كلية : التربية الاساسية – حديثة

القسم او الفرع : العلوم العامة فرع الاحياء

المرحلة: الثانية

أستاذ المادة : لما دلي ابراهيم

اسم المادة بالغة العربية : احياء مجهرية / الجزء العملي

اسم المادة باللغة الإنكليزية : Microbiology

اسم المحاضرة السادسة باللغة العربية: اختبارات البايوكيمائية

اسم المحاضرة السادسة باللغة الإنكليزية: Biochemical Test

هناك على الأقل سببان لدراسة الخواص الكيموحيوية للبكتريا. الأول، يمكن استخدام الخواص لإثبات التنوع الأيضي الاستثنائي للكائنات بدائية النواة.

السبب الثاني أن الخواص الكيموحيويةً للبكتريا تمثل خواصا مظهرية اضافية phenotypic characteristics

يمكن فحصها بسهولة. وأن حقيقة أن خواص النوع الواحد تحدد وراثيا فإن هذا يجعل من الممكن استعمالها كمؤشرات مظهرية. تكمن الأهمية الطبية significance clinicl لبعض هذه الانزيمات في قابليتها على مهاجمة مواد التفاعل substrates في الأغشية الخلوية، الأنسجة، أو سوائل الجسم المضيف وعليه تتدخل في أليات دفاع المضيف أو إتزانه homeostasis وفي حالات أخرى تكون الانزيمات مضادات جينية antigenic ويمكن فحص ذلك عن طريق التفاعلات المصلية reactions serological التي تظهر الدليل على التعرض أو الإصابة بتلك البكتريا التي تنتج الانزيمات

، وتعتبر الـ Biochemical tests من أهم الوسائل التي تفرق بين انواع البكتريا بناء على (تفاعلاتها الكيموحيوية) أهم مميزاتها •تقلل الوقت للتعرف عليها •قليلة التكلفة "نوعًا ما" •تضمن دقة التعرف على نوع البكتيريا وتشمل تفاعلات الكاتاليز Catalase test والاوكسيديز oxidaea test واليوريز urease test

1--اختبار الكتالايز Catalase Test

وهو اختبار بايوكيميائي بكتريولوجي يستعمل للتفريق بين انواع البكتريا كالتفريق بين مجموعة بكتريا المكورات العنقودية Staphylococci الموجبة لاختبار الكتاليز و مجموعة بكتريا المكورات المسبحية Streptococci السالبة لاختبار الكتاليز.

ان إنزيم الكتاليز تنتجه بعض الكائنات الحية الدقيقة حيث يقوم وهذا الإنزيم بتحويل بيروكسيد الهيدروجين H2O2إلى الأكسجين والماء تاركآ وراءه فقاعات ناتجة من تحرر الاوكسجين ، كما أن هذا الإنزيم غير موجود في الأنواع الميكروبية اللاهوائية، وبما أن مركب (H2O) سام للخلايا فإن بعض الأنواع البكتيرية تمتاز بإنتاج إنزيم الكتاليز والذي يعمل على اختزال فوق أكسيد الهيدروجين إلى ماء وأكسجين طبقا للمعادلة التالية:

ومن الجدير بالذكر ان مجموعة ال Staphylococcus هي الوحيدة التي تعتبر موجبة لاختبار الكتاليز

طريقة العمل

1- توضع نقطة أو نقطتين من بيروكسيد الهيدروجين بتركيز 3 % على شريحة زجاجية .
2- بواسطة العود الخشبي يؤخذ جزء من المستعمرة المراد اختبارها ووضعها على الشريحة.
3- عند تكوين فقاعات غازية مباشرة فانه دليل على أن الاختبار إيجابي Catalses +ve ، وفي حالة عدم تصاعد فقاعات من غاز الأكسجين تكون النتيجة سلبية لهذا الاختبار Catalase negative .

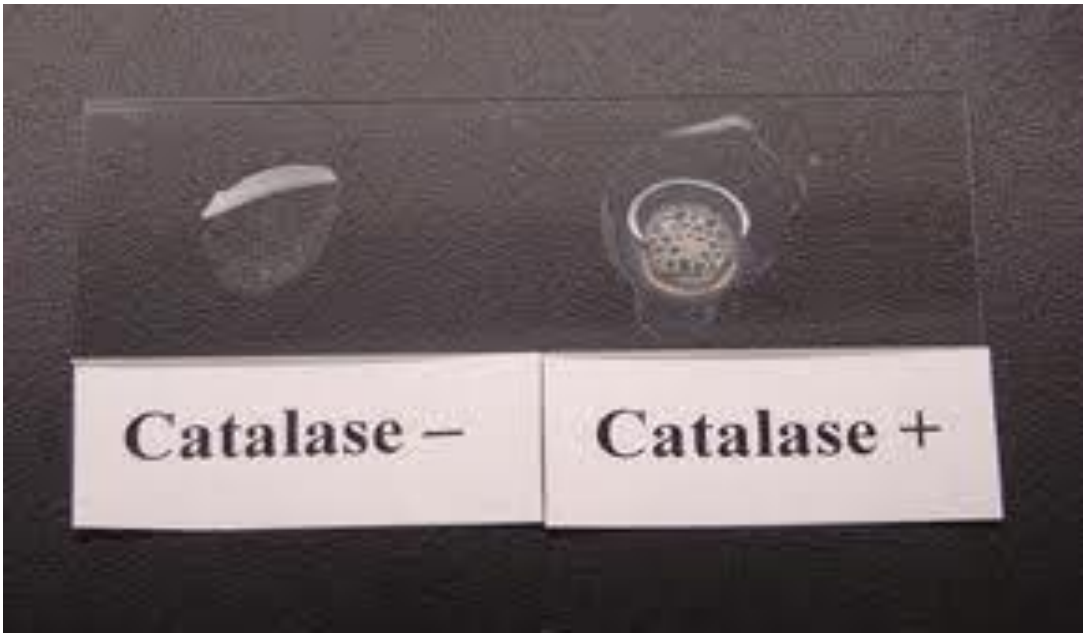
كما يمكن وضع ٢ ملي من محلول بيروكسيد الهيدروجين في أنبوبة اختبار نظيفة ثم ينقل إليها جزء من المستعمرة البكتيرية المراد فحصها ، حيث يتم ملاحظة تكون غاز مباشرة .

ملاحظات هامة عند اجراء هذا الاختبار :

- عدم استعمال اللولب المعدني (Wire loop) في نقل المستعمرة وذلك لتجنب النتيجة الكاذبة حيث يمكن الاستعاضة عنها بالعود الخشبي Wooden applicator.
- عدم التقاط جزء من وسط اكار الدم عند اخذ المستعمرة اثناء الفحص اذ تعطي نتيجة ايجابية للاختبار كون كريات الدم الحمراء تحتوي انزيم الكتاليز ايضا
-

اختبار الكاتاليز Catalase Test :

- قد تتكون أثناء عملية الأكسدة الهوائية مادة الماء الأكسجين hydrogen peroxide
- وبما أن هذه المادة ذات تأثير سام على الخلايا فان البكتيريا الهوائية تقوم بإفراز هذا الإنزيم والذي يعمل على اختزال الماء الأكسجين إلى ماء مع تصاعد غاز الأكسجين الحر.
- بينما البكتيريا اللاهوائية لا تنتج ذلك الإنزيم مما يؤدي لتسممها وعدم نموها عندما تتعرض للهواء الجوي .
- الاختبار يكون موجبا عند ظهور فقاقيع غاز الأكسجين فور إضافة الماء الأكسجين على مستعمرة بكتيرية ومزجها بالمحلول المذكور مستخدما ساق زجاجية



أولا : اختبار الأوكسيديز
Oxidase test

هو احد الاختبارات البايوكيميائية لتشخيص البكتريا التي تمتلك انزيم Cytochrome C oxidase إذ ان بعضها تنتج هذا الانزيم وبعضها لا تنتج هذا الانزيم في السلسلة التنفسية لذلك يستعمل هذا الفحص للتفريق بين مجموعتين وهما Oxidase positive bacteria OX+ve التي تعطي نتيجة موجبة للاختبار عن بكتريا oxidase negative bacteria OX-ve والتي تعطي نتيجة سالبة للاختبار واستعمل هذا الاختبار عام 1928 للتفريق بين بكتيريا *Neisseria gonorrhoeae* (oxidase positive) ذات النتيجة الموجبة عن بكتريا *Staphylococcus* *Streptococcus* spp. ذات النتيجة السالبة.

آلية عمل اختبار الاوكسيديز

يجرى هذا الاختبار على ورق ترشيح مضاف اليه مادة كاشفة تسمى بـ **Tetramethyl-p-phenylenediamine dihydrochloride** ويرمز لها (TMPD) او مادة ***N,N*-dimethyl-*p*-phenylenediamine** ويرمز لها (DMPD) حيث تتحول الى لون **بنفسجي** عند النتيجة الموجبة, وعند عدم تغير اللون فان النتيجة تعتبر سالبة وكما في الشكل رقم 1ادناه

طريقة العمل

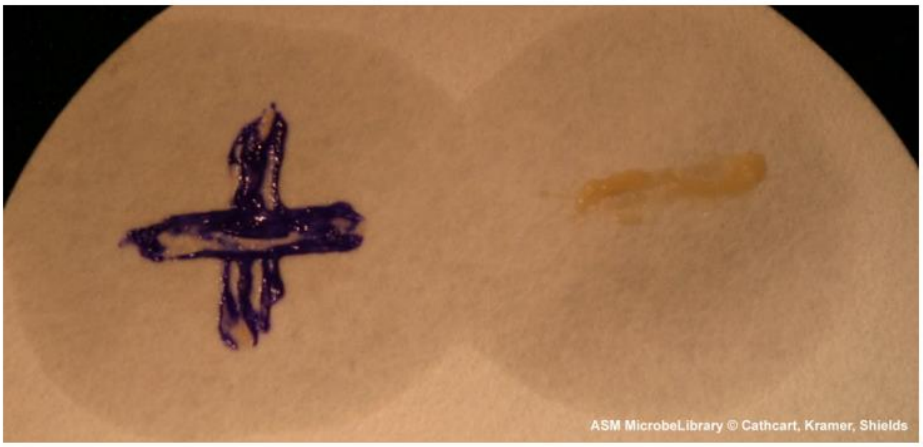
1- ترطيب ورق الترشيح بقطرات من كاشف الاوكسيديز .
2- مباشرة يتم نقل حملة لوب من المزرعة البكتيرية النشطة وتوضع على ورق الترشيح حيث يوجد الكاشف.
3- نلاحظ تغير اللون خلال 3 دقائق اذ ان تغير لون الورقة الى اللون البنفسجي تعني ان النتيجة موجبة لفحص الاوكسيديز وبعكس ذلك تكون النتيجة سالبة وكما في الشكل (1) .

ملاحظات هامة :

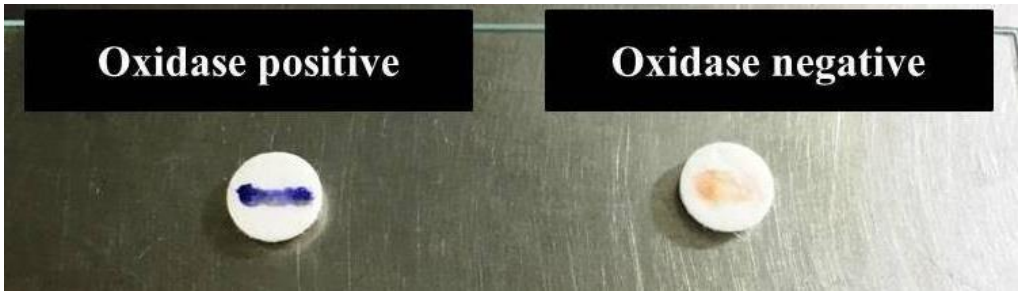
- هناك اقراص من الورق جاهزة محملة بالكاشف TMPD فبهذه الحالة يحتاج ترطيب القرص بالماء المقطر النقي والمعقم وبعدها يتم مزج العينة بواسطة اللوب مع القرص ونلاحظ تغير اللون, و كما في الشكل (2).
- كما بإمكان اضافة قطرات من الكاشف على المستعمرات النامية على وسط Trypticase soy agar (TSA) ونلاحظ تغير لون المستعمرات الى اللون البنفسجي الداكن للبكتريا موجبة لفحص ألأوكسيديز.

ايضا يمكن اجراء الاختبار من خلال اضافة قطرات الكاشف الى العالق البكتيري في المزارع السائلة وملاحظة تغير اللون.

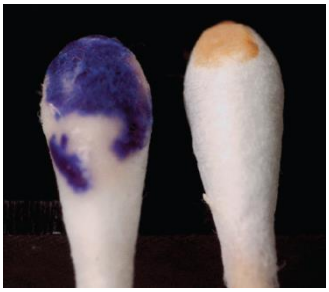
- يفضل استعمال عود الخشب Toothpick بدلا من اللوب السلكي لتجنب اي نتيجة سلبية .
- التأكد من صلاحية المواد المستعملة لتجنب اي نتيجة سلبية .



شكل رقم (1) اختبار الاوكسيديز على ورق الترشيح



اختبار الاوكسيديز على اقراص جاهزة مغمورة بكاشف DMPD



كما بإمكان تسهيل الاختبار من خلال **ترطيب المسحة القطنية** بالكاشف ومن ثم ملامسة سطح المستعمرة وبعدها ملاحظة النتيجة الموجبة كما في الشكل اعلاه.

ثالثاً : اختبار اليورييز

Urease test

هو احد الاختبارات البايوكيميائية يستخدم للكشف عن الانواع البكتيرية التي تنتج هذا الانزيم المسؤول عن التحلل المائي لليوريا Hydrolysis of Urea الى الامونيا وثاني اوكسيد الكاربون .

ومن اشهر الاجناس البكتيرية المنتجة لها الانزيم بكتيريا Proteus الشائعة الانتشار في اصابات القناة البولية للإنسان UTI حيث يمكن تفريقها عن بقية اجناس العائلة المعوية Enterobacteriaceae كال E.coli والسالمونيلا من خلال هذا الاختبار .

هذا الأنزيم ايضا تنتجه بكتريا Helicobacter pylori المسببة لقرحة المعدة بفعل هذا الانزيم.

تشخيص البكتيريا المنتجة لأنزيم اليورييز:

1- يتم التشخيص من خلال زرع البكتيريا على وسط اكار اليوريا الحاوي على نسبة 2% من اليوريا بالإضافة الى كاشف Phenol red كدليل على افراز الانزيم .

2- بالنسبة لبكتريا Proteus يوجد وسط زرعي خاص يدعى Christensen's media ويتم الاختبار وفق الخطوات التالية

- تحضير الوسط حسب تعليمات الشركة المجهزة في انابيب اختبار حيث يصب بشكل اكار مائل.
- يتم تلقيح سط الوسط بعينة البكتيريا وتحضن بدرجة حرارة 37 لمدة 18 – 24 ساعة مع مراقبة التغير اللوني خلال ال6 ساعات الاولى .
- النتيجة الموجبة تكون على شكل تغير لون الوسط من الاصفر الى اللون الوردي , عدم تغير لون الوسط تعني ان النتيجة سالبة و كما في النتيجة ادناه.

<u>ملاحظات هامة:</u>

بكتيريا proteus و ,Morganella morganiiو Providencia stuartii تعطي نتيجة موجبة اسرع من غيرها من الاجناس خلال 6 ساعات من الحضانة بينما بقية اجناس العائلة المعوية مثل Klebsiella و Enterobacter تعطي نتيجة ايجابية متأخرة بعد 6 ساعات .

المصادر/ الكتاب العلمي للاحياء المجهرية /رمضن الحديثي_ عمـــان : دار زهران للنشر،عامن، 2.