الميكروبيولوجيا التطبيقية

طرق تقدير الأعداد البكتيرية

Estimating of Bacterial Numbers

1- تقدير العدد الكلى للبكتيريا.

Total bacterial count

2- تقدير أعداد البكتيريا الحية فقط .

Viable bacterial count

3- تقدير العدد الأكثر إحتمالا.

Most probable Number (MPN)

Scanned with CamScanner

2- طرق تقدير الأعداد الميكروبية.
(الحية فقط)
(التخفيف و الأطباق – العد السطحى – العد بإستخدام المرشحات الغشائية)

Scanned with CamScanner

أولاً:- تقديرأعداد البكتيريا الحية فقط
Viable bacterial count

يتم فيه عد الخلايا الحية فقط بوضع حجم معين من العينة بعد عمل تخفيفات لها على بيئة غذائية ثم عد المجاميع البكتيرية المتكونة.

أ- طريقة التخفيف والأطباق:-
The Dilution and Plate Count

تتم بإجراء مجموعة من التخفيفات العشرية للعينة للوصول لعدد مناسب فى التخفيف ثم تلقيح هذا التخفيف فى طبق بترى معقم وتصب البيئة الغذائية عليه ثم التحضين مع عد المجاميع الناتجة وحساب العدد فى العينة.

Scanned with CamScanner

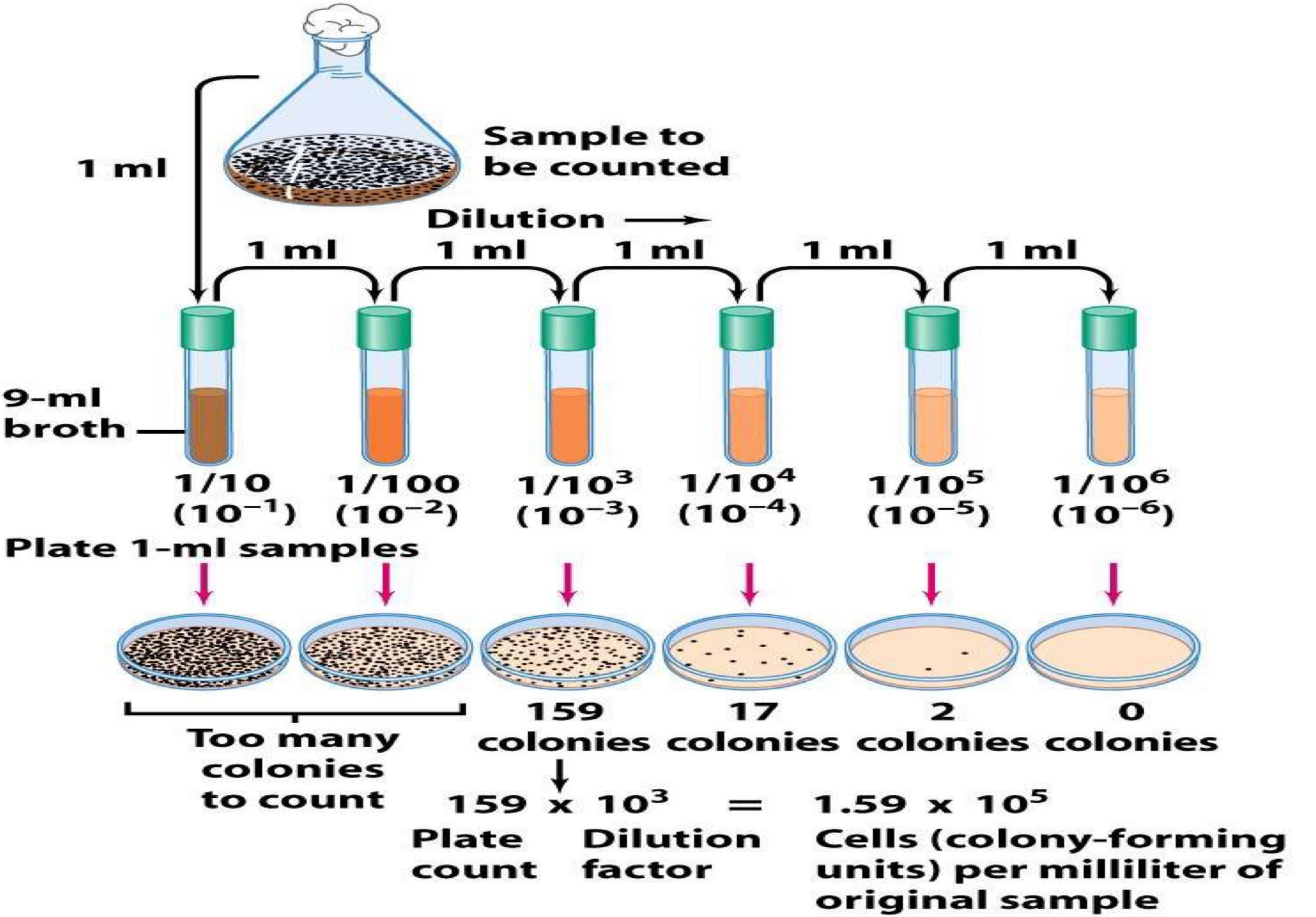


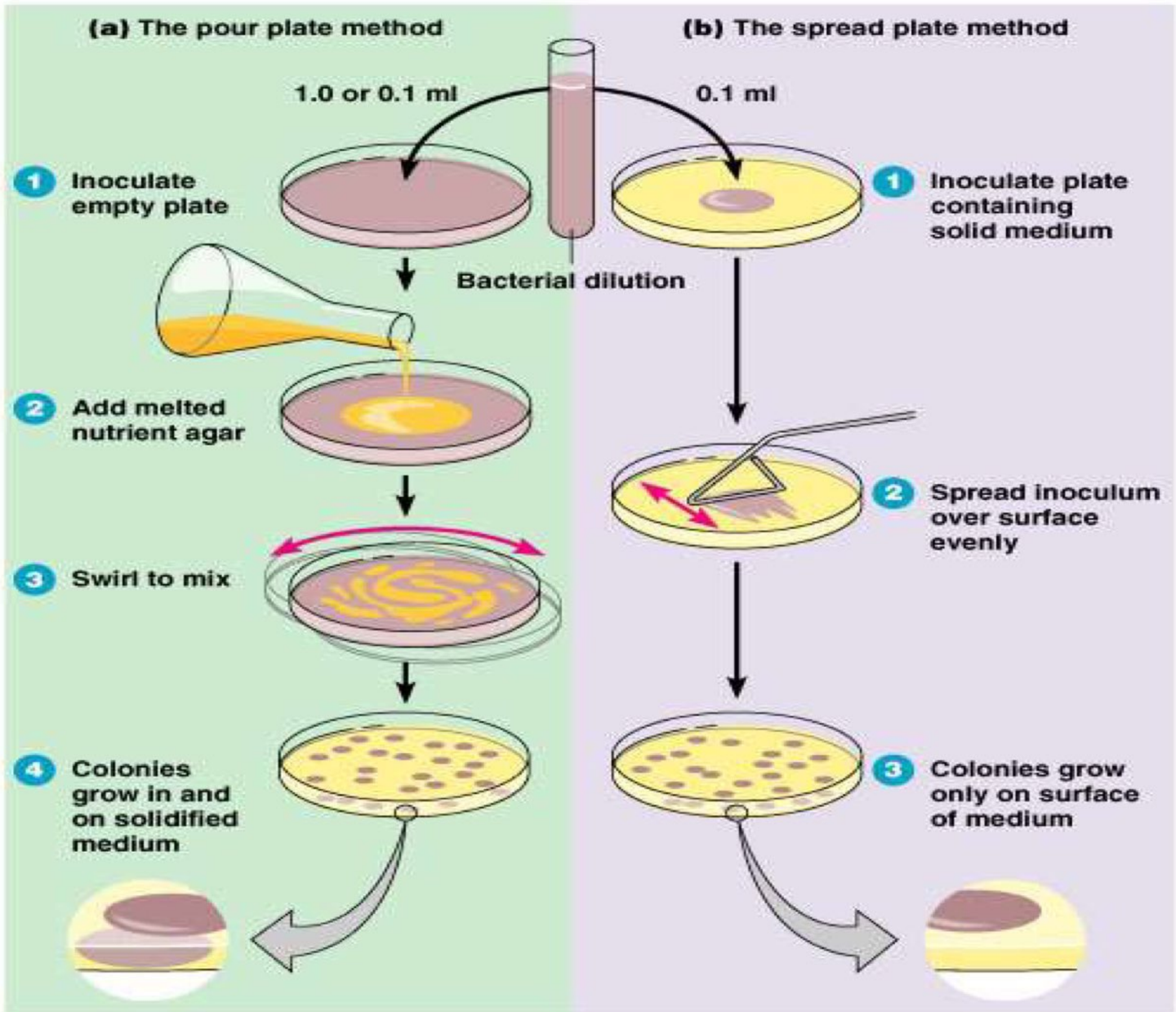
Figure 6-11 Brock Biology of Microorganisms 11/e

© 2006 Pearson Prentice Hall, Inc.

Scanned with CamScanner

ب- طريقة العد السطحى:- Surface Count Method

يتم نشر جزء صغير من العينة (أغذية) على سطح بيئة آجار صلب فى طبق بترى بالإبرة أو بساق زجاجية ثم التحضين وعد المجاميع.



Copyright © 2004 Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings.

Scanned with CamScanner

ج- العد بالمرشحات الغشائية:-

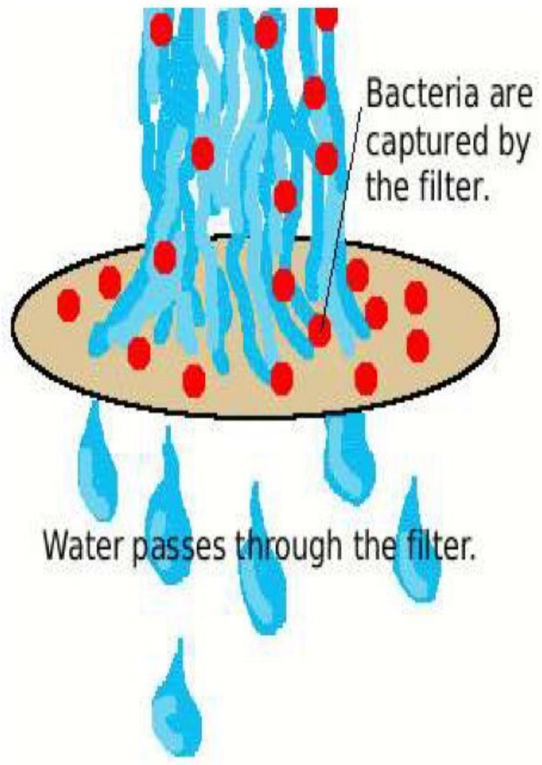
Membrane Filter Counts

للعد فى السوائل التى تحتوى على أعداد قليلة من البكتيريا (مياه معدنية) بإمرار حجم كبيرمن السائل خلال المرشح ثم وضع قرص الترشيح على بيئة غذائية فى طبق بترى والتحضين ثم عد المجاميع البكتيرية الناتجة.









Scanned with CamScanner

3- تقدير العدد الأكثر إحتمالاً.

Most probable Number (MPN)

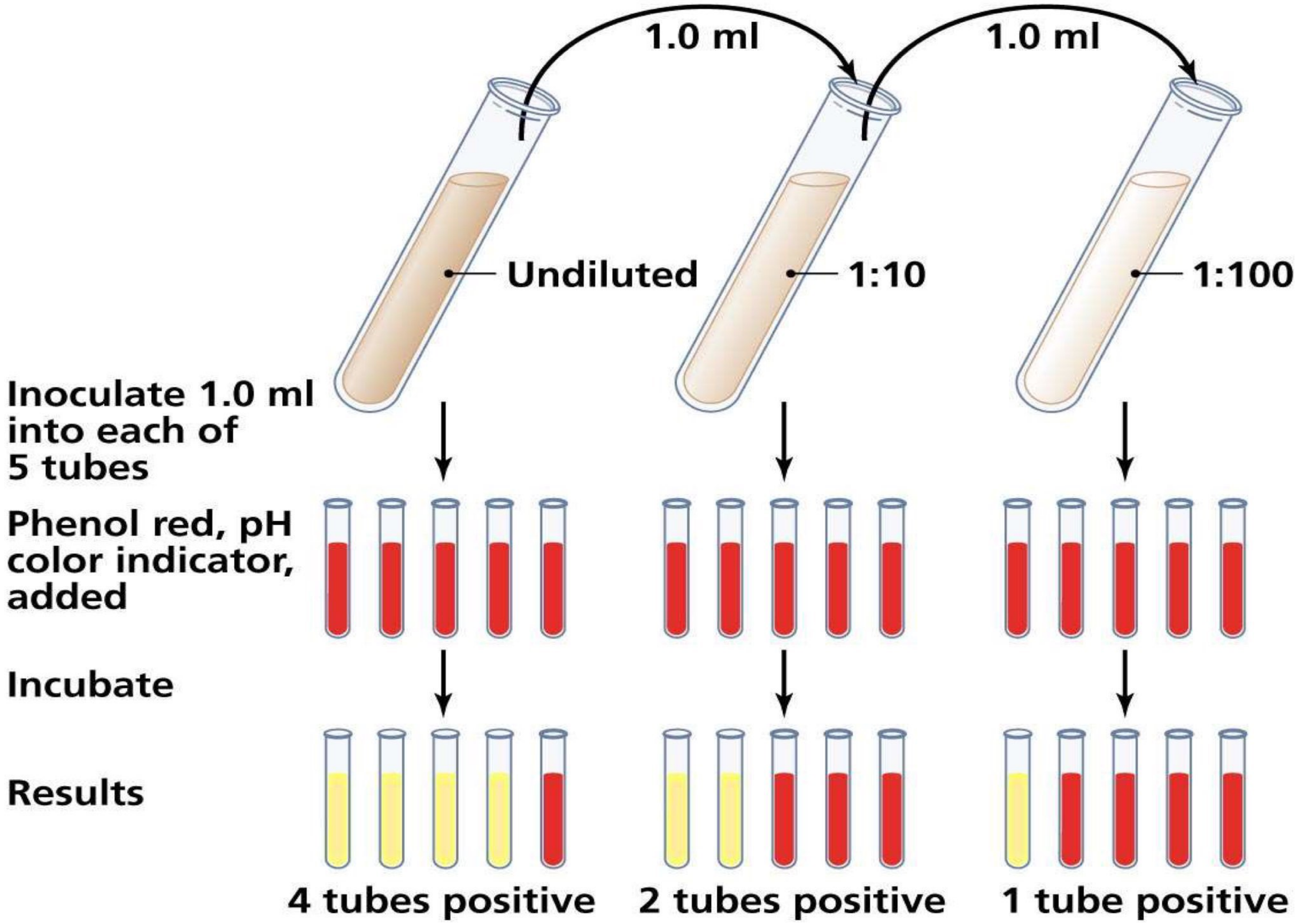
تستخدم لعد البكتيريا فى أوساط :-

1- يكون العدد فيها قليل.

2- تنمو هذه البكتيريا فى بيئات سائلة - إنتخابية أو متخصصة (Selective).

- **تتم بإجراء تخفيفات عشرية للعينة ثم تلقح التخفيفات فى مكرر من أنابيب تحتوى على البيئة المتخصصة لنوع البكتيريا المراد تقدير أعدادها ثم الحصول على العدد من خلال جداول إحصائية.**

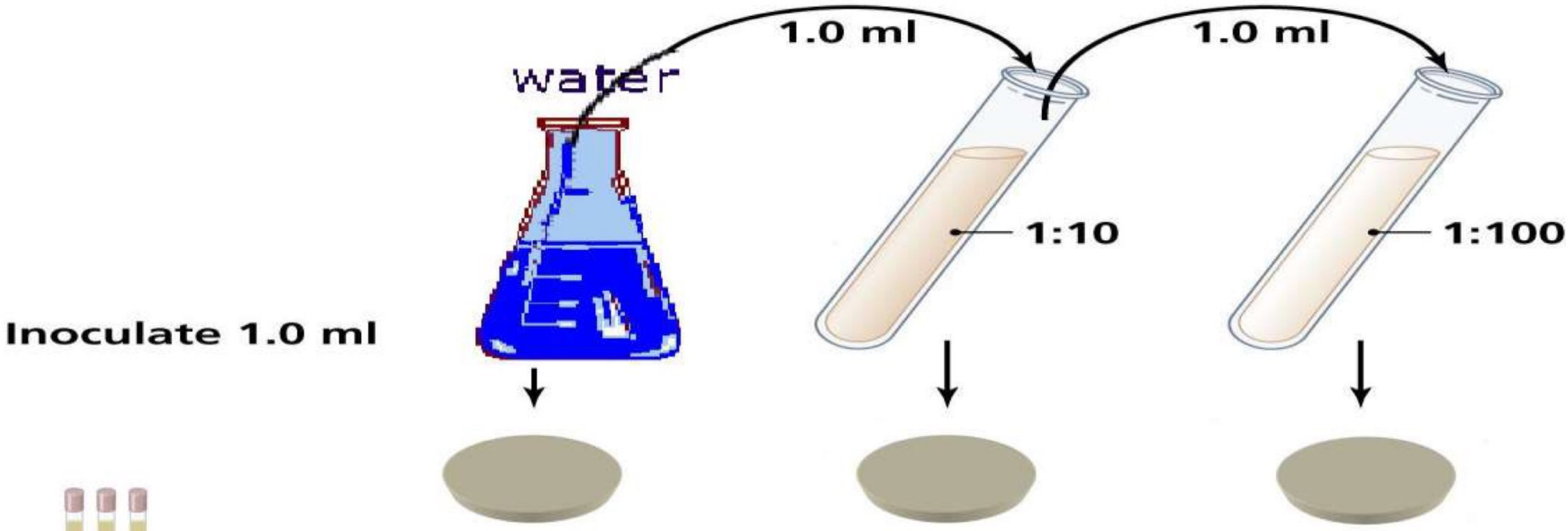
Scanned with CamScanner

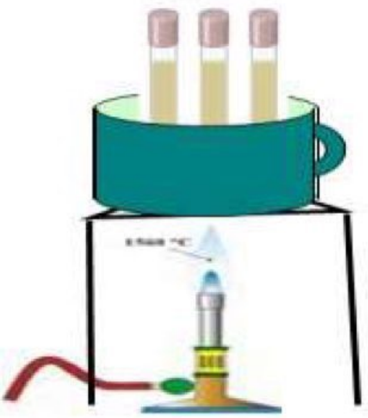


Copyright © 2006 Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings.

Scanned with CamScanner

4- تقدير أعداد البكتيريا الحية فقط فى عينة ماء (مياه صنبور) بطريقة التخفيف والأطباق

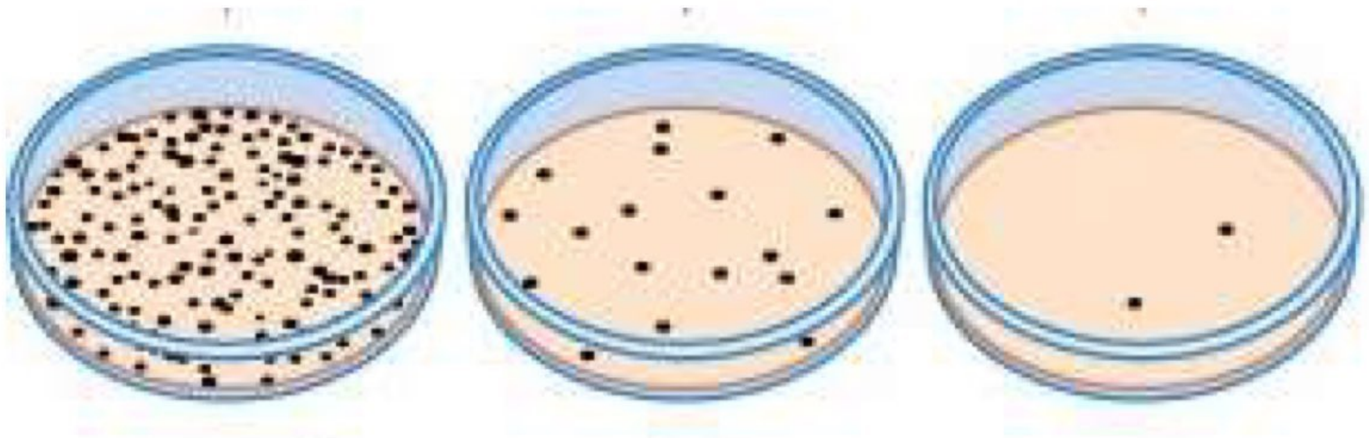




إسالة بيئة الآجار العميق علي 100 ° م ثم تبريده إلى 55° م

Scanned with CamScanner

تحضين الأطباق على 35 ºم / 48 ساعة



- عد المجاميع فى الأطباق التى تحتوى على 30 – 300 مستعمرة
- حساب العدد من المعادلة التالية :-
- العدد فى 1مل ماء =

متوسط عدد المجاميع فى الطبق X مقلوب التخفيف

و تكون الوحدة (Unit)

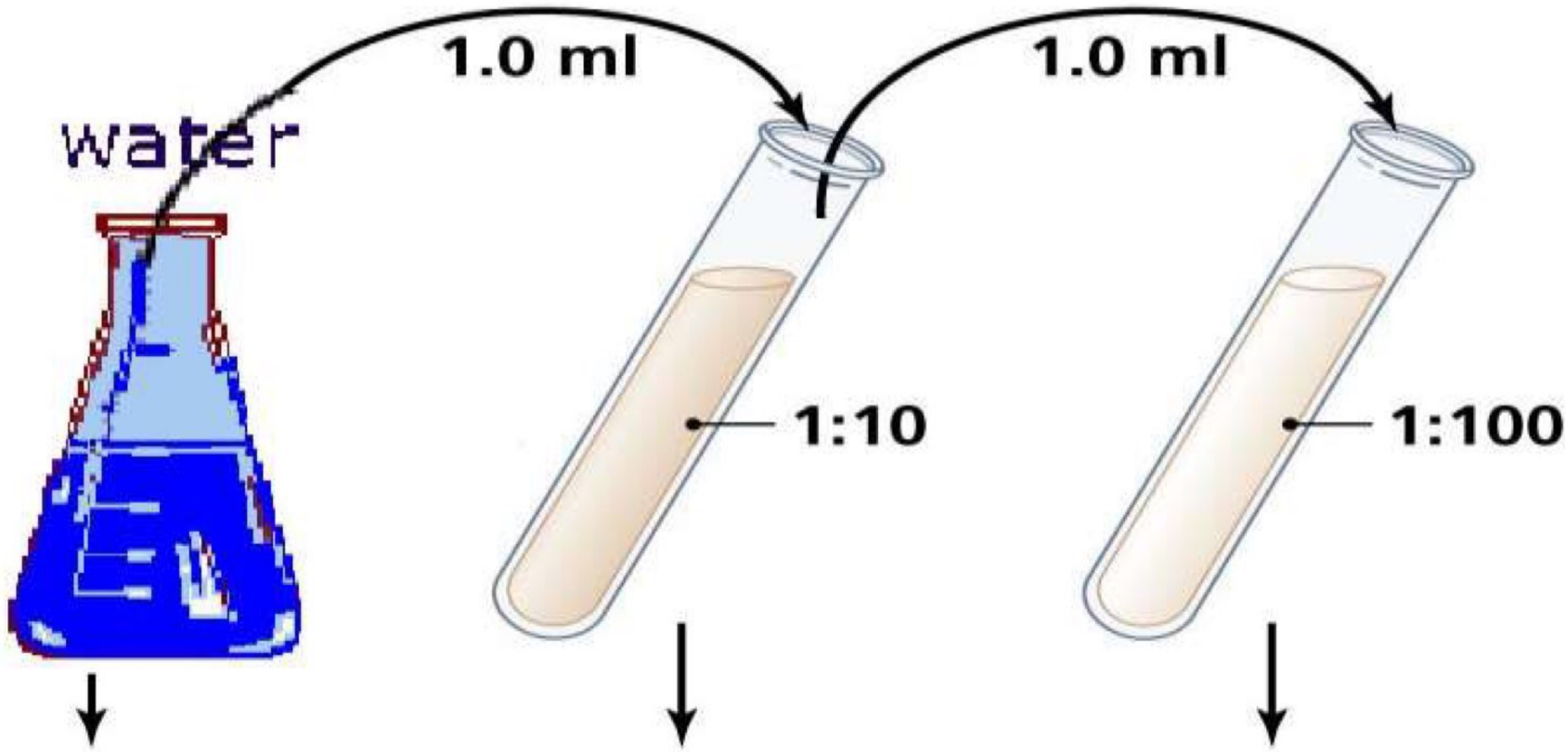
Colony Forming Unit (CFU) / ml

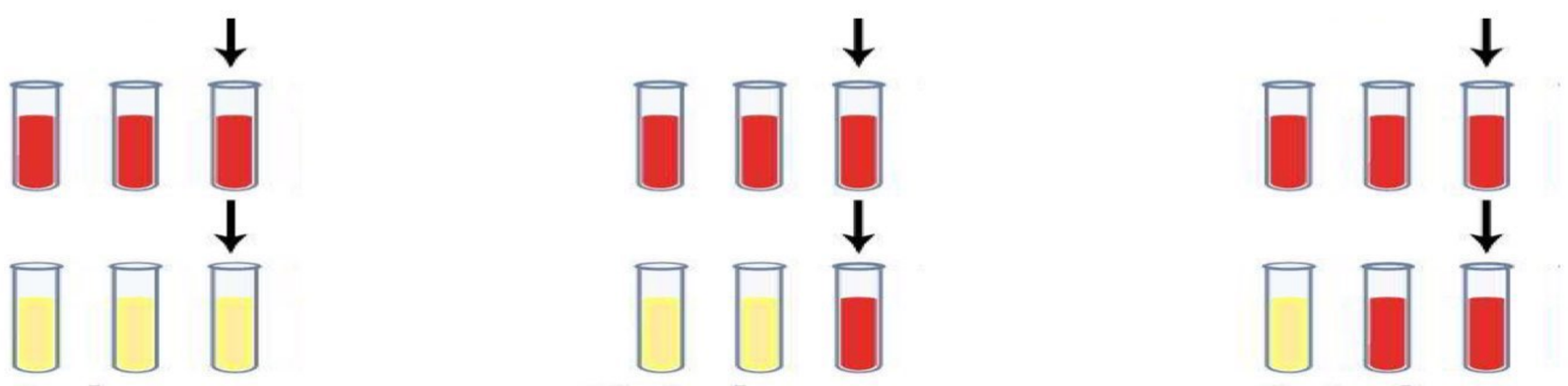
Scanned with CamScanner

3- عد بكتيريا القولون فى عينة مياة بطريقة (MPN).

Scanned with CamScanner

Inoculate 1.0 ml





Scanned with CamScanner

4- شرح إختبارات الـ IMVC

Scanned with CamScanner

أسم الإختبار	الإندول (I)	أحمر الميثيل (M)	فوجز بروسكور (V)	سترات (C)
Escherichia coli	+	+	−	−
Enterobacter aerogenase	−	−	+	+

Scanned with CamScanner

أسم الإختبار	الإندول (I)	أحمر الميثيل (M)	فوجز بروسكور (V)	سترات (C)
	Tryptophan. Tryptophanase Indol production Tryptophan medium Kovacs reagent. (Pink- Red color) (R+).	تقدير كمية الحامض المنتجة فى بيئة بويون الجلوكوز دليل أحمر الميثيل لون أحمر غامق يعنى نتيجة موجبة وذلك لأن درجة الحموضة أقل من 4.5 وأحمر فاتح نتيجة سالبة.	إنتاج مادة الأسيتيل ميثيل كربينول كأحدى نواتج تخمير سكر الجلوكوز. دليل ألفا نافثول مع بوتاسا كاوية. لون أحمريعنى نتيجة موجبة.	إستخدام سترات الصوديوم كمصدر وحيد للكربون. بيئة معدنية + سترات الصوديوم كمصدر وحيد للكربون. دليل الـ BTB اللون الأزرق هو النتيجة الموجبة

Scanned with CamScanner

5-إختبار النقطة المعلقة لميكروب مجهول

Scanned with CamScanner

5- (إختبار النقطة المعلقة) لميكروب

E. coli

Scanned with CamScanner

1- تابع طرق تقدير الأعداد الميكروبية.

ثانياَ:- (العدد الكلى للميكروبات (حى + ميت))
(شريحة العد- شريحة بريد- العدادات الإلكترونية- الطرق الطبيعية)

2- تقدير العدد الكلى للميكروبات فى اللبن الخام بطريقة الميكروسكوب المباشر

(طريقة بريد).

3- تابع دراسة بعض الصفات الفسيولوجية للميكروبات
(تأثير البكتيريا فى بيئة لبن عباد الشمس).

4- بادئ اللبن الزبادى و إختبار نقاوته.

5-(إختبار النقطة المعلقة) لميكروب

Unknown مجهول

Scanned with CamScanner

1- تابع طرق تقدير الأعداد الميكروبية.

ثانياَ:- (العدد الكلى للميكروبات (حى + ميت))

طرق مباشرة (شريحة العد - شريحة بريد - العدادات الإلكترونية)

طرق غيرمباشرة (الطرق الطبيعية) (لونية – وزنية)

Scanned with CamScanner

تقدير العدد الكلى للميكروبات

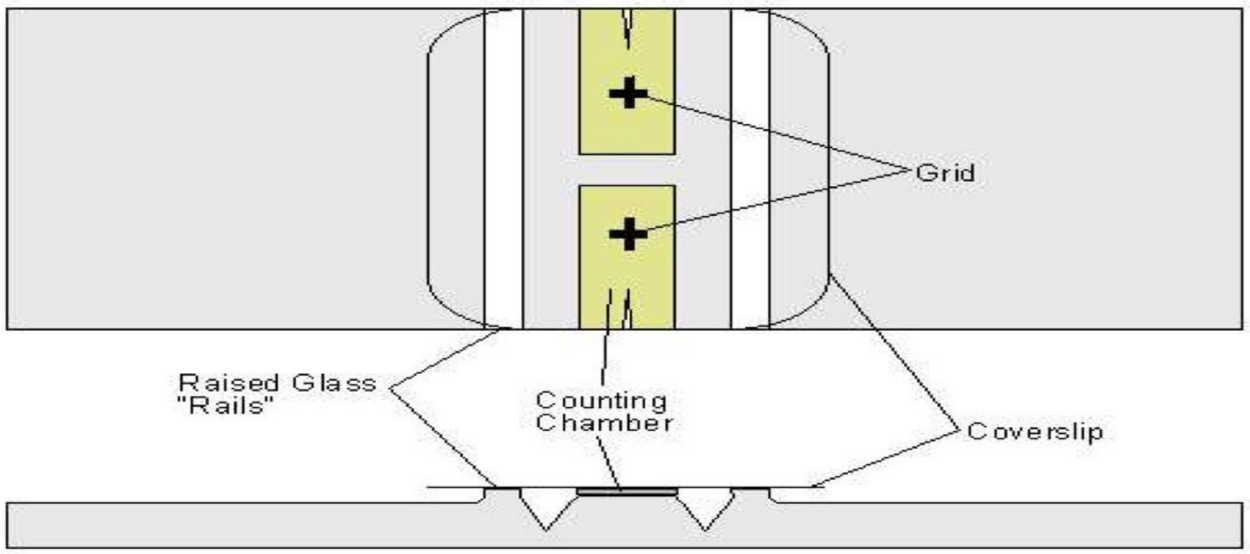
Total Microbial count

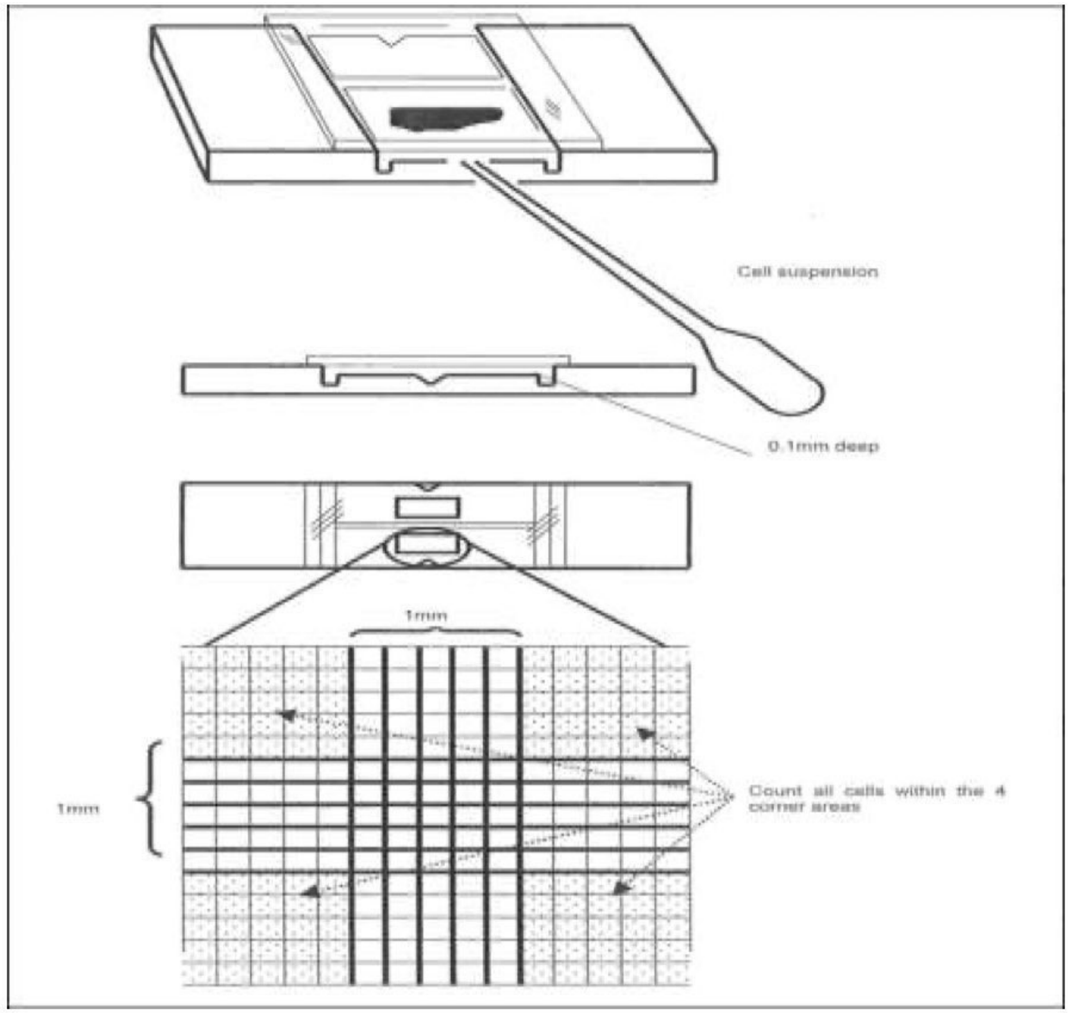
وهى طرق تستخدم لعد الخلايا الحية والميتة دون التمييز بينها وتتم عن طريق:-

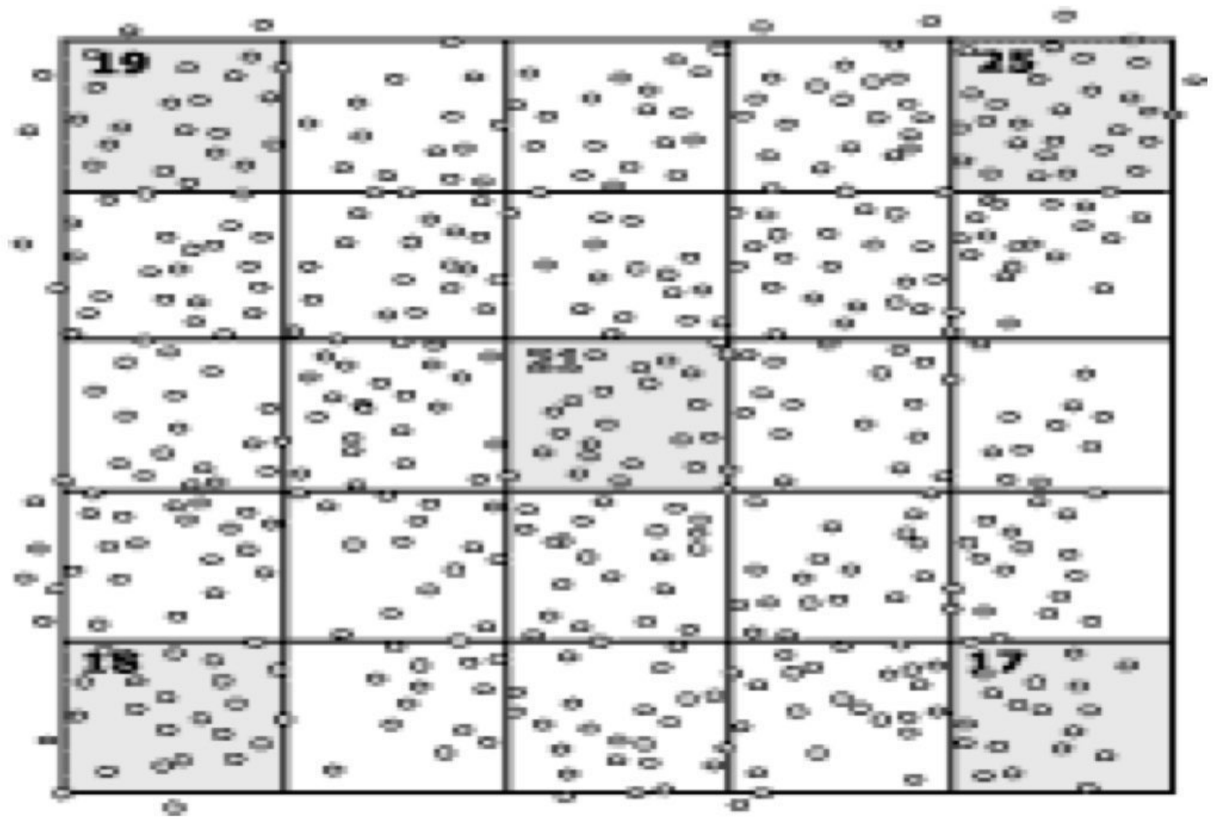
أ- شريحة العد Counting chamber method (Haemocytometer)

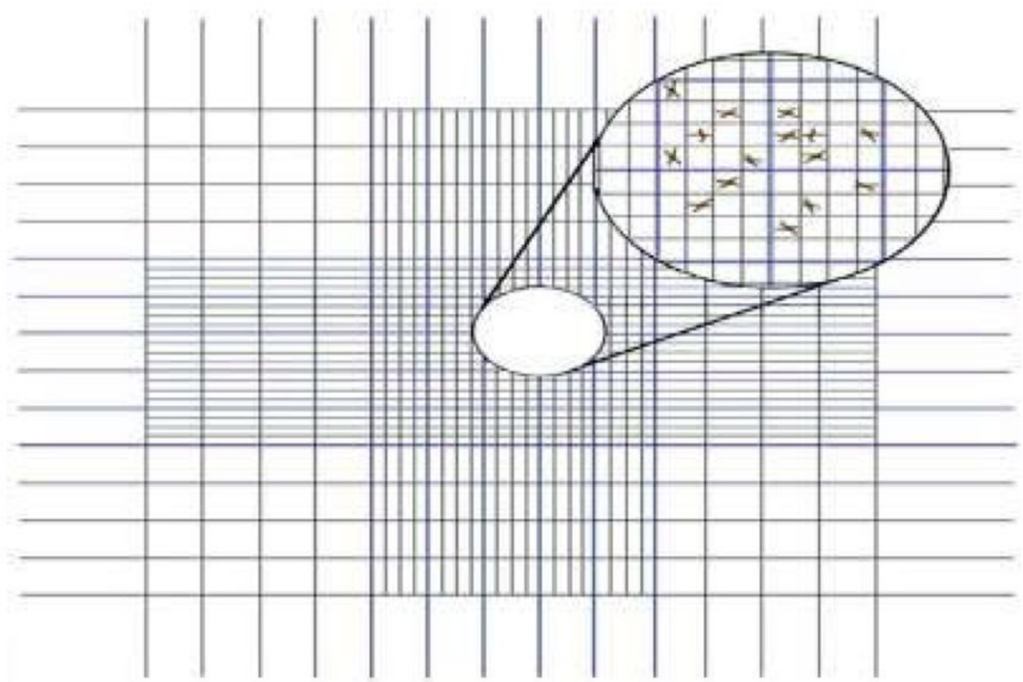
وهى عبارة عن شريحة بها تجويف مقسم إلى مربعات (400 مربع) يملأ بمزرعة سائلة ويغطى بـ Cover ويتم العد فى (50- 100 مربع) بإستخدام الميكروسكوب.

Scanned with CamScanner









Scanned with CamScanner

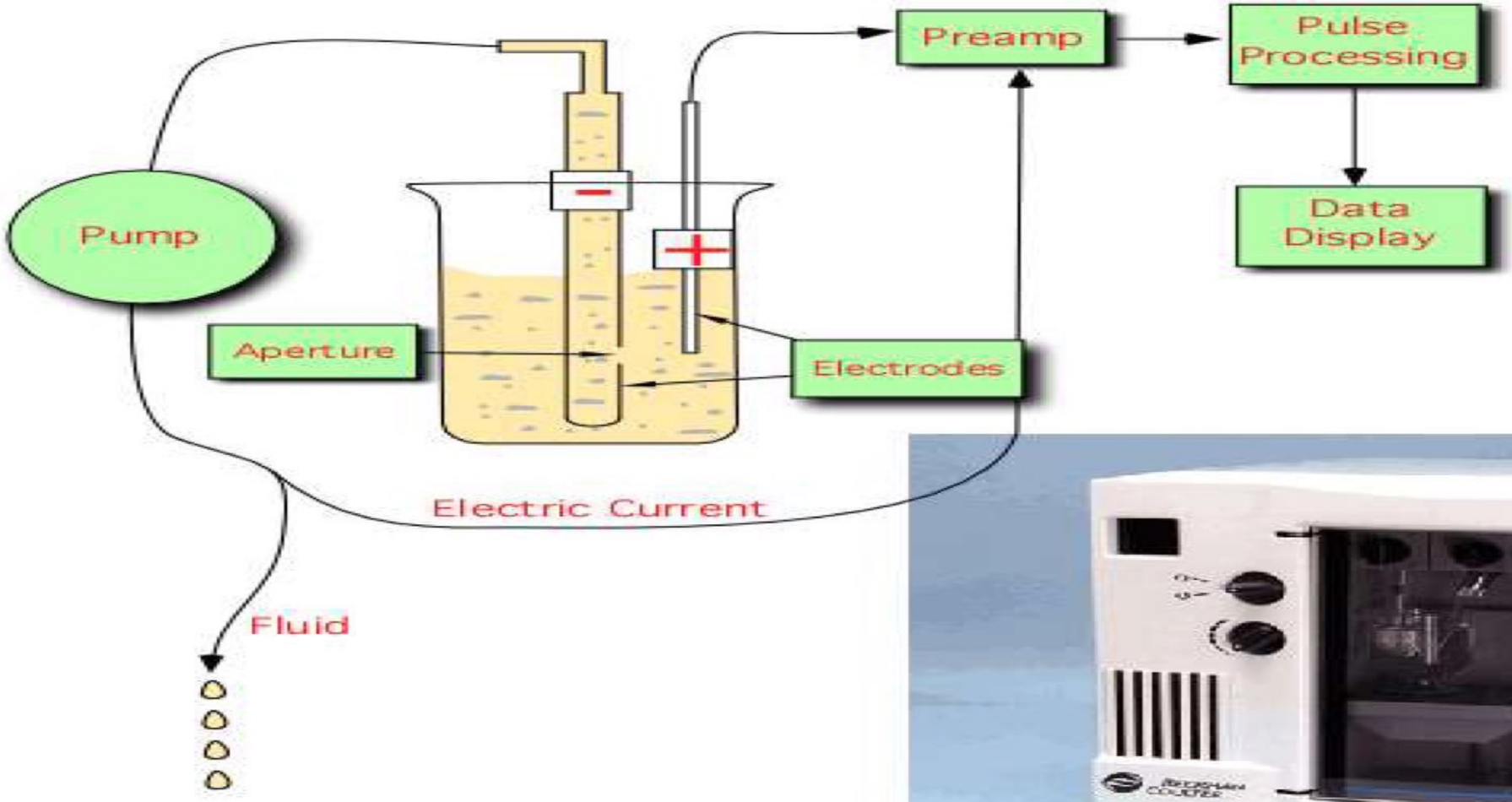
ب- طريقة بريد Breed Count

تستخدم لعد بكتيريا اللبن وهى عبارة عن نشر 0.01 مل لبن فى مساحة 1سم^2 لمربع مرسوم على الشريحة وعمل غشاء منه وصبغه بأزرق الميثيلين ثم العد فى(10- 20 مجال) وإستنتاج العدد من المعادلة.

Scanned with CamScanner

ج- العددات الالكترونية The Electronic Counters

لعد خلايا الميكروبات بمرور حجم معين صغير من المعلق من خلال فتحة ضيقة قطرها 5- 10ميكرون و بمرور الخلية تختلف المقاومة الكهربية و التى يتم تكبيرها بـ Amplifier ويسجل العدد إلكترونياً.





Scanned with CamScanner

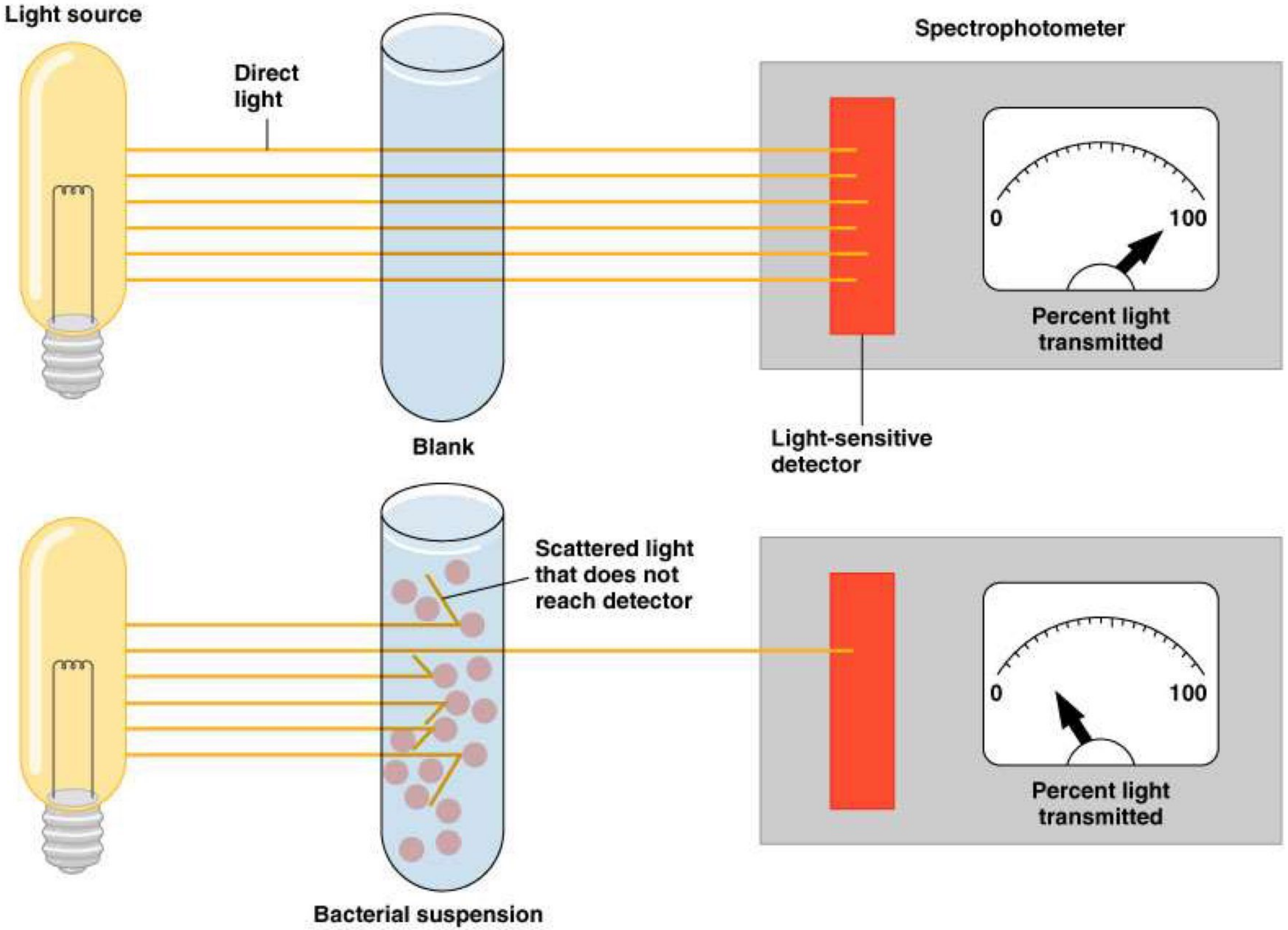
د- بالطرق الطبيعية

Nephelometer Method

1- طرق لونية:- بقياس العكارة فى معلق من الخلايا بمرور الضوء خلاله وتقدير النافذ منه بخلية سيلينوم ضوئية يمر فيها تيار تتناسب شدته مع كثافة الميكروبات مع عمل Standard curve.

2- طرق وزنية:- وتتم بعمل طرد مركزى لمعلق الخلايا ثم يفصل الراسب و يغسل و يجفف و يوزن.

Scanned with CamScanner



Copyright © 2004 Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings.

Scanned with CamScanner

Spectrophotometer







Scanned with CamScanner

2- تقدير العدد الكلى للميكروبات فى اللبن الخام بطريقة الميكروسكوب المباشر

(طريقة بريد).

Breed Slide

Scanned with CamScanner

فكرة العمل:-

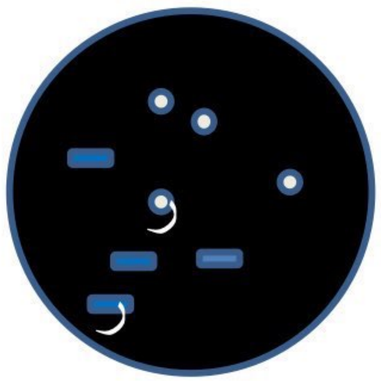


1- رسم مربع له مساحة معلومة 1 سم^2.

2- وضع حجم معلوم 0,01 مل من اللبن على المربع.

3- صبغ الغشاء بصبغة أزرق الميثيلين.

4- فحص الغشاء بالعدسة الزيتية.



5- عد الخلايا فى 10 -20 مجال.

طريقة الحساب:-

عدد المجالات فى المربع = مساحة المربع \ مساحة المجال

$\pi r^2 \setminus {}^4 10 X {}^4 10$

≈ 5000 مجال فى المربع

لميكروسكوبات المعمل

لأن نصف قطر مجاله = 80 ميكرون

Scanned with CamScanner

العدد الكلى للميكروبات فى 1 مل لبن =

متوسط عدد الميكروبات فى المجال الواحد X عدد المجالات الميكروسكوبية فى المربع (5000) X 100

لأن حجم اللبن 0,01 مل

الوحدة (Unit)

خلية \ مل

Cell/ ml.

Scanned with CamScanner

خطوات عمل شريحة بريد:-

1- رج العينة جيداً.

2- إغسل الشريحة بالماء و جففها وإرسم مربعين مساحة كلاً منهما ا سم2 بإستخدام ورق الرسم البيانى.

3- إنقل 0,01مل لبن لكل مربع بإستخدام ماصة بريد أو إبرة التلقيح ذات العقدة وإفرده داخل كل مربع.

4- جفف الغشاء تجفيف هوائى بالمصباح (علل).

5- إغمس الغشاء فى الزيلول (علل) لمدة 1ق.

Scanned with CamScanner

6- إغمس الغشاء فى الكحول (علل) لمدة 2ق.
7- إغمر الغشاء بصبغة أزرق الميثيلين لمدة 5ق.
8- إغمس الغشاء فى الكحول لمدة 1ث.
9- إغسل الغشاء بالماء و جففه تجفيف هوائى بالمصباح.
10- إفحص الغشاء بالعدسة الزيتية.
11- عد الميكروبات فى 10مجالات واحسب العدد من المعادلة.

Scanned with CamScanner

مميزات العد بالميكروسكوب المباشر:-

1- طريقة سريعة - سهلة -لا تحتاج لخبرة أفراد مهرة.
2- لا تحتاج لأجهزة أو أدوات معقدة.
3- تعد الخلايا الميكروبية سواء فى سلاسل أو تجمعات.
4- تعطى فكرة مبدئية عن الأشكال المورفولوجية السائدة فى اللبن.

عيوب العد بالميكروسكوب المباشر:-

1- تعد الخلايا الحية و الميتة معاً.
2- لا تصلح للألبان عالية الجودة أو منخفضة الحمل الميكروبى.
3- عدم إنتظام توزيع الغشاء.
4- يمكن عد نفس المجال أكثر من مرة.

Scanned with CamScanner

3- تابع دراسة بعض الصفات الفسيولوجية للميكروبات

(تأثير البكتيريا فى بيئة لبن عباد الشمس).

Scanned with CamScanner

بيئـة لـبن عباد الشمس Litmus milk

تركيبها:-

لبن فرز طازج + دليل عباد الشمس بنسبة 2% (من محلول 5%).



- درجة الـ pH = 6.6 – 6.8.
- تعقم في جهازآرنولد.
- تستخدم في التمييز والتعرف علي الميكروبات تبعا للتغيرات التي تحدثها في مكونات البيئة.

Scanned with CamScanner

التركيب الأساسى للللبن:-

1- الكربوهيدرات ويمثلها سكر اللاكتوز.

2- البروتينات ويمثلها الكازين .

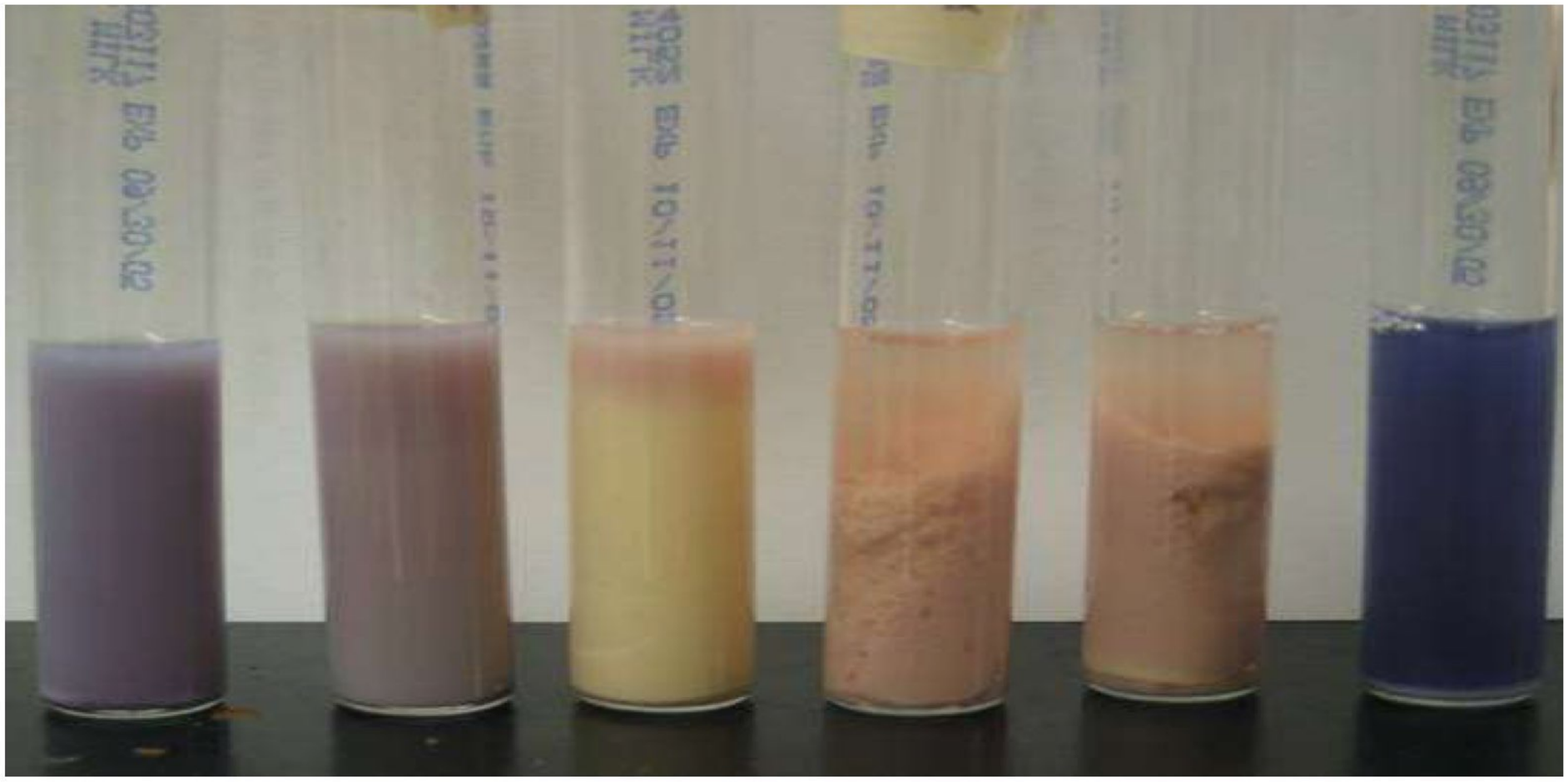
3- الدهون و يمثلها القشدة ولكن يستخدم اللبن الفرز أى خالى الدسم.

الإختبار:-

تلقح أنبوبة بيئة لبن عباد الشمس بعقدة من مزرعة الإختبار ثم التحضين على 30º م لمدة 48ساعة.

وتكون النتيجة كما يلى:-

Scanned with CamScanner





Scanned with CamScanner

اللاكتوز	الكازين	لون الدليل	النموزج	النتيجة	البكتيريا
يتخمر و ينتج حامض بكمية قليلة	الحامض لا يكفى لتجبن الكازين	أحمر	لبن سائل لونه محمر (وردى)	انتاج حامض ضعيف Acid	*Micrococcus*
يتخمر و ينتج حامض بكمية كبيرة	الحامض يسبب تجبن (تخثر) الكازين	أحمر	خثرة جامدة بيضاء أعلاها لون وردى	تجبن حامضى Acid curd	*Lactobacillus bulgaricus Streptococcus thermophilis*
يتخمر و ينتج حامض بكمية كبيرة و غاز	الحامض يسبب تجبن الكازين والغاز يسبب تشقق الخثرة	أحمر	خثرة جامدة بيضاء متشققة أعلاها لون وردى	تجبن حامضى + غاز Acid curd + gas	*Escherichia coli Enterobacter*

Scanned with CamScanner

اللاكتوز	الكازين	لون الدليل	النموزج	النتيجة	البكتيريا
لا يتخمر	انزيم يشبه انزيم الرنين يسبب تجبن الكازين ثم هضم الخثرة	بنفسجى	شرش متعكر سائل يعلوه لون بنفسجى	تجبن انزيمى مع هضم الخثرة (ببتنة) Peptonization	*Bacillus subtilis*
لا يتخمر	يتحلل البروتين حتى الأمينات	أزرق	سائل لونه أزرق	انتاج قلوى Alkalin	*Alcaligenes viscosus*

Scanned with CamScanner

4- بادئ اللبن الزبادى و إختبار نقاوته.

Scanned with CamScanner

بادئ الزبادي

مزرعة البادئ عبارة عن مزرعة نقية من ميكروب واحد أو أكثر **تستخدم** لإتمام عملية التخمير في الصناعات اللبنية و الغذائية **بغرض** الحصول على منتج ذو صفات مرغوبة و متجانسة من حيث اللون و الطعم و الرائحة و القوام و القيمة الغذائية.

يتكون بادئ الزبادي من ميكروبي:-

1- *Lactobacillus bulgaricus*

خلايا عصوية طويلة غير متجرثمة في سلاسل.

2- *Streptococcus thermophilus*

خلايا كروية في أزواج أو في سلاسل.

Scanned with CamScanner

الكشف عن تلوث بادئ الزبادي

طريقة بيوري Burri وفيها يتم تخطيط عقدة من البادئ على أجار مغذى مائل خالى من السكريات.

عمل غشاء و صبغة بصبغة أزرق المثيلين و فحصه ميكروسكوبياً

Scanned with CamScanner

5-(إختبار النقطة المعلقة) لميكروب

Unknown مجهول

Scanned with CamScanner