الجمهورية العربية السورية
وزارة التعليم العالي
جامعة حماة
كلية الزراعة

علم الأحياء الدقيقة

(الجزء العملي)

الجلسة العملية العاشرة

إعداد

الدكتور عبد الواحد الطحلي

دكتوراه باختصاص الأحياء الدقيقة

جامعة حماة 2020 – 2021

الاختبارات الحيوية الكيميائية لتحديد هوية الجراثيم

Biochemical Tests For Identification Bacteria Species

تقوم الجراثيم بكثير من الأفعال الاستقلابية الحيوية بمساعدة عدد من الأنزيمات الخاصة فيها لذلك استُخدمت الخصائص الاستقلابية حسب النوع الجرثومي للتمييز بين الأنواع الجرثومية. إنّ الصفات الشكلية للمستعمرات الجرثومية المدروسة تقودنا إلى معرفة الجنس الجرثومي فقط، أما المعرفة الدقيقة على مستوى النوع الجرثومي فتحتاج إلى معرفة الصفات الفيزيولوجية أو الحيوية الكيميائية للجراثيم حيث تعدُّ الخصائص الحيوية الكيميائية مهمة جداً في تحديد هوية الجراثيم على مستوى الجنس والنوع الجرثومي، وهناك اختبارات مهمة لمجموعة جرثومية دون الأخرى.

أولاً- اختبارات استقلاب السكريات:

أ- اختبار تخمر السكريات بالجراثيم (التخمر الكحولي):

تستخدم الجراثيم السكريات كمصدر لإنتاج الطاقة اللازمة لأفعالها الحيوية الضرورية لحياتها، وتقوم الجراثيم بعملية التخمر Fermentation تحت تأثير الظروف اللاهوائية Anaerobies منتجة معقدات نهائية كالحموض أو الكحولات أو الألدهيدات، أما في الظروف الهوائية Aerobies فتتم أكسدة السكريات بالأكسجين الجزيئي ليتشكل الماء وغاز CO_2، وفي حالة التفاعل غير الكامل نحصل على مركبات وسطية من الحموض بكميات قليلة. يُعدّ هذا الاختبار من الاختبارات المهمة في التعرف على الأنواع الجرثومية المختلفة، إذ لا تقتصر نتائجه على التمييز بين جراثيم تخمر السكاكر وأخرى لا تخمرها، وإنما نستطيع بوساطته التمييز بين الأنواع التي تخمر نوعاً أو أكثر من السكاكر منتجة حمضاً أو غازاً، وبين الأنواع التي تخمر السكاكر نفسها منتجة حمضاً فقط دون الغاز، وعادة يكون الغاز المنتج هو CO_2 و H_2. لإجراء الاختبار نكتفي بزراعة الجراثيم على وسط سائل هو الماء الهضموني (مرق اللحم Pepton Broth) المضاف إليه أحد أنواع السكاكر بنسبة 0.5–1% أو أكثر بحيث لا يتجاوز تركيز السكر النهائي 5% مع إضافة مشعر لوني (مثل أزرق البروموتيمول Blue Bromothymol أو أحمر الفينول) لملاحظة تغير pH في الوسط، فإذا حدث التخمر انخفضت درجة pH بسبب تشكيل الحمض وتغير لون المشعر الموجود، وسوف يصبح لون مشعر أحمر الفينول بلون أصفر عند انخفاض درجة حموضة الوسط إلى أقلّ من pH 6.8،

أو ينقلب إلى اللون الزهري المحمر الغامق عندما ترتفع درجة حموضة الوسط إلى ما فوق pH 7.4 وهو دليل على إنتاج بعض المواد القلوية كمنتجات لعملية هدم واستهلاك البيتون الموجود في الوسط.

إنّ استخدام أنابيب درهام Durham (وهو أنبوب صغير يوضع بداخل أنبوب الاختبار) بشكل منكس أمر ضروري لاختبار انطلاق الغاز فإذا انطلق الغاز فإنه سيتجمع بشكل فقاعة كبيرة أو صغيرة ظاهرة للعين المجردة في أنبوب درهام، ويمكن أحياناً أن يندفع الأنبوب الصغير نحو الأعلى بسبب وجود كمية كبيرة من الغاز، أما إذا كانت الجراثيم تخمر السكريات دون إطلاق غاز فإننا لا نلاحظ أية فقاعات أو تغير في وضع الأنبوب الصغير، أما في حال عدم استقلاب السكر الموجود في الوسط فسوف تبقى درجة حموضة الوسط معتدلة ولا يتغير لونه وهذا دليل على عدم قدرة الجراثيم لاستهلاك السكر الموجود.

الأدوات والمواد اللازمة:

1- أنابيب اختبار تحوي على وسط الماء الهضموني (المرق المغذي) المضاف إليه السكر المراد دراسته (الغلوكوز أو اللاكتوز أو السكروز أو المالتوز أو الدكسترين ..... الخ) والمشعر مع وضع أنبوب درهام بداخله بالشكل المنكس على أن تكون جميع الأنابيب معقمة مع ما بداخلها.

2- مزارع جرثومية مختلفة بعمر 24- 48 ساعة.

3- إبر تلقيح جرثومية ذات العقدة.

طريقة العمل:

1- اكتب على الأنابيب (اسمك- الفئة – اسم الجراثيم- اسم السكر الموجود).

2- لقح أنابيب الاختبار السابقة بمعدل أنبوبة واحدة من كل نوع من السكاكر بنوع واحد من الجراثيم المدروسة، واترك أنبوبة واحدة شاهداً سلبياً للتجربة.

3- ضع الأنابيب في الحاضنة بدرجة حرارة 37°م لمدة 24- 48 ساعة.

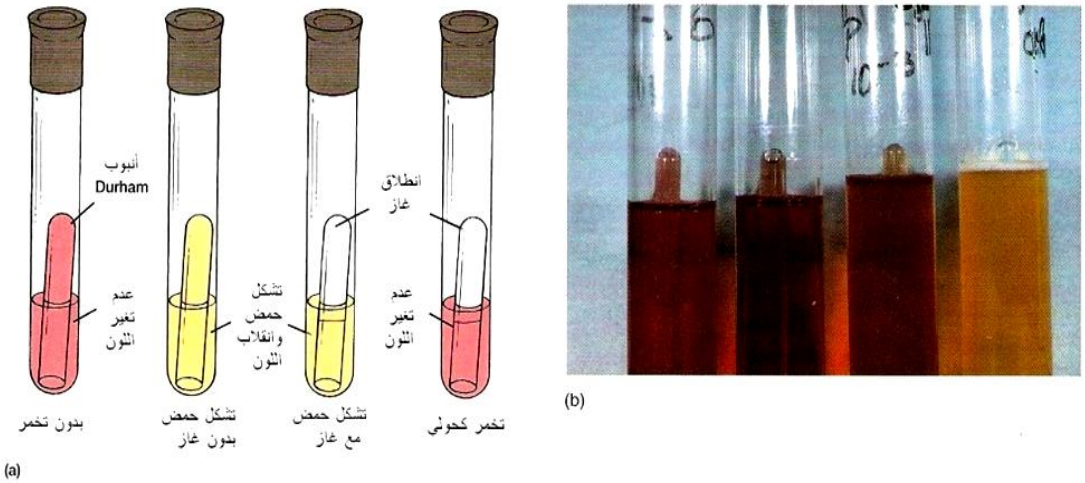
4- اقرأ النتائج بملاحظة تكوين الحمض بتغير لون المشعر (من اللون الأزرق إلى اللون الأصفر في حال استخدام مشعر أزرق البروم تيمول، ومن اللون الأحمر إلى اللون الأصفر في حال استخدام مشعر أحمر الفينول)، أما بقاء اللون على حاله يعني عدم تكوين الحمض ومِنْ ثَمَّ عدم تخمر السكر.

5- لاحظ إنتاج غاز أو عدم إنتاجه من وجود الفقاعات في أنبوبة درهام (الشكل 8-1).

6- دون النتائج كالآتي: (جدول 8-1) ضع إشارة + للاختبار الموجب، وإشارة – للاختبار السالب.

جدول (8-1)

نوع الجراثيم	غلوكوز		لاكتوز		سكاروز		مالتوز		دكسترين	
	حمض	غاز	حمض	غاز	حمض	غاز	حمض	غاز	حمض	غاز
E.Coli										
B.subtilis										
Staphylococcus										



الشكل (8-1) اختمار السكريات

ملاحظة:

في حال عدم توفر أنابيب دورهام يمكن صب طبقة من الفاسبار Vaspar (مزيج متساوي الحجم من الفازلين والبارافين المصهورين معاً) بسماكة $1-1/2$ سم فوق سطح أنابيب الاختبار بعد تلقيحها بالجراثيم ، وتركها حتى تتصلب ثم نحضنها، ونراقب انطلاق الغاز عن طريق انزلاق طبقة الفاسبار إلى الأعلى وتجمع الغاز أسفلها.

- **التخمر الكحولي وتشكيل حمض الخل:**

يتم التخمر الكحولي بغياب الأكسجين وهو عملية لا هوائية تجري صناعياً على المولاس Molass الناتج من صناعة تكرير السكر، وينتج الكحول صناعياً بتخمير السكريات الموجودة في المولاس بوساطة الخميرة، وأهم الخمائر المستخدمة *Saccharomyces cervisiae* (خميرة الخبز).

طريقة العمل:

1- توضع كمية من المولاس في دورق وتخفف بنسبة جزء إلى خمسة أجزاء من الماء، ثم تلقح بالخميرة وتوضع في درجة حرارة 30°م.

2- يراقب الدورق ويغطى عند بدء التفاعل (ظهور فقاعات غازية).

3- عند تحول كامل السكر إلى كحول ينتهي التفاعل ويتوقف خروج فقاعات الغاز.

4- يتم التأكد من رائحة الكحول المتصاعد من الدورق.

5- يحضر غشاء من المزرعة بصبغة غرام ويفحص بالعدسة الزيتية.

- **تشكل حمض الخل:**

ينتج الخل من أكسدة الكحول إلى حمض الخل بوساطة جراثيم تابعة للجنس *Acetobacter* وتظهر على سطح المحلول غشاء أو قشرة، وتتكون من مادة جيلاتينية تضم جراثيم حمض الخل. يُعد تشكل حمض الخل عملية هوائية، بينما التخمر الكحولي عملية لا هوائية.

طريقة العمل:

1- تلقح دوارق الكحول الناتجة من التخمر السابق بجراثيم حمض الخل.

2- تترك الدوارق بدرجة حرارة الغرفة لمدة أسبوع.

3- يمكن معرفة تشكل حمض الخل من رائحته المميزة.

4- يحضر غشاء جرثومي من المزرعة، ويصبغ بغرام ويفحص بالعدسة الزيتية وترسم الجراثيم.

ب- اختبار أحمر الميتيل- فوكس بروسكاوير للبحث عن الأسيتوئين:

يعدُّ اختبار أحمر الميتيل- فوكس بروسكاوير (Voges – Proskauer) للبحث عن الأسيتوئين من الاختبارات المهمة في تمييز العصيات سالبة غرام كالعصيات القولونية، وأيضاً في تمييز أنواع الباسيلوس *Bacillus*، والغاية من هذين الاختبارين هو دراسة طريقة تفكك الغلوكوز بالجراثيم المختلفة حيث تحول بعض هذه الجراثيم المركبات الاستقلابية الانتقالية في عملية تخمر الغلوكوز (مرحلة تخمر حمض الفورميك Fomaric acid) إلى مركبات معتدلة بالإضافة إلى CO_2 عوضاً عن الحموض، ويعدُّ مركب أستيل ميتيل كاربينول (الأسيتوئين) $CH_3 - CO - CHOH - CH_3$ من النواتج المعتدلة التي تنتج عن هذه العملية التي يسهل الكشف عنها بتطبيق اختبار فوكس بروسكاوير. أما اختبار أحمر الميتيل فيكشف عن الجراثيم التي لا تحول النواتج الحمضية إلى نواتج معتدلة، وبالتالي فإن ذلك يؤدي إلى خفض قيمة pH أكثر بكثير منه في حالة الجراثيم المنتجة لمواد معتدلة، ويعتمد مبدأ التفاعل على التعرف على الجراثيم المنتجة للحموض الناتجة عن تفكك سكر الغلوكوز.

المواد والأدوات اللازمة:

- أنابيب اختبار حاوية على وسط كلارك–لوبس Clark–Luis المعقم (أو وسط MR/VP broth) والمكون من ماء هضموني (ببتون) 7 غ/ل، وغلوكوز 5 غ/ل، وفوسفات ثنائية الصوديوم 5 غ/ل، وماء مقطر 1000 مل.
- مزارع جرثومية مختلفة بعمر 24– 48 ساعة.
- إبر تلقيح جرثومية ذات العقدة.
- محلول البوتاس الكاوي 16 % إلى 40 % المحتوي على 0.3 % من الكرياتين.
- محلول ألفا نفتول (محلول كحولي بتركيز 5% أو 6%).
- مشعر أحمر الميتيل.

طريقة العمل:

1- اكتب على الأنابيب (اسمك – الفئة – اسم الجراثيم).

2- لقّح أنابيب الاختبار السابقة بالجراثيم الموجودة أمامك.

3- ضع الأنابيب في الحاضنة بدرجة حرارة 37°م لمدة 5–7 أيام، وبعد فترة الحضن المناسبة اكشف عن مادة الأسيتوئين والحمض وفق ما يلي:

- **اختبار فوكس – بروسكاوير (V.P):** (الشكل 8-2)

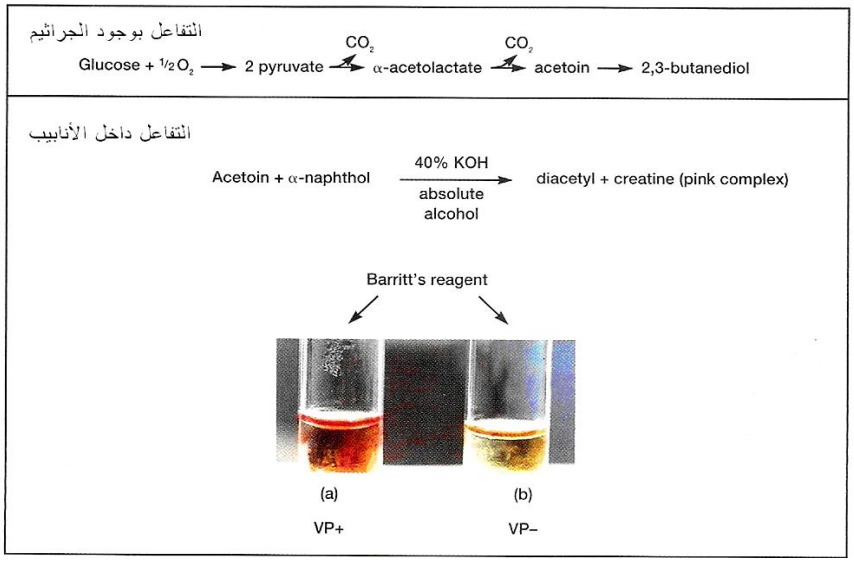
أضف لمزروع الجراثيم نصف مل من محلول البوتاس الكاوي 16% إلى 40% المحتوي على 0.3% من الكرياتين، ثم أضف نصف مل (8 – 10 قطرات) من محلول الفا نفتول حيث يتأكسد الأستيل ميتيل كاربونيل ويتحول إلى دي أسيتيل ميتيل كاربونيل في وسط قلوي من البوتاس ويتفاعل مع الكرياتين ليعطي لوناً أحمرَ بوجود الألفا نفتول دليل الايجابية أي دليل وجود مادة الأسيتوئين، أما في حال عدم تغير اللون فإن التفاعل سلبي أي لا توجد مادة الأسيتوئين.

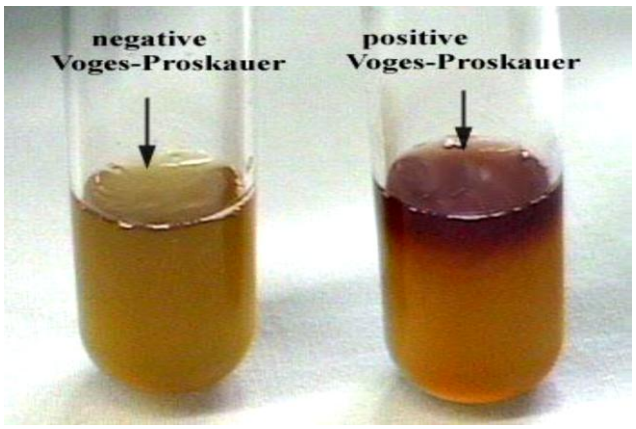
ملاحظة: يجب أن يكون عمر المستعمرة خمسة أيام على الأقل.

- إن ظهور لون أحمر مميزاً خلال خمس دقائق هو دليل إيجابية التفاعل، بينما ظهور لون نحاسي ليس دليلاً على إيجابية التفاعل، وإن ظهور نتيجة التفاعل يحتاج إلى نصف ساعة على الأكثر.

- من الجراثيم إيجابية فوكس–بروسكاوير جراثيم *Klebsiella*.

- من الجراثيم سالبة فوكس–بروسكاوير جراثيم *E. coli*.





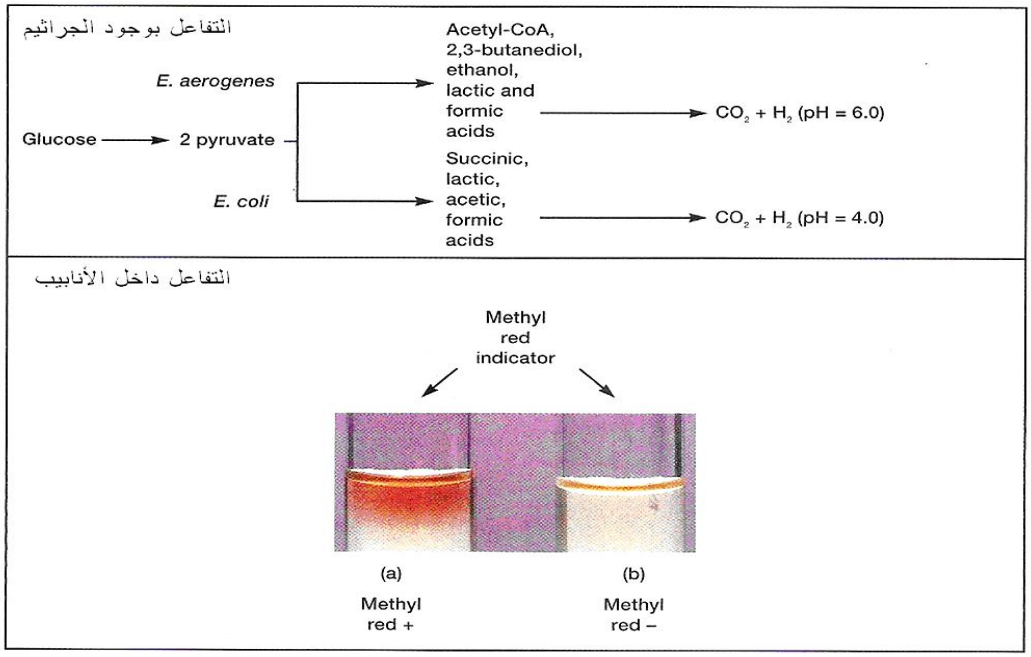
الشكل (8-2): اختبار فوكس–بروسكاوير

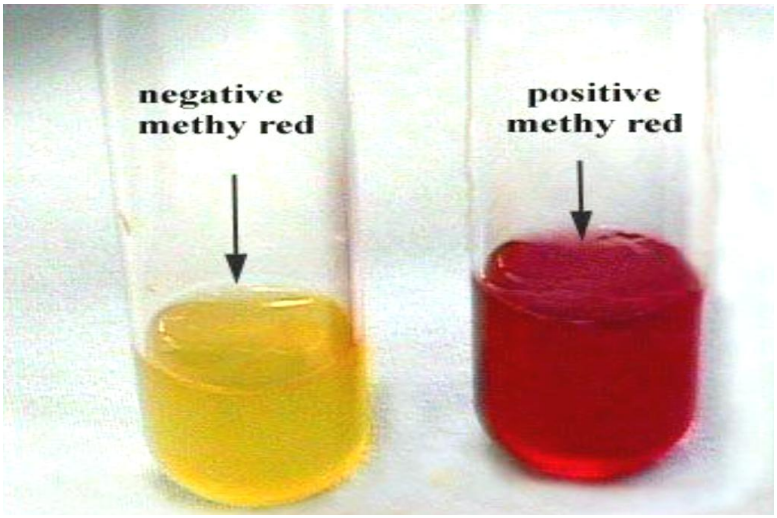
- **اختبار أحمر الميتيل:** (شكل 8-3)

يعتمد مبدأ التفاعل على التعرف على الجراثيم المنتجة للحموض الناتجة عن تفكك سكر الغلوكوز حيث نضيف عدة قطرات من محلول كحولي لأحمر الميتيل إلى الأنابيب المزروعة بالجراثيم المدروسة، ويدل ظهور اللون الأحمر على نتيجة ايجابية أي أن الوسط أصبح حمضياً نتيجة تفكك الغلوكوز (قيمة pH أقل من 4.4)، بينما يدل اللون الأصفر على نتيجة سلبية (pH أعلى من 6).

ملاحظة : يجب أن يكون عمر المستعمرة 48 ساعة على الأقل.

- من الجراثيم إيجابية اختبار أحمر الميتيل جراثيم *E. coli*.
- من الجراثيم سالبة اختبار أحمر الميتيل جراثيم *Klebsiella*.





الشكل (8-3): اختبار أحمر الميتيل

ج – اختبار إنتاج الإندول Indole Test:

يعدُّ اختبار إنتاج الإندول Indole Test أو Benzyl Pyrrole من الاختبارات المهمة لأنّ عدداً قليلاً فقط من الجراثيم يمكنها أن تقوم بذلك، وهو مركب آزوتي نحصل عليه نتيجة تفكيك الجراثيم للحمض الأميني التريبتوفان، ويستعمل هذا الاختبار للتفريق بين العديد من الأنواع الجرثومية خصوصاً المعوية مثل *Escherichia coli* موجبة الإندول عن الجراثيم *Klebsiella*، *Serratia*، *Enterobacter*، *Salmonella* سالبة الإندول.

يمكن إجراء الاختبار بزرع الجراثيم على وسط الماء الهضموني (الماء الببتوني) العادي أو الغني بالتريبتوفان 1%، فإذا كانت الجراثيم تحتوي على إنزيم Tryptophanase سيتم تحطيم التريبتوفان وإنتاج الإندول، وبعد زرع الجراثيم نستطيع الكشف عن الإندول بكاشف يسمى ايرلخ–كوفاكس Ehrlich – Kovacs وهو بارا دي ميتيل أمينوبنز ألدهيد Paradimethylaminobenzaldehde حيث نضع بضع قطرات من الكاشف على الأنبوب المزروع بالجراثيم فنلاحظ حصول حلقة حمراء نوعية دالة على تحرر الإندول على سطح الأنبوب (الشكل 8–4).

ملاحظة: إن إضافة أحد السكريات القابلة للتخمر من قبل الجراثيم يمكن أن يعيق هذا الاختبار لأن سرعة تشكل الحمض اعتباراً من السكريات سيؤدي إلى تثبيط الإنزيمات المحللة للبروتينات.

المواد والأدوات اللازمة:

1– مزارع جرثومية مختلفة بعمر 24–48ساعة.

2– إبر تلقيح جرثومية ذات العقدة.

3–أنابيب اختبار حاوية على وسط الماء الهضموني المعقم.

4– كاشف ايرلخ – كوفاكس Ehrlich – Kovacs (5 غ بارا دي ميتيل أمينو بنز الدهيد، و75 مل كحول أميلي، و25 مل حمض كلور الماء المركز).

طريقة العمل:

1– اكتب على الأنابيب (اسمك – الفئة – اسم الجراثيم).

2– لقّح الأنابيب الموجودة أمامك بالجراثيم المراد اختبارها.

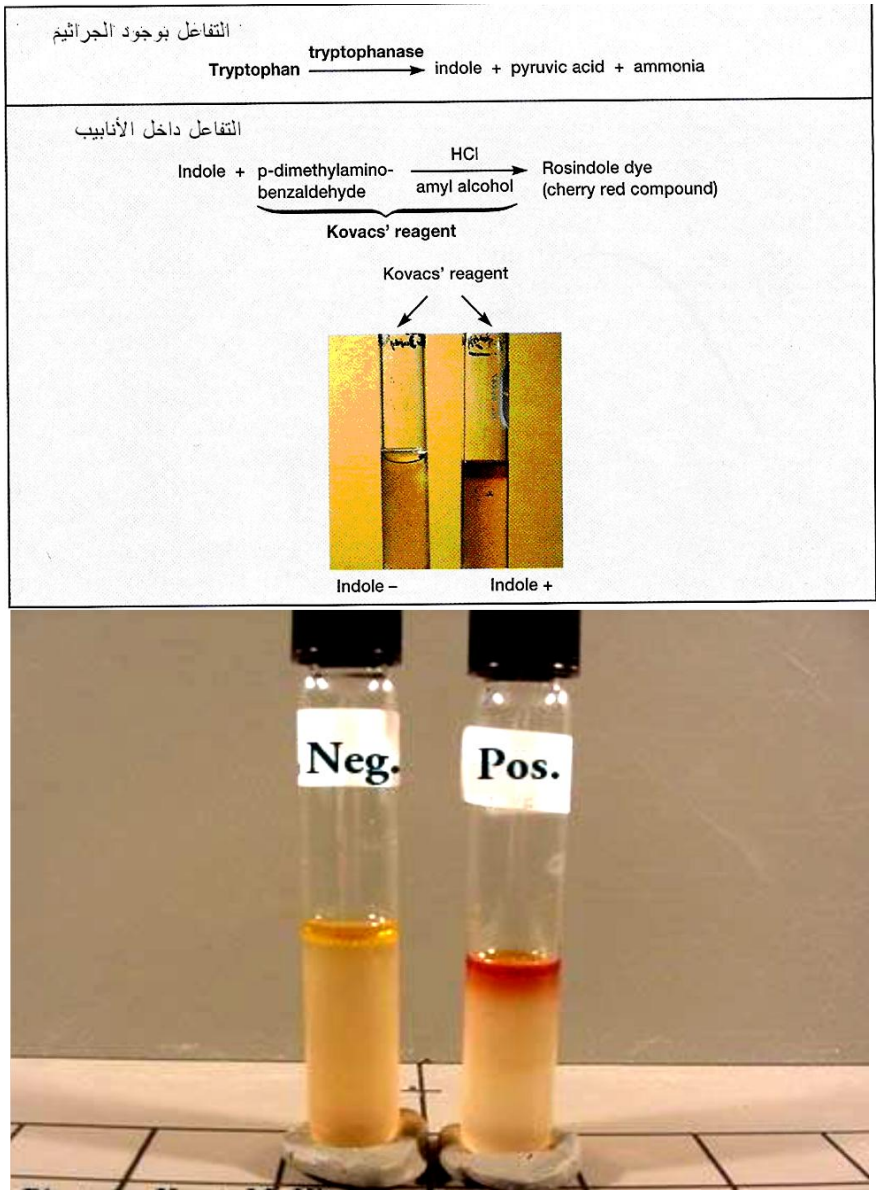
3– ضع الأنابيب في الحاضنة بدرجة حرارة 37°م لمدة 24–48 ساعة.

4– بعد فترة الحضن أخرج الأنابيب من الحاضنة، وضَعْ فوق كل أنبوب قطرة من كاشف كوفاكس.

5– دوّن النتائج.

الجراثيم + الكاشف ----- ظهور حلقة حمراء أعلى الأنبوب = نتيجة موجبة

الجراثيم + الكاشف ----- عدم ظهور حلقة حمراء أعلى الأنبوب = نتيجة سالبة



الشكل (8-4): اختبار إنتاج الإندول

د- اختبار إنتاج غاز كبريت الهيدروجين H_2S:

تقوم بعض الجراثيم بتخريب الحموض الأمينية الكبريتية مثل السيستئين لتحرير غاز H_2S، ومن أمثلة ذلك ما يحدث عند فساد البيض وبعض اللحوم المحفوظة أو المعلبة، وفي حال اللحوم المعلبة عادة يتفاعل الغاز الناتج مع معدن العلبة ليشكل لوناً أسودَ مميزاً. يمكن إيضاح هذه الظاهرة في المزارع الجرثومية المخبرية باستخدام أوساط تحتوي على أملاح معدنية لبعض العناصر مثل البزموت أو الحديد أو الرصاص حيث يتشكل كبريت المعدن كراسب ذو اللون المميز.

مثال: تحت خلات الرصاص يتحول إلى كبريت الرصاص الأسود بعد تفاعله مع غاز H_2S، وكبريتات الحديد تتحول إلى كبريت الحديد الأسود اللون بعد تفاعلها مع H_2S. لتحقيق الاختبار هناك عدة أوساط تفي بالغرض يمكن استخدامها ومنها وسط S . S، ويمكن إجراء الاختبار بوضع شريط من ورق النشاف المشبع بتحت خلات الرصاص في أعلى أنبوب الاختبار ففي حال عدم إطلاق غاز H_2S يبقى لون الشريط على حاله، وفي حال إطلاق الغاز يتلون الشريط بالأسود.

طريقة العمل:

1- اكتب على الأطباق (اسمك – الفئة – اسم الجراثيم).

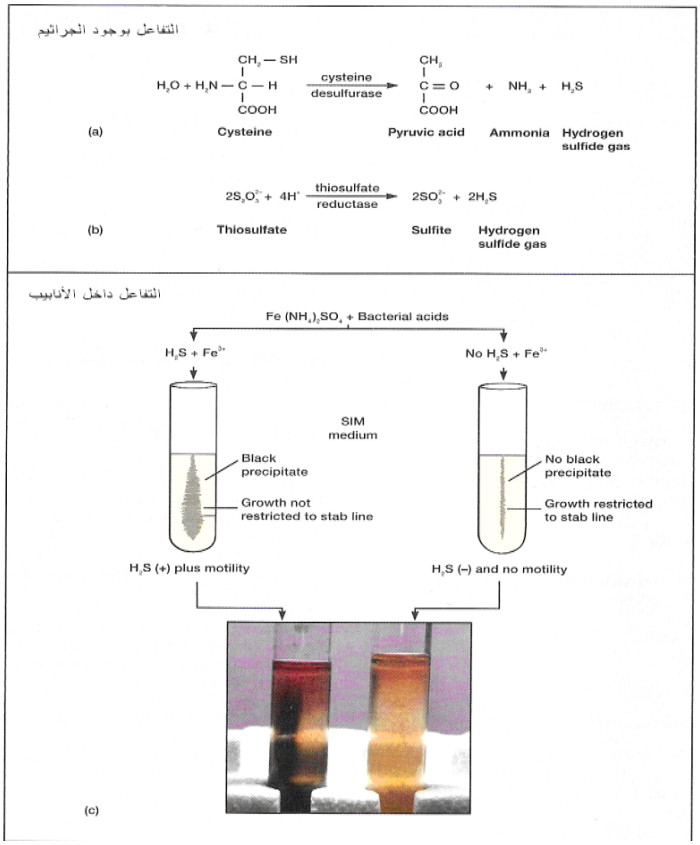
2- لقح الأطباق الحاوية على وسط S . S المعقم بالجراثيم المراد اختبارها بطريقة التخطيط.

3- ضع الأطباق بالوضع المقلوب في الحاضنة بدرجة حرارة 37°م لمدة 24–48 ساعة.

4- بعد مدة الحضن أخرج الأطباق من الحاضنة، واقرأ النتيجة بظهور اللون الأسود.

5- دوّن النتائج. من الجراثيم إيجابية إنتاج غاز H_2S جراثيم *Proteus – Salmonella*.

ومن الجراثيم سالبة إنتاج غاز H_2S جراثيم *E. coli* (الشكل 8–5).



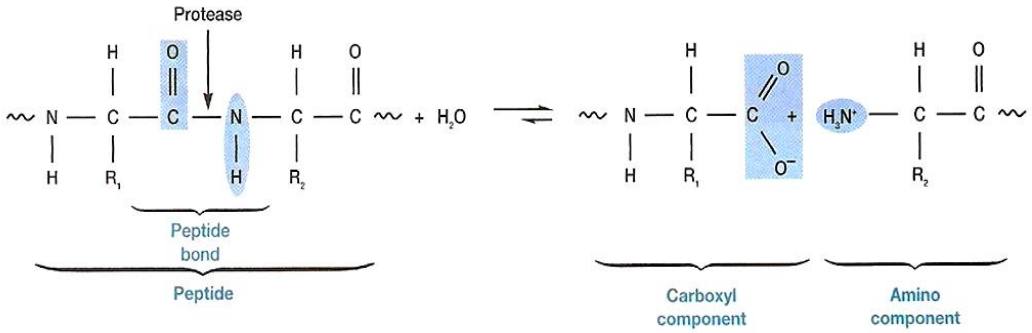
الشكل (8–5): اختبار إنتاج غاز كبريت الهيدروجين

الأنبوب على اليمين سالب– الأنبوب على اليسار موجب (تشكل اللون الأسود يعني تشكل H_2S).

ثانياً- اختبارات التحلل البروتيني:

- إماهة الكازئين:

يعدُّ الكازئين المادة البرتينية الأساسية في الحليب، ويوجد بشكل معلق غروي يعطي الحليب لونه المعروف، والكازئين هو فوسفو بروتين تفككه الجراثيم التي تصنع إنزيماً خارجياً هو Caseas، وتستخدم هذه الخاصة في تحضير الأجبان، كما يمكن الاستفادة منها في تمييز الجراثيم وتصنيفها. تقوم كثير من الجراثيم بإماهة الكازئين لتنتج مشتقات أكثر قابلية للانحلال، وفق التفاعل الآتي:



المواد والأدوات اللازمة:

1- أطباق بتري فارغة ومعقمة.

2- وسط الآغار المغذي المعقم والموجود في أرلينة.

3- حليب طازج منزوع القشدة معقم، أو حليب مجفف معقم منزوع الدسم.

4- مزارع جرثومية مختلفة بعمر 24-48 ساعة.

5- إبر تلقيح جرثومية ذات العقدة.

طريقة العمل:

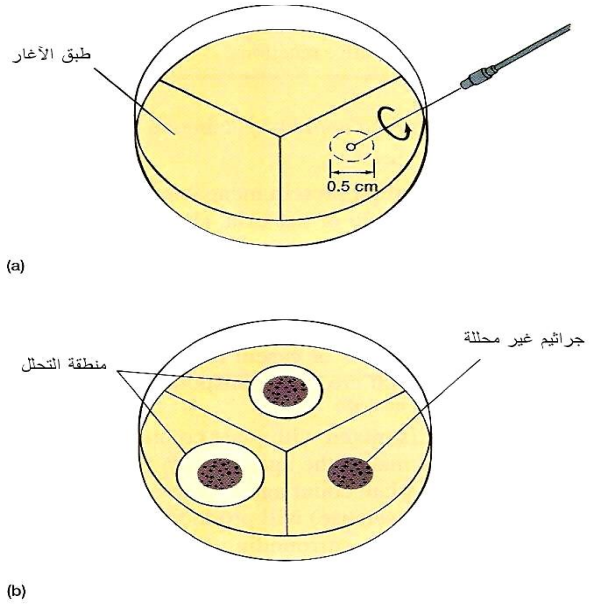
1- اكتب على الأطباق (اسمك - الفئة - اسم الجراثيم).

2- اصهر الآغار المغذي وبرده إلى درجة الحرارة 45°م - 50°م، ثم أضف له الحليب المعقم بنسبة 1 مل حليب لكل 10 مل آغار مغذي، أو بنسبة لا تزيد على 5% من الحليب الجاف.

3- لقّح الأطباق السابقة بالجراثيم بطريقة التخطيط أو بشكل وخز الطبق (الشكل 8-6).

4- ضع الأطباق في الحاضنة بدرجة حرارة 37°م لمدة 3-7 أيام.

5- بعد مدة الحضن المناسبة اكشف عن إماهة الكازئين بالتحري عن وجود هالة شفافة خالية من الحليب حول المستعمرة النامية وتحتها تعد دليلاً على إماهة الحليب، ويمكن ملاحظة ذلك بسهولة عند وضع الطبق فوق سطح أسود اللون.



الشكل (8-6): وجود هالات شفافة حول الجراثيم المحللة للكازئين
(a) تلقيح الطبق بالجراثيم المراد اختبارها، (b) ظهور هالات شفافة تعني حلمهة الكازئين

- **استخدام الطرائق الحديثة في التشخيص الجرثومي:**

يتم حالياً استخدام نظام Analytical Profile Index API من أجل السرعة في العمل لإجراء جميع الاختبارات في وقت واحد بغية تشخيص الجراثيم ويجري ذلك على قطعة بلاستيكية تحتوي على حفر في كل حفرة منها يجري اختبار معين من الاختبارات فيكفي أن نحضر مستحلباً جرثومياً من الجراثيم المراد التعرف عليها ونضعه في هذه الحفر ثم نحضن بدرجة حرارة 37°م لمدة 24 ساعة ثم تُسجل النتائج وتحدد هوية الجراثيم.

انتهت المحاضرة