ان الجيلاتين لم يتحلل بواسطة البكتيريا أما اذا لاحظت اسالة الجيلاتين فهذا يدل على ان البكتيريا افرزت انزيم Gelatinase الذي يحلل الجيلاتين



تحلل الكازين Casein hydrolysis

اسم التجربة: اختبار قدرة البكتيريا على تحليل الكازين
الهدف من التجربة: تمييز الانواع البكتيرية المحللة للكازين
الكازين هو البروتين السائد في اللبن (يعطي اللون الابيض)
الكثير من البكتيريا تفرز الانزيم الخارجي Caseinase الذي يحلل الكازين الى مواد ذائبة شفافة

طريقة العمل: تحت ظروف التعقيم
1- كل مجموعة لديها 2 طبق يحوي وسط اجار اللبن
2- يلقح منتصف الطبق ببكتيريا حديثة العمر بابرة التلقيح (الطبق الاخر كنترول)
3- يحضن الطبق مقلوب عند 37م لمدة 24-48 ساعة
4- تسجل النتيجة بعد التحضين مباشرة, اذا لاحظت وجود هالة شفافة حول النمو البكتيري يدل على ان البكتيريا حللت الكازين بافراز نزيم الكازينيز, واذا لم يوجد منطقة رائقة حول النمو دليل على عدم قدرة البكتيريا على تحلل الكازين

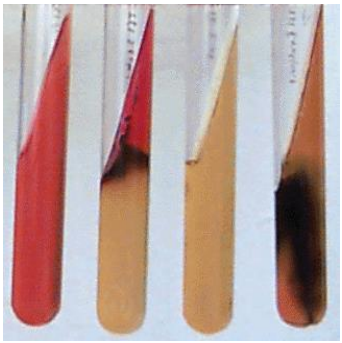
تحلل الدهون Lipid hydrolysis

اسم التجربة: اختبار قدرة البكتيريا على تحلل الدهون
الهدف من التجربة: التعرف على قدرة الانواع البكتيرية على تحليل الدهن
قدرة البكتيريا على تحليل الدهون راجع الى افراز انزيم Lipase الذي يقسم جزيء الدهن الى جزيء جليسرول و3 جزيئات من 3 احماض دهنية

طريقة العمل: تحت ظروف التعقيم
1- لديك 2 طبق يحتوي بيئة اجار الدهن, يلقح وسط الطبق بمزرعة حديثة العمر بابرة التلقيح والطبق الثاني كنترول
2- يحضن الطبق عند 37م لمدة 96 ساعة
3- يكشف عن قدرة البكتيريا هلى تحلل الدهن باضافة كمية من محلول كبريتات النحاس 10-20% لمدة 10 دقائق, ثم تخلصي من المحلول.
4- ظهور لون أزرق مخضرعلى النمو دليل على قدرة البكتيلريا على تحليل الزيت بافرازها للانزيم المحلل

تحلل الاحماض الامينية Amino Acids Hydrolysis

الاحماض الامينية هي ناتج تحلل البروتينات يمكن لبعض البكتيريا ان تحلل بعض هذه الاحماض الامينية محولة اياها الى مواد ابسط تركيبا
اسم التجربة: اختبار قدرة البكتيريا على انتاج كبريتوز الايدروجين H_2S Production
الهدف من التجربة: توضيح نشاط بعض البكتيريا في تحليل cyctine وانتاج H_2S
بعض البكتيريا تنتج غاز كبريتوز الايدروجين عند تحللها للحمض الاميني Cysteine (حمض اميني يحتوي على الكبريت) بواسطة افرازها لانزيم Cysteine desulforase
تستعمل بيئة كليجلر للكشف عن انتاج H_2S حيث تحتوي على كبريتات الحديدوز الذي يتفاعل مع H_2S مكونا راسب اسود من كبريتيد الحديدوز

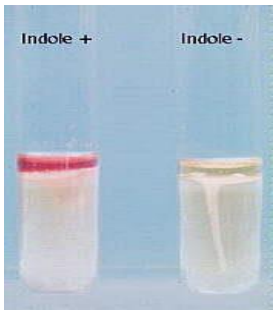


طريقة العمل: تحت ظروف التعقيم
1- كل مجموعة لديها 2 انبوبة تحتوي على بيئة كليجلر Kligler
2- تلقح الانبوبة بطريقة الوخز بمزرعة بكتيرية حديثة (*Proteus vulgaris*) ويحتفظ بالانبوبة الثانية بدون تلقيح
3- تحضن الانبوبة عند 30-37م لمدة من 2-7 ايام
4- تسجل النتيجة الموجبة على اساس وجود راسب اسود على طول خط الوخزفي حالة تكون غازH_2S , كما يلاحظ تغير لون البيئة الاحمر الى الاصفر نتيجة انخفاض قيمة PH بسبب تكون الاحماض

تحلل الاحماض الامينية الحلقية (التربتوفان)

اسم التجربة: اختبار قدرة البكتيريا على انتاج الاندول
الهدف: تمييز وتشخيص بكتيريا *E.coli* عن بكتيريا القولون المشابهة لها
بعض البكتيريا مثل *E.coli* تحلل جزيء التربتوفان الى جزيء الاندول وحمض البيروفيك بواسطة انزيم Tryptophanase

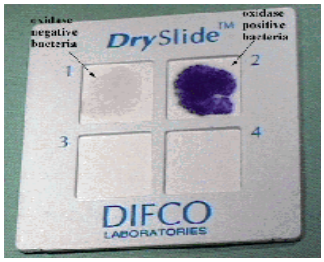
طريقة العمل: تحت ظروف التعقيم
1- لديك انبوبتين لبيئة مرق التربتون الغنية بالحمض الاميني التربتوفان
2- تلقح الانبوبة ببكتيريا حديثة العمر وتترك الانبوبة الاخرى للمقارنة
3- تحضن الانابيب عند 30م لمدة 48ساعة
4- يكشف عن قدرة البكتيريا على انتاج الاندول باضافة 0.5 مل من الكاشف كوفاك Kovack's reagent (بارا داي ميثيل امينوبنزالدهيد) للانبوبة, تكون حلقة وردية عند سطح البيئة دليل على ايجابية الاختبار



الاكسدة البيولوجية Biooxidations

هي تلك التفاعلات الانزيمية المختصة بعمليات التنفس والتخمر
اسم التجربة: اختبار انتاج انزيمات الاكسيديز
الهدف من التجربة: تشخيص الاجناس المختلفة من البكتيريا السالبة لجرام
الاوكسيديز انزيمات مؤكسدة ضمن سلسلة الانزيمات التنفسية المسؤلة عن تفاعلات الفسفرة التاكسدية
البكتيريا التابعة لعائلة *Enterobacteriaceae* (سالبة) ومعظم انواع الجنس *Pseudomonas* (موجبة)

طريقة العمل: تحت ظروف التعقيم
1- يلقح بواسطة التخطيط بيئة اجار الجلوكوز بالبكتيريا *Pseudomonas aeroginosa*
2- تحضن عند 30-37م لمدة 24 ساعة
3- يغمر سطح المزرعة بقليل من محلول الاكسيديز (1% داي ميثيل فينيلين داي امين هيدروكلورايد (Dimethyl phenylenediamine hydrochloride , تظهر المستعمرات الموجبة وردية اللون ثم تتدرج لتصبح بنية ثم حمراء داكنة ثم سوداء



اسم التجربة: اختبار الكاتاليز Catalase production test
الهدف: التعرف على البكتيريا المنتجة للكاتاليز(عادة يستخدم للتفرقة بين المكورات العنقودية والسبحية)
معظم البكتيريا الهوائية اجبارا واختيارية التهوية (تستعمل O2) تنتج H_2O_2 (فوق اكسيد الهيدروجين) واستمرار نموها في وجود هذا الناتج السام يعود لاكتلاكها انزيم الكاتاليز الذي يحلل H_2O_2

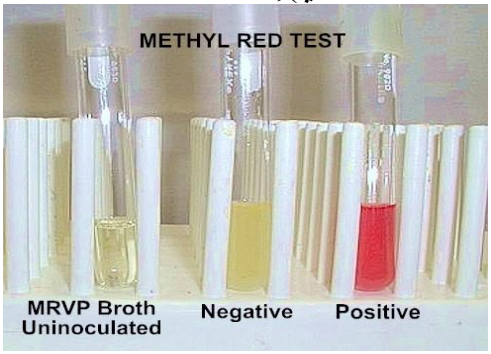
$$H_2O_2 \xrightarrow{\text{catalase}} 2H_2O + O2$$

طريقة العمل: تحت ظروف التعقيم
1- لديك مزرعة حديثة العمر واخرى قديمة
2- يغمر سطح المزرعة بكمية من محلول 3%فوق اكسيد الهيدروجين
3- لاحظي تصاعد فقاعات من المزرعة الحديثة نتيجة انطلاق غاز O2 بفعل انزيم الكاتاليز

التخمر الحمضي المختلط Mixed acid fermentation

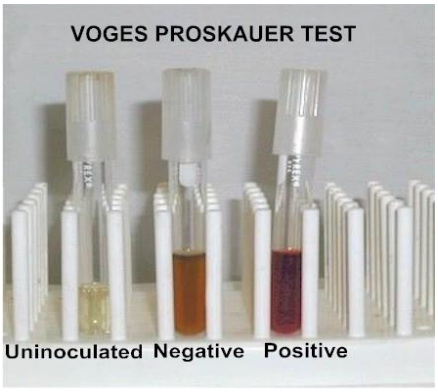
اسم التجربة: اختبار احمر الميثيل Methyl Red (MR) Test
الهدف: التمييز بين البكتيريا على اساس نواتج تخمرها للجلوكوز وانتاج كمية الاحماض بالبيئة
الكثير من البكتيريا السالبة لجرام التي تعيش بامعاء الانسان يمكنها ان تخمر الجلوكوز مكونة كميات كبيرة من احماض اللاكتيك والخليك والسكسينيك والفورميك علاوة على Co2 والكحول والهيدروجين تكدس هذه الاحماض بالبيئة سيخفض قيمة PH , فاذا اضيف للمزرعة دليل احمر الميثيل سيظهر لون احمر ممايدل على ان الميكروب Mixed acid fermenter

طريقة العمل: تحت ظروف التعقيم
1- تلقح انبوبة محتوية على بيئة فوجس بروسكاور-احمر الميثيل MR-VPmedium بمزرعة حديثة، والانبوبة الاخرى كنترول
2- يتم التحضين عند 37م لمدة 48 ساعة
3- نختبر قدرة البكتيريا على انتاج الحمض باضافة عدة نقاط من دليل احمر الميثيل للمزرعة (لونه احمر بالوسط الحمضي واصفر بالوسط القاعدي), اذا احتفظ الدليل بلونه الأحمر يعني ان الاختبار موجب



اسم التجربة: اختبار فوكس برسكاور Voges Proskaur (VP) Test
الهدف: الكشف عن المركب المتعادل التاثير Acetyl Methyl Carbinol (a.m.c) اثناء عملية تخمر الجلوكوز
عند نمو البكتيريا في البيئة تنتج للوسط الخارجي كمية من الاحماض وتراكمها يثبط البكتيريا نتيجة خفض قيمة PH، الان هناك بعض انواع البكتيريا تنتج مواد قاعدية وسطية تعادل فعل تلك الاحماض وبالتالي تنمو.
يمكن التحقق من وجود (a.m.c) بواسطة كاشف باريت Barritt's reagent

طريقة العمل: تحت ظروف التعقيم
1- كل مجموعة تلقح انبوبة بها بيئة MR-VP medium بمزرعة بكتيرية حديثة
2- تحضن الانابيب عند 37م لمدة 48 ساعة
3- يكشف عن قدرة البكتيريا على انتاج (a.m.c) باضافة بضع قطرات من كاشف **باريت أ** (يتكون من الفانفثول) ثم مقدار من كاشف **باريت ب** (عبارة عن محلول هيدروكسيد البوتاسيوم) , تترك الانابيب لمدة 5-15 دقيقة
4- تكون حلقة حمراء عند سطح البيئة دليل على ان الاختبار موجب



انزيم الكواجيوليز Coagulase Enzyme

اسم التجربة: اختبار قدرة البكتيريا على انتاج انزيم الكواجيوليز
الهدف من التجربة: التمييز بين المكورات العنقودية الممرضة Pathogenic والغير ممرضة Non pathogenic
يؤدي هذا الانزيم الى تخثر Coagulation بلازما الدم حيث يحول مادة الفيبرينوجين Fibrinogen الموجودة في البلازما الى فيبرين Fibrin

طريقة العمل: تحت ظروف التعقيم
1- ينقل 0.5 مل من البلازما الى انبوبة اختبار معقمة
2- يضاف كمية من المزرعة البكتيري الحديثة
3- تحضن عند 37م لمدة24 ساعة مع مراعة فحص الانبوبة كل نصف ساعة حتى تظهر علامات التخثر.

انزيم تحلل الحمض النووي (DNase) Reoxyribonuclease Test

اسم التجربة: اختبار قدرة البكتيريا على افراز انزيم DNase
الهدف: التعرف على البكتيريا التي تفرز انزيم DNase

طريقة العمل: تحت ظروف التعقيم

1- لديك طبق بتري يحتوي على بيئة الاجار المغذي المضاف اليها الDNA
2- يلقح الطبق بمزرعة بكتيرية حديثة العمرويحضن عند 37م لمدة 24ساعة
3- يكشف عن تحلل الDNA باضافة (1N HCL) , تكون مناطق شفافة حول النمو البكتيري دليل على ان البكتيريا انتجت انزيم DNase للوسط الخارجي وحللت مادة DNA في البيئة.