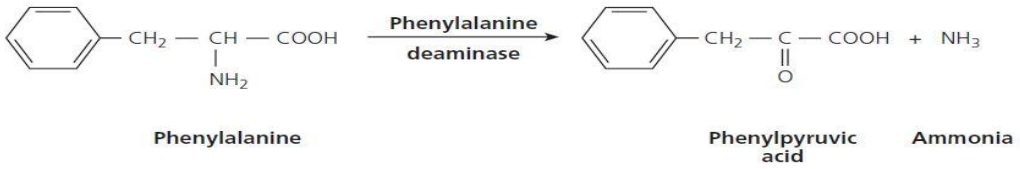
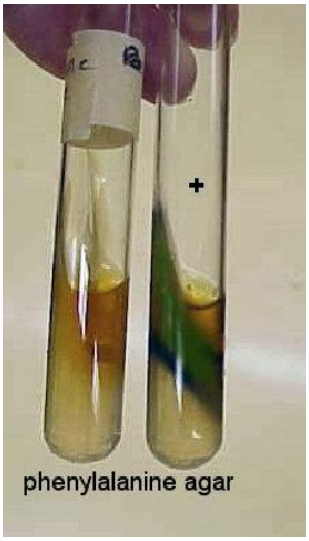
7. اختبار انتزاع مجموعة الأمين من الحامض الأميني الفينيل النين (Phenylalanine Deamination)

وهو اختبار يجرى للتحري عن البكتريا المنتجة لأنزيم Phenylalanine Deaminase الذي يزيل مجموعة الأمين من الحامض الأميني Phenylalanine. تكمن أهمية هذا الاختبار في أن هناك ثلاثة أجناس من عائلة البكتريا المعوية منتجة لهذا الأنزيم وهي *Proteus, Morganella, Providencia*، حيث يستخدم هذا الاختبار لتسهيل تشخيص هذه الأجناس وتمييزها عن بقية أجناس البكتريا المعوية. فعند إزالة مجموعة الأمين من الحامض الأميني Phenylalanine ينتج عن هذا التفاعل حامض phenylpyruvic acid والأمونيا.



يتم الكشف عن وجود هذا الحامض عن طريق تلقيح وسط phenylalanine agar المائل (slant) بالبكتريا المراد فحصها والحضن لمدة 18–24 ساعة في درجة حرارة 35° مئوي. وبعد الحضن تتم إضافة 4–5 قطرات من محلول كلوريد الحديديك (10%). إن تغير لون الوسط إلى الأخضر يدل على أن البكتريا قامت بانتزاع مجموعة الأمين من الحامض الأميني phenylalanine وأنتجت حامض phenylpyrovic acid (النتيجة موجبة)، في المقابل فإن الوسط لا يتغير لونه في حالة عدم انتزاع مجموعة الأمين وعدم تكون حامض phenylpyrovic acid (النتيجة سالبة).



8. اختبار تخمر السكريات (Sugar fermentation)

يعد هذا الاختبار من الاختبارات المهمة في تشـــخيص وتمييز الأنواع المختلفة من البكتريا. يعرف التخمر بأنه عبارة عن تفاعلات كيموحيوية في ظروف لا هوائية ينتج عنها طاقة. وإن قدرة البكتريا على تخمير السكريات ونوع المركبات الناتجة عن هذه العملية مفيد جداً في تشخيص البكتريا.

تستخدم الجراثيم الكاربوهيدرات كمصدر رئيسي للطاقة والمتمثلة بأنواع السكريات التي قد تكون أحادية أو ثنائية أو ثلاثية أو متعددة. حيث هناك العديد من الجراثيم التي لها القابلية على تخمير مجموعة واسعة من السكريات سابقة الذكر، بينما هناك جراثيم أخرى لا تستطيع أن تخمر إلا عدداً قليلاً من السكريات. وهذا الاختلاف في مجاميع الســـكريات التي يمكن أن تخمرها الأحياء المجهرية تعتبر أداة لتصـــنيف وتشـــخيص تلك الجراثيم من خلال معرفة أنواع الســـكريات التي تستهلكها. فضلاً عن اختلاف طريقة تحطيم السكريات من قبل الأحياء المجهرية. فاختلاف طريقة استهلاك السكريات يؤدي إلى اختلاف النواتج، فيمكن أن تكون النواتج الشائعة لتحطم السكريات هي الأحماض العضوية مثل حامض اللبنيك (lactic acid) وحامض الخليك (acetic acid) وحامض البيوتريك (butyric acid) وحامض البروبيونيك (propionic acid). أو يمكن أن تكون النواتج مركبات متعادلة مثل الأسيتون وكحول الأثيل. كما يمكن أن تكون النواتج غازات متنوعة مثل الهيدروجين وثاني أوكسيد الكاربون والميثان.

إن اســـتهلاك أي نوع من الســـكريات يتطلب مجموعة من الأنزيمات، إما خارجية أو داخلية. وكلا النوعين يعملان معاً حسب نوع السكريات المتواجدة في الوسط، فالسكريات الأحادية قادرة على الانتشار عبر غشاء الخلية دون الحاجة إلى عمل الأنزيمات الخارجية، أما الســـكريات الثنائية والمتعددة فتتطلب أنزيمات

خارجية لتكسيرها إلى وحدات أصغر أو أنزيمات قادرة على نقلها عبر الغشاء إلى داخل الخلية (permeases)، وبعد دخولها إلى داخل الخلية تتعرض إلى أنزيمات داخلية تحولها إلى وحدات أصغر.

بعض أنواع السكريات التي تخمرها الأحياء المجهرية

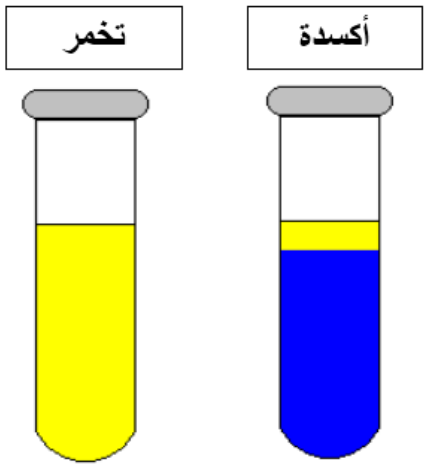
سكريات أحادية	سكريات ثنائية	سكريات ثلاثية	سكريات متعددة
كلوكوز	مالتوز	رافينوز	النشا
فركتوز	سكروز	ملي زايتوز	انيولين
كلاكتوز	لاكتوز		دكسترين
سوربيتول	سيلوبايوز		كلايكوجين
ارابينوز	ميليبايوز		اسكولين
مانيتول			سليلوز
رامينوز			سالستين

إن الأحياء المجهرية التي تستخدم المركبات العضوية كمصدر للطاقة قد تلجأ إلى واحد من طريقين:

1. التنفس Respiration: وهي عملية استهلاك كلي (أكسدة) للمصدر العضوي (الكاربون) ينتج عنها الماء وثاني أوكسيد الكاربون، وتتم تحت ظروف هوائية.
2. التخمر Fermentation: وهي عملية تخمر جزئي للمصدر العضوي لا تحتاج إلى الأوكسجين (لا هوائية)، وتتباين النواتج النهائية حسب نوع البكتريا، إذ تنتج حوامض وكحولات والديهايدات وغازات مختلفة، مثل ثاني أوكسيد الكاربون والهيدروجين والميثان. إن السكريات وخاصة سكر الكلوكوز هي من المركبات الأكثر شيوعاً في استخدامها من قبل الأحياء

المجهرية المخمرة، فضـــلاً عن مواد أخرى مثل الأحماض العضـــوية والأحماض الأمينية وغيرها.

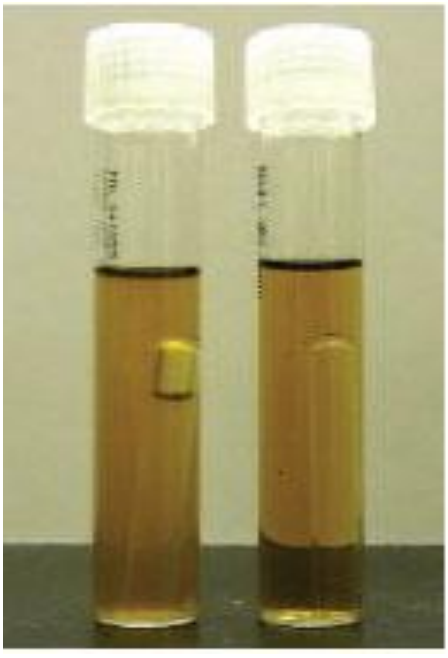
إن الفرق بين الأكســـدة والتخمر يمكن معرفته من خلال تلون الجزء العلوي من الو سط فقط، أو تلون كل الو سط باللون الأ صفر (في حالة كا شف المذ يل الأحمر)، فبعض الأحـ ياء المجهر ية مـ ثل *Pseudomonas* لا تخمر السكريات ولكن تستعملها بطريقة الأكسدة. وبما أن تكوين الحامض من تحطيم السكريات سيحدث فقط تحت الظروف الهوائية (على اعتبار أن عملية الأكسدة تحتاج إلى غاز الأوكســـجين) لذلك فإن تكوين الحامض في هذه الأنواع من الأحياء المجهرية المؤكســـدة يحدث فقط في الجزء العلوي أو الســـطحي من الأكار أو المرق المغذي (بشرط عدم مزج مكونات الوسط نتيجة رج الأنبوب). أما الجراثيم التي تستهلك السكريات بطريقة التخمر فنلاحظ تغير الوسط بأكمله إلى اللون الأصفر.

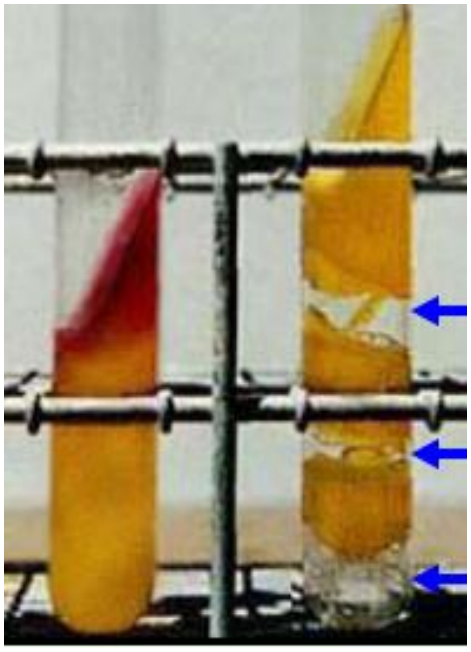


تـ ستعمل طريقة الحقن بالطعن (stab) في الو سط الـ صلب لمعرفة طبيعة الجرثومة من حيث طريقة ا ستهلاكها لل سكريات حيث أن الجراثيم المخمرة تحول

لون الوســـط (على طول خط الطعن) إلى اللون الأصـــفر، في حين أن الجراثيم المؤكسدة تحدث التغير إلى اللون الأصفر فقط في الجزء العلوي.

إن الأحماض الناتجة من تخمر الســـكريات يمكن الكشـــف عنها من خلال استعمال كواشف الأس الهيدروجيني (pH indicator) والتي تضاف إلى الوسط الذي تتم فيه تنمية الجراثيم. من جهة أخرى يمكن الكشـــف عن تخمر بعض السكريات من خلال ملاحظة إنتاجها للغازات، فإنتاج الغاز في الوسط الصلب يكون مصـــحوباً بتكوين جيوب غازية تظهر على شـــكل تحطم في طبقة الأكار المتكاملة، أما إنتاج الغاز في الأوساط السائلة فيمكن الكشف عنه بسهولة من خلال استخدام أنبوبة صغيرة تدعى بأنبوبة درهم (Durham tube) توضع بشكل مقلوب في الوسط السائل، فنتيجة الفحص الموجب لإنتاج الغاز هو تكون فقاعة غازية تلاحظ داخل الأنبوبة نتيجة لإزاحة الســـائل بواســـطة الغاز المنتج من قبل البكتريا النامية في الوســـط، بينما تكون نتيجة الفحص الســـالب عدم تكون فقاعة الغاز في الأنبوبة.





تتلخص طريقة العمل في تحضير أو ساط زرعية سائلة تحتوي على نوع واحد من السكريات مثل الكلوكوز (سكر أحادي)، أو السكروز والمالتوز واللاكتوز (سكر ثنائي)، أو الدشا والكلايكوجين (سكر متعدد). كما يجب أن يحتوي الوسط على واحد من الكواشف مثل المثيل الأحمر للكشف عن تخمر السكر، حيث يكون لون هذا الكاشف أصفراً في الوسط الحامضي، وأحمراً في الوسط المتعادل ووردياً في الوسط القاعدي. أما في حالة الكشف عن إنتاج الغازات فتوضع أنابيب درهم Durham tube بشكل مقلوب في الأوساط السائلة قبل التعقيم، وهي أنابيب تعمل على حصر الغازات الناتجة عن التخمر. يحضر الوسط وتوضع أنابيب درهم فيه ثم يعقم بالمؤصدة ويبرد إلى درجات حرارة لا يتصلب فيها قبل إضافة السكر المراد فحصه والذي يعقم بطريقة الترشيح. بعدها يتم تلقيح البكتريا وحضنها لمدة 24 ساعة بدرجة حرارة 37° مئوي. حيث تتم ملاحظة ظهور فقاعات من الغاز في أنابيب درهم (النتيجة موجبة)، أو عدم ظهور الفقاعات (النتيجة سالبة). ويجب الانتباه إلى أن السكريات تتحطم بالتعقيم باستخدام المؤصدة (Autoclave) لذا يجب أن تعقم السكريات بالترشيح أولاً ومن ثم تضاف إلى الوسط بعد تعقيمه بالمؤصدة وتبريده.

تقدير كفاءة المطهرات

بدأ استخدام المواد الكيميائية في السيطرة على نمو الأحياء المجهرية منذ بداية عام 1800 حيث تم استخدام محاليل اليود لمعالجة الجروح واليدين قبل الجراحة. أما اليوم فقد تم تصنيع الآلاف من المطهرات المضادة لنمو الأحياء المجهرية يستخدم بعض منها لأغراض صحية في المنازل والمستشفيات والتي قد تكون غازية أو سائلة أو حتى بشكل صلب.

هناك بعض المواصـــفات التي يجب توفرها عند إيجاد المادة الكيميائية المناسبة وهي:

1. ذات كفاءة عالية حتى في التراكيز القليلة.
2. قابليتها على الذوبان في الماء والكحول، وثباتها في المحاليل لفترات زمنية طويلة.
3. قدرتها على القضاء على مدى واسع من الأحياء المجهرية دون أن تؤثر على الأنسجة الحية.
4. لا تتأثر فاعليتها بوجود مواد عضوية.
5. لا تسبب تآكل أو تصبيغ الأسطح.
6. غير مكلفة ويمكن الحصول عليها بسهولة.

بصـــورة عامة هناك ثلاثة مســـتويات للمواد القاتلة للجراثيم اعتماداً على الأحياء المجهرية:

1. القوية: (مثل الفورمالديهايد) وهي التي تقتل السبورات إذا استخدمت بشكل صحيح حيث أنها تقتل كل أنواع الحياة (التعقيم) بالنسبة للأحياء المجهرية، وهذا النوع ضروري في تعقيم الأجهزة والمواد الطبية والأنسجة التي لا تعقم بالحرارة.
2. المتوسطة: التي تقتل السبورات الفطرية وبعض البكتريا الممرضة مثل عصيات السل والفايروسات.
3. المطهرات الضـــعيفة: تقتل فقط البكتريا والفطريات الخضـــرية وبعض الفايروسات.

من الطرائق الشائعة لتقييم كفاءة المطهرات:

1. Phenol coefficient: حيث اعتمدت هذه الطريقة لسنوات طويلة في لمقارنة كفاءة مطهر ما مع الفينول.
2. طريقة أوراق الترشيح: وهذه الطريقة يمكن فيها تقييم المطهر من خلال تشبيع أقراص أوراق الترشيح بالمطهر وملاحظة ظهور منطقة التثبيط حول القرص الحاوي على المادة الكيميائية المطهرة.
3. طريقة استعمال التخافيف: تستخدم هذه الطريقة كبديل للطريقة الأولى للمطهرات التي تختلف كلياً عن الفينول والتي لا يمكن تطبيقها في الطريقة الأولى مثل اليود أو المنظفات. تتلخص طريقة العمل في و ضع دبابيس في أنبوبة حاوية على عالق بكتيري لبكتريا *Staphylococcus aureus*، ثم التخلص من العالق البكتيري ووضع الدبابيس في أطباق بتري معقمة تحتوي على ورق تر شيح وتركها لمدة 1–2 ساعة كي تجف، بعدها تلتقط بوساطة ملقط معقم وتوضع في كل مطهر يراد تقييمه ولفترات زمنية مختلفة، ثم التخلص من المطهر ونقل الدبابيس إلى أنبوبة تحتوي على ماء معقم لمدة دقيقة واحد لمعادلة تأثير المطهر. توضع الدبابيس بعد ذلك في وسط زرعي سائل معقم وحضنها لمدة 24–48 ساعة بدرجة حرارة 37º م حيث يتم فحص الأنابيب الخالية من النمو لتحديد المطهر المنا سب والوقت اللازم لقتل البكتريا. تجدر الإشارة إلى أنه يجب عمل أنبوبة سيطرة لمقارنة النمو وذ لك بن قل أ حد ا لد بابيس من الـ عالق البكتر يا لبكتر يا *Staphylococcus aureus* إلى وسط سائل معقم دون (دون معاملتها بالمطهر).