3. اختبار أنزيم اليوريز

هذا الاختبار يجرى للكشـــف عن أنزيم اليوريز الذي تنتجه بعض أنواع البكتريا مثل *Proteus* و *Klebsiella*، كما أن هذا الأنزيم ينتج من قبل بكتريا *Helicobacter pylori* المسببة للقرحة حيث تستخدمه لمقاومة حموضة المعدة إذ يقوم هذا الأنزيم بتكسير جزيئات اليوريا (الناتجة عن عملية هدم البروتينات من قبل خلايا الجسم) وهي تتواجد بصورة طبيعية في عصارات المعدة. ينتج عن تكســـير اليوريا الأمونيا و CO_2، وبذلك تســـتطيع هذه البكتريا رفع الأس الهيدروجيني في بيئة المعدة لتتمكن من النمو وإحداث الإصابة.

يتميز جنس المتقلبات *Proteus* عن باقي العصيات السالبة لصبغة گرام بقابليتها على إنتاج كميات كبيرة من أنزيم اليوريز والذي له القدرة على تحليل اليوريا الموجودة في الوسط الزرعي إلى أمونيا NH_3 التي تؤدي بدورها إلى رفع الأس الهيدروجيني للوسط الزرعي من 6.8 إلى أكثر من 8 فيتحول الوسط إلى القاعدي ويمكن الاستدلال على ذلك من خلال تغير لون كاشف الفينول الأحمر من اللون الأصفر إلى الوردي.

كما أن الجراثيم الأخرى المقيمة في المجرى البولي يمكنها أيضـــاً أن تنتج اليوريز

$$\text{Urea} \xrightarrow[H_2O]{\text{Urease}} NH_3 + CO_2$$

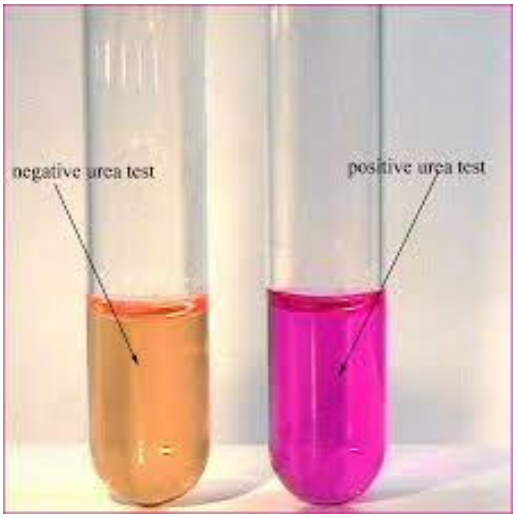
إن الوسط المستخدم في هذا الاختبار يسمى Christensen's media والذي يحتوي مستخلص الخميرة، وكاشف الفينول الأحمر ومواد غذائية أخرى، يعقم هذا الوسط بالمؤصدة ثم يضاف له محلول اليوريا المعقم ويوزع على أنابيب بشكل مائل (Slant).

إن تغير لون الوسط من الأصفر إلى الوردي في غضون ساعة واحدة نتيجة لتفكك اليوريا يعني بأن البكتريا موجبة لفحص أنزيم اليوريز، أما بقاء لون الوسط أصفراً بعد الحضن لمدة 3 ساعات فهذا يعني أن البكتريا سالبة لفحص أنزيم اليوريز. وفي حال وجود أنزيم اليوريز بكميات كبيرة فإن تغير اللون يكون سريعاً. وقد تظهر ألوان أخرى غير اللون الوردي، وإن أي تغير في لون الوسط إلى لون آخر (أحمر أو أرجواني أو برتقالي غامق) فإنه يدل على وجود أنزيم اليوريز. إن وجود بكتريا *Helicobacter pylori* بأعداد قليلة قد يعطي نتيجة سلبية خاطئة للفحص، كما أن مرضى فقد حامض المعدة يعطون نتيجة ايجابية خاطئة للفحص.

إن محلول اليوريا 20% وكذلك سكر الكلوكوز 10% يعقمان بوساطة الترشيح ويمزجان مع الوسط المغذي في درجة حرارة 50° مئوي لكي لا يحصل تحطيم في المؤصدة نتيجة الحرارة العالية للتعقيم.

يتكون وسط اليوريا Urea medium من المكونات التالية:

المادة	الكمية
Peptone	1 غم
NaCl	5 غم
KH_2PO_4	2 غم
Agar	20 غم
Phenol red 0.2%	6 مل
Distilled water	1000 مل
بعد التعقيم باستخدام المؤصدة والتبريد إلى درجة حرارة 50°م يضاف	
Glucose 10%	10 مل
Urea 20%	100 مل



ب. الاختبارات الكيموحيوية التي تستغرق يوماً واحداً أو أكثر (Overnight Biochemical Tests)

هي مجموعة من الاختبارات الكيموحيوية التي تتطلب تلقيح العزلة البكتيرية في واحد أو أكثر من الأوســـاط الزرعية التي تحتوي على مواد محددة أو دلائل كيميائية تكشـــف عن تغير في الأس الهيدروجيني أو نواتج ثانوية لكائن مجهري معين. وهي على غرار الاختبارات الســـريعة، يعتمد اختيار هذه الاختبارات على اختبارات الشـــكل الظاهري بعد التصـــبيغ بالصـــبغات المناســـبة، وكذلك على الاختبارات الـسريعة أحادية الأنزيم. هذه الاختبارات هي أيـضاً غير مكلفة و سهلة الأداء، ويمكن استخدامها كنظام وحيد للتوصيف المايكروبي (التوصيف المايكروبي الكلا سيكي). وهي بـ شكل عام عمل مكثف يتطلب تقنيين في تلقيح وحـ ضن العزلة البكتيرية، وقراءة وتف سير ور سم عدد من التفاعلات الكيموحيوية على مدار عدة أيام، والتي تنتهي بتوصـــيف نهائي للعزلة المجهولة. وفيما يلي بعض من هذه الاختبارات:

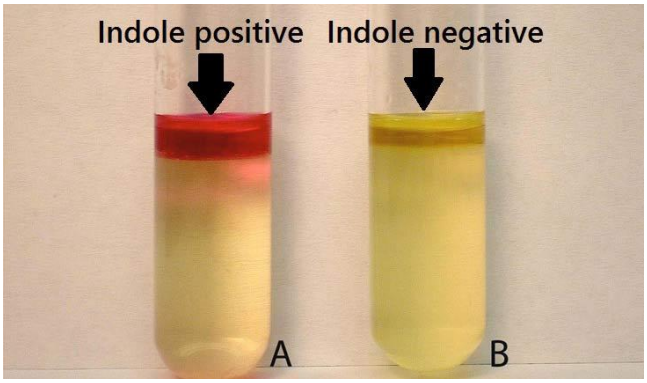
1. اختبار إنتاج الإندول من التربتوفان (Indole production test)

إن الغرض من هذا الاختبار هو التحري عن البكتريا المنتجة لأنزيم (Tryptophanase) المحلل للحامض الأميني التربتوفان الموجود في الوسط ليعطي الإندول وحامض البايروفيك والأمونيا، كما في المعادلة التالية:

$$\text{Tryptophan} + H_2O \xrightarrow{\text{Tryptophanase}} \text{Indole} + \text{Pyruvic acid} + \text{Ammonia}$$

تستخدم البكتريا حامض البايروفيك والأمونيا كمتطلبات لنموها، أما الإندول فيتراكم في الوسط. وإن نتيجة الفحص الموجب لهذا الاختبار تعتمد على تكوين مركب أحمر اللون ينتج عن تفاعل الإندول المتراكم في الوسط مع مجموعة الألديهايد (*p*-dimethylaminobenzaldehyde) والتي تعتبر المادة الفعالة في كاشف كوفاك (Kovac's reagent)، ومن أجل إجراء هذا الاختبار يجب أن تنمو البكتريا المراد فحصها على وسط غني بالحامض الأميني التربتوفان مثل (Indole nitrite broth) أو وسط SIM (Semisolid Indole Motility) وهو وسط نصف صلب يلقح بطريقة الطعن.

بعد تلقيح البكتريا المراد فحصها في أحد الأوساط الغنية بالحامض الأميني التربتوفان وحضنها لمدة 24 ساعة بدرجة حرارة 37°م تضاف خمس قطرات من كاشف كوفاك وتقلب الأنبوبة الحاوية على المرق المغذي مرتين وبخفة من دون مزج شديد ومن ثم تقرأ النتيجة. حيث يستدل على الفحص الموجب من خلال ظهور حلقة حمراء نتيجة إنتاج الإندول وتفاعله مع المادة الفعالة في الكاشف فيكون المركب الناتج أحمر اللون، في حين أن الفحص السالب يستدل عليه من خلال عدم تغير اللون الأصفر للمرق المغذي. ومن الأمثلة على البكتريا الموجبة لهذا الفحص هي بكتريا *Escherichia coli*، أما المثال على البكتريا السالبة لهذا الفحص فهي بكتريا *Enterobacter aerogenes*.



2. اختبار المثيل الأحمر (Methyl Red Test)

إن الغرض من هذا الاختبار هو تحديد قابلية البكتريا على أكسدة الكلوكوز وإنتاج تراكيز عالية من النواتج النهائية الحامضية. وبالرغم من أن جميع أفراد البكتريا المعوية تستهلك الكلوكوز كمصدر للطاقة إلا أنها تختلف فيما بينها في النواتج النهائية وحسب الأنظمة الأنزيمية (التي يمتلكها كل نوع من أنواع البكتريا). إن معظم أجناس البكتريا المعوية تحول الكلوكوز إلى حامض وقد تستمر في إنتاجها للحوامض العضوية وبتراكيز عالية مثل حامض الفورميك (Formic acid)، وحامض الخليك (Acetic acid)، وحامض السكسنيك (Succinic acid)، إضافة إلى بعض الغازات مثل الـ CO_2 و الـ H_2 الناتجة من تفكك حامض الـ Formic acid. وتدعى هذه العملية بالتخمر المختلط (Mixed Acid Fermentation). أما الأجناس الأخرى فهي أيضاً تستهلك السكر ولكن بتحويل النواتج الأيضية الوسطية لتحطيم الكلوكوز مثل حامض البايروفيك (Pyruvic acid) إلى نواتج متعادلة مثل Acetyl methyl carbinol (الاسيتون acetone).

معظم أجناس البكتريا المعوية تنتج وفي المراحل المبكرة للتحضين نواتج نهائية عبارة عن حوامض عضوية. ولكن في حالة بكتريا *Escherichia coli* مثلاً تستقر هذه النواتج لتؤدي إلى انخفاض الأس الهيدروجيني للوسط إلى 4.4 أو

أقل، بينما بكتريا *Enterobacter aerogenes* تحول هذه الحوامض إلى نواتج متعادلة في نهاية فترة التحضين، هذه النواتج المتعادلة قد تكون Ethanol أو Acetone تؤدي إلى ارتفاع الأس الهيدروجيني.

إن الوسط المستخدم لهذا الفحص هو وسط ماء الببتون والكلوكوز والفوسفات (Glucose phosphate peptone water) وهو وسط سائل يحتوي على الكلوكوز. وبعد حضن البكتريا المراد فحصها لمدة 24 –28 ساعة تضاف قطرات من كاشف المثيل الأحمر (الحاوي على صبغة المثيل الأحمر وكحول الإيثانول) إلى الوسط السائل الذي تمت تنمية البكتريا فيه. إن كاشف المثيل الأحمر هو أفضل كاشف للأس الهيدروجيني بقيمة (4.4) فما دون، فبعد إضافة الكاشف وقلب الأنبوبة مرتين من دون مزج شديد تقرأ النتيجة، حيث أن تحول الوسط إلى اللون الأحمر يعني أن البكتريا موجبة لهذا الفحص، وعكس ذلك هي النتيجة السالبة.