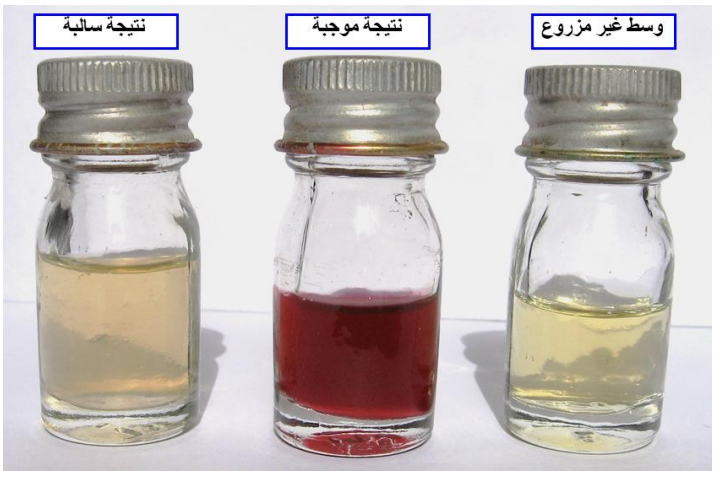
3. اختبار Voges – Proskauer:

إن الغرض من هذا الاختبار هو للكشف عن البكتريا التي تستهلك الكلوكوز بطريقة تخمر البيوتانديول Butendiol fermenters حيث تتكون في الوسط مركبات Acetone و Butendiol وقليل من الحوامض العضوية مما يؤدي إلى انخفاض بسيط في الأس الهيدروجيني للوسط. وينتج عن تخمر الكلوكوز بهذه الطريقة مركب Acetyl Methyl Carbinol المعرف بـ Acetone.

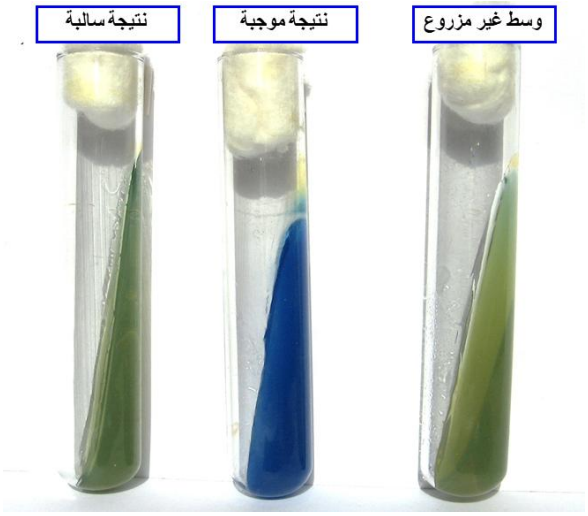
إن الوسط المستخدم في هذا الاختبار هو نفس الوسط المستخدم في اختبار المثيل الأحمر وهو وسط ماء الببتون والكلوكوز والفوسفات (Glucose phosphate peptone water)، غير أن الكاشف المستخدم في هذا الاختبار يختلف عن الكاشف المستخدم في اختبار المثيل الأحمر، فالكاشف المستخدم في هذا الاختبار هو Barritt's reagent الذي يتكون من Alpha-naphthol (5%)، وهيدروكسيد البوتاسيوم (40%) للكشف عن مركب Acetyl Methyl Carbinol الذي يعطي تأكسده اللون الوردي للوسط بعد مرور 15 دقيقة من إضافة الكاشف. ومثال البكتريا الموجبة لهذا الفحص *Enterobacter aerogenes*، أما بقاء لون الوسط أصفراً فهذا يعني أن البكتريا سالبة لهذا الفحص ومثالها بكتريا *Escherichia coli*.



4. اختبار استهلاك السترات (Citrate utilization test)

إن الغرض من هذا الاختبار هو الكشف عن البكتريا القادرة على استهلاك (تخمير) السترات كمصدر للكاربون والأمونيا كمصدر وحيد للنتروجين. إذا أن بعض البكتريا لها القدرة على استخدام السترات كمصدر كاربوني للحصول على الطاقة بغياب الكلوكوز أو اللاكتوز. هذه القدرة تعتمد على وجود أنزيم Citrate permease الذي يقوم بنقل السترات من الوسط إلى داخل الخلايا حيث تكسر جزيئات السترات بأنزيمات داخل الخلايا للاستفادة من الكاربون كمصدر وحيد للطاقة. ينتج عن هذه العملية ثاني أوكسيد الكاربون الذي يتفاعل مع الصوديوم والماء ليعطي كاربونات الصوديوم القاعدية، وبذلك ترتفع درجة الأس الهيدروجيني للوسط مما يؤدي إلى تغير لون الكاشف (الموجود ضمن مكونات الوسط) Bromothymol blue من الأخضر إلى الأزرق.

إن الوسط المستخدم لهذا الاختبار هو وسط Simmons Citrate Agar وهو وسط صلب مائل يحتوي على الكاشف ضمن مكوناته وهو (Bromothymol Blue Indicator) الذي يكون لونه أخضراً في الوسط المتعادل، وأزرقاً في الوسط القاعدي، وأصفراً في الوسط الحامضي.



المادة	الكمية
كلوريد الصوديوم NaCl	5 غم
سلفات المغنيسيوم $MgSO_4$	2 غم
فوسفات الأمونيوم $NH_4H_2PO_4$	1 غم
فوسفات البوتاسيوم KH_2PO_4	1 غم
سترات الصوديوم $Na_3C_6H_5O_72H_2O$	5 غم
أكار agar	20 غم
كاشف %0.2 Bromothymol blue	40 مل
ماء مقطر distilled water	1000 مل

فالنتيجة الموجبة لهذا الفحص هو تحول لون الوسط من الأخضر إلى الأزرق كما في بكتريا *Enterobacter aerogenes*، أما النتيجة السالبة فهي بقاء لون الوسط أخضراً كما بكتريا *Escherichia coli*.

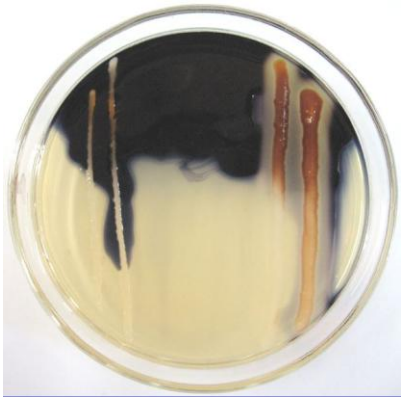
5. اختبار تحلل النشا

يعد النشا من السكريات المتعددة ويبدو كبوليمر متفرع من سكر الكلوكوز البسيط، وإن بعض أنواع البكتريا قادرة على استخدام النشا كمصدر للكاربوهيدرات، ولكن من أجل القيام بذلك يجب عليها أولاً تحليل النشا وتحطيمه حتى يدخل الخلية. حيث تفرز هذه البكتريا أنزيم خارجي (أنزيم Amylase) يحلل النشا عن طريق كسر الروابط بين جزيئات الكلوكوز. وبعد تحطم النشا وتحويله إلى جزيئات الكلوكوز يمكن لهذه الجزيئات أن تدخل إلى داخل الخلية البكتيرية لاستخدامها في عملية التمثيل الغذائي.

تنقل مستعمرة من البكتريا المراد فحصها بواسطة الـــــ (Loop) لتلقح في الوسط المستخدم في هذا الاختبار وهو وسط أكار النشا (Starch agar) وتحضن لمدة 48 ســـاعة بدرجة حرارة 37°م، وبعد الحضـــن يغمر الطبق بمحلول اليود لمعرفة ما إذا كان الن شا لا يزال في الو سط أم تم تحليله بو ساطة أنزيم الأميليز الذي تفرزه بعض أنواع البكتريا. إن آلية هذا الاختبار تعتمد على تفاعل اليود الذي يضاف بعد الحضن مع النشا (إن وجد).

ينتج عن عملية تحلل الن شا سكر الدكسترين (سكر متعدد) و سكر المالتوز (سكر ثنائي)، و سكر الكلوكوز (سكر أحادي)، وهذه النواتج لا تتفاعل مع اليود لذلك يكون لون الو سط بنياً وهو لون كا شف اليود (النتيجة موجبة) ومثالها بكتريا *Bacillus subtilis*، أما إذا ظهر الو سط باللون الأزرق بعد إضافة كا شف اليود فهذا يعني أن اليود قد تفاعل مع النشـــا الذي لم تســـتطع البكتريا تحطيمه لعدم إفرازها لأنزيم الأميليز (النتيجة سالبة) ومثالها بكتريا *E.coli* و *Klebsiella*.

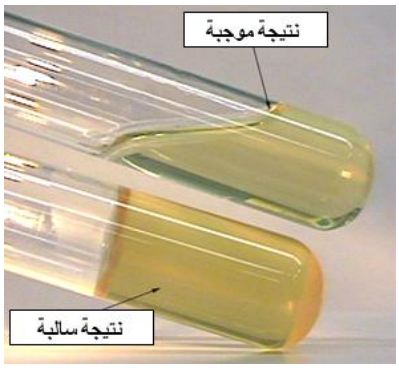
إن الـ صورة المو ضحة أدناه تعطي ثلاثة احتمالات لنتائج الاختبار حـ سب الألوان الظاهرة في الوســـط، فالمنطقة الملونة باللون البني من الطبق تعني أن النتيجة موجبة وأن تحلل النشـــا قد حصـــل بالكامل، أما المنطقة الملونة باللون الأزرق فتعني أن النتيجة ســـالبة وأن النشـــا لم يتحلل نهائياً، في حين أن المنطقة الملونة باللون القهوائي من الطبق فتعني أنه قد حصل تحلل جزئي للنشا.



6. الكشف عن إنتاج الأنزيم المحلل للجيلاتين (Gelatinase)

إن الجيلاتين هو بروتين ناتج عن التحلل الجزئي للكولاجين (وذلك بغلي الكولاجين الذي يعد المكون الرئيسي للأنسجة الرابطة والأوتار) في الماء فيتحول إلى خليط ذائب من الببتيدات المتعدة (الجيلاتين). عند تحلل البروتين بواسطة أنزيم Gelatinase إلى الأحماض الأمينية فإنه بذلك يفقد خاصيته الغروية، أي يتحول إلى السيولة ويبقى بهذا الشكل حتى بعد التبريد. وإن الأحماض الأمينية الناتجة تستخدم من قبل بعض أنواع البكتريا كمادة غذائية.

إن الوسط الزرعي المستخدم في هذا الاختبار هو وسط الجيلاتين Gelatin medium الذي يصب في أنابيب. فبعد تلقيح الأنابيب الحاوية على وسط الجيلاتين بالبكتريا المراد فحصها تحضن بدرجة حرارة 35°م لمدة 24–48 ساعة، ثم توضع في الثلاجة لمدة نصف ساعة، حيث تمسك الأنابيب بشكل مائل وبحذر شديد وتتم ملاحظة قوام الوسط في الأنابيب، فإذا كان الوسط سائلاً فهذا يعني أن الجيلاتين قد تحلل وأن النتيجة موجبة، أما إذا بقي الوسط صلباً فهذا يدل على أن الجيلاتين لم يتحلل وأن النتيجة سالبة. ومن الأمثلة على البكتريا الموجبة لاختبار تحلل الجيلاتين هي بكتريا *Corynebacterium*، أما مثال البكتريا السالبة لهذا الاختبار هي بكتريا *Escherichia coli*.



يجب الانتباه في هذا الاختبار إلى عدم رج محتويات أنبوبة الاختبار وخاصة عندما يكون الوسط سائلاً وذلك لأن التميع وتحلل الجيلاتين يحدث ببطء من الأعلى إلى الأسفل ومن الممكن أن يحدث الامتزاج مع الأجزاء غير المتحللة مما يؤدي إلى تصلب الوسط بعد وضعه في التبريد بالثلاجة فيعطي بذلك نتيجة سالبة خاطئة.