الفصل السابع

الاختبارات الميكروبيولوجية

- **مقدمة** .
- **العد الكلى للبكتيريا** :
- بيئة العد الكلى
- **الخمائر والفطائر** :
- بيئة المولت .
- **البكتريا الثرموفيلية والمكونة للجراثيم** :
- بيئة آجار السلفيت .
- بيئة الكبد السائل .
- **بكتريا القولون النموذجى** :
- بيئة السترات .
- بيئة التربتون .
- بيئة ايوسن ازرق الميثلين .
- بيئة بطاطس الآجار .
- بيئة مرق بيتون فوسفات الجلوكوز .
- بيئة اللاكتوز السائلة .
- **الكشف عن البكتريا العنقودية وميكروب السالمونيلا .**
- **بيئات أخرى .**
- **المصطلحات الفنية للاختبارات الميكروبيولوجية .**

obeikandl.com

obeikandl.com

الإختبارات الميكروبيولوجية

مقدمة :

يشمل هذا الفصل **أهم الاختبارات** التى تجرى على الأغذية لمعرفة محتواها من الكائنات الحية الدقيقة مثال :

العد الكلى للميكروبات ويفيد معرفة هذا الرقم فى الوقوف على مدى دقة العمليات **التصنيعية** وكذلك عمليات التداول الخاصة بهذا الغذاء .

وتضم الإختبارات معرفة **العد الكلى للخمائر والفطر** وهو ما يمكن أن يلقى الضوء على حالة الغذاء السطحية حيث تنتشر الفطريات على بعض الأغذية ، ذات الرطوبة العالية خاصة على الطبقة السطحية عندما تساء عمليات التصنيع والتداول والتخزين .

ونظراً لأن معظم عمليات الحفظ للأغذية تستخدم درجات حرارة مرتفعة أثناء السلق أو التجفيف أو التعقيم فان معرفة مدى وجود بعض من البكتريا الثرموفيلية المكونة للجراثيم يعطى مؤشرا عن سلامة هذه المعاملات عندما يخلو الغذاء من هذه البكتريا المقاومة للحرارة .

ويأتي إختبار الكشف عن وجود **بكتريا القولون** دليلاً على عدم سلامة عمليات التداول وتعرض الغذاء للتلوث فى مراحل التداول والتخزين ومن هنا يجب أن يخلو الغذاء تماماً من وجود مثل هذه البكتريا .

اختبار رقم (٣٥)

العد الكلى للميكروبات Total Counts

طريقة اخذ العينة :

تؤخذ العينات عشوائيا من عدد من العبوات لا تقل عن الجذر التربيعي لنصف عدد العبوات المطلوب فحصها ويحتفظ بها داخل عبوات لا تسمح بنفاذ الرطوبة .

تحضير العينة :

- يوزن ١٠ جرام فى زجاجة أو دورق مخروطى معقم سعة ٢٥٠ مل على الأقل .
- يضاف ١٩٠مل ماء مقطر معقم – تترك العينة حتى تتشرب بالماء لمدة ٣٠ دقيقة على حرارة الثلاجة ثم ترج العينة بشدة لمدة دقيقتين .

العد الكلى :

يؤخذ ١سم٣ من العينة إلى طبق بترى فى تجربة مزدوجة – ثم تصب الأطباق بواسطة بيئة العد الكلى أو المضبوطة إلى pH ٧ – حضن على ٣٢ درجة مئوية لمدة ٤٨ ساعة وتدون النتائج كعدد كلى لكل جرام من العينة .

بيئة العد الكلى :

ــ تربتون	٥ جرام
ــ مستخلص الخميرة	٢,٥ جرام
ــ جلوكوز	١ جرام
ــ آجار	٢٠ جرام
ــ ماء مقطر	١ لتر

تمزج تلك المكونات مع بعض بغليها فى الماء ثم تصب فى أنابيب أو دوارق مخروطية وتعقم على ١٢١ °م لمدة ١٥ دقيقة (الـ pH النهائية بعد التعقيم حوالي ٧) .

التدريب العملي :

أمامك عينات من **البصل المجفف – المكرونة** والمطلوب معرفة العد الكلى للبكتريا .

obeikandl.com

اختبار رقم (٣٦)

الخمائر والفطر Yeasts & Fungi

يصب فى تجربة مزدوجة ١مل من المحلول فى أطباق بترى مستخدما بيئة المولت آجار أو بيئة بطاطس الآجار – ثم يحضن لمدة خمس أيام على درجة ٣٢ درجة مئوية – تفحص الأطباق بعد ٣ أيام لعد الفطر قبل أن تغطى الأطباق ثم تعد الخميرة بعد ٥ أيام من بداية التحضين وتسجيل النتائج كعدد كلى للفطر والخميرة لكل جرام من العينة .

بيئة المولت :

- مسحوق مستخلص المولت ٣٠ جم
- آجار ١٥ جرام
- ماء مقطر ١ لتر

تذاب المكونات بتسخينها فى الماء لدرجة الغليان ثم تصب فى أنابيب أو دوارق مخروطية وتعقم على درجة حرارة ١٢١ °م لمدة ١٥ دقيقة (درجة الـ pH ٣,٥ – ٤,٥) .

التدريب العملي :

أمامك عينات من الخبز عليها بعض النموات الفطرية والمطلوب تقدير العد الكلى للفطر والخميرة/ جم العينة .

اختبار رقم (٣٧)

البكتريا الثرموفيلية والمكونة للجراثيم

Thermophillic Bacteria

تحضر العينة بعد نقل الخلايا الخضرية وهذه تتم كالآتى :

ينقل من ٦٠-٧٠ مل من التخفيف إلى أنبوبة أو دورق مخروطى معقم ويسخن لدرجة الغليان – يستمر لمدة خمس دقائق ثم تحضر بعد ذلك التخفيفات اللازمة .

ينقل ٦٠-٧٠ مل من المعلق إلى دورق مخروطى وتعقم فى المعقم لمدة ١٠ دقائق على ضغط ١٥ رطل / بوصة ٢ ثم تحضر التخفيفات اللازمة .

أ- البكتريا الثرموفيلية **اللاهوائية المنتجة** لغاز يد٢كب (كبريتور الأيدروجين): بتجربة مزدوجة يصب ١ مل من التخفيف المسخن على بيئة **آجار السلفيت فى أنابيب** اختبار – تخلط البيئة بالعينة حتى يبدأ الاجار فى التصلب – غط الآجار بواسطة الفاسبر المعقم ثم يحضن لمدة ٤٨ ساعة على ٥٥ °م وتعد المستعمرات السوداء وتسجل النتائج كعدد البكتريا اللاهوائية المنتجة لغاز كبريتور الأيدروجين فى الجرام من العينة .

ب- البكتريا الثرموفيلية **اللاهوائية الغير منتجة** لغاز يد٢كب (كبريتور الأيدروجين): بتجربة مزدوجة تلقح أنابيب محتوية على **بيئة الكبد** السائل بواسطة ١مل من المعلق الساخن – يخلط المعلق بالبيئة ويغطى السطح بحوالى ٠,٥ بوصة من الفاسبر المعقم ثم تحضن لمدة ٤٨ ساعة على ٥٥ درجة مئوية- تسجل النتائج كبكتريا ثرموفيلية لا هوائية غير منتجة لغاز كبريتور الأيدروجين .

٣- بيئة آجار السلفيت :

- تربتون ١٠ جرام
- كبريتات الصوديوم اللامائية ١ جرام
- آجار ٢٠ جرام

ـ ماء مقطر ١ لتر

ـ تصب فى أنابيب حوالي ١٢مل ويوضع فى كل أنبوبة مسمار حديد . تعقم على درجة ١٢١ درجة مئوية لمدة ٢٠ دقيقة فى الأنابيب المحضرة **ويجب استعمالها قبل مضى أسبوع من تحضيرها** .

٤ ـ بيئة الكبد السائل :

ـ يضاف ٥٠ جرام من الكبد المجزأ على ١ لتر من الماء المقطر ويغلى ببطء لمدة ساعة مع ضبط درجة الـ pH إلى ٧ ويغلى ثانية لعدة دقائق ثم يرشح خلال شاش الجبن لفصل أجزاء الكبد ويكمل المحلول المرشح إلى ١ لتر باستعمال الماء المقطر .

ـ يضاف ١٠جم ببتون ، ١ جرام فوسفات ثنائي البوتاسيوم ويضبط التفاعل إلى pH ٧ ، ينقل ٠,٥ بوصة من أجزاء الكبد المتبقية إلى قاع أنبوبة الاختبار يغطى بالمحلول لحوالي ١٠ مل ويعقم على درجة حرارة ١٢١ °م لمدة ٢٠ دقيقة وقبل استعمال الأنابيب يسخن بالبخار لمدة ٢٠ دقيقة .

اختبار رقم (٣٨)

الكشف عن وجود بكتريا القولون النموذجى : E. Coli

بكتريا القولون النموذجى :

يؤخذ ١ مل من التخفيف وذلك قبل عملية التسخين والغليان فى أنبوبة إختبار تحتوى على بيئة اللاكتوز بها أنبوبة درهام ويجب ألا يقل عدد الأنابيب المستعملة لكل تخفيف عن ٥ أنابيب وفى حالة ظهور غاز بأنبوبة درهام فيجرى إختبار تأكيدي للكشف عن بكتريا القولون وذلك بعمل تخطيط على بيئة **الميوسين أزرق الميثلين** ثم يحضن على درجة ٣٥ °م – وعند ظهور لون الكوبيا بعد ٢٤ ساعة يدل ذلك على وجود بكتريا القولون – فى حالة وجود المجاميع ذات اللون الكوبيا (أسود مع لمعان معدنى مخضر) يجرى عليها الاختبارات التأكيدية التالية :

إختبار الإندول :

يلقح من المجاميع المشتبه فيها فى **بيئة التربتون** ثم تحضن الأنابيب على درجة ٣٧ °م لمدة ٤٨ ساعة ثم يختبر لوجود الأندول بوضع نقط من محلول أيرلنج أ مع بعض نقط من محلول أيرلنج ب – فى حالة وجود الأندول يتكون لون أحمر وردى .

إختبار أحمر الميثايل :

يلقح من المجاميع المشتبه فيها فى بيئة مرق ببتون فوسفات الجلوكوز ثم تحضن الأنابيب على درجة ٣٧ °م لمدة ٢–٥ أيام ثم يضاف ٥ نقط من دليل أحمر الميثيل إلى الأنبوبة وتمزج جيدا – وجود لون أحمر يدل على أن الإختبار موجب بينما اللون الأخضر يدل على أن الاختبار سالب .

إختبار السترات :

يلقح من المجاميع المشتبه فيها فى بيئة السترات ثم تحضن على درجة ٣٧ °م لمدة ٤ أيام – بعد فترة التحضين يشاهد النمو من عدمه .

٥ ـ البيئة المستخدمة (بيئة السترات) :

ـ فوسفات الصوديوم والأمونيوم ١,٥ جم

ـ فوسفات البوتاسيوم ١ جم

ـ سترات الصوديوم ٣ جم

ـ كبريتات الماغنسيوم ٠,٢ جم

ـ ماء مقطر ١ لتر

ـ تذاب المكونات فى الماء – تعبأ فى أنابيب ٨-١٠ مل وتعقم على درجة ١٢١ °م لمدة ١٥ دقيقة – درجة الـ pH ٦,٧ .

التدريب العملى :

أمامك مجموعة من الأغذية والمطلوب التأكد من خلوها من بكتريا القولون النموذجي؟

٦ ـ بيئة التربتون :

ـ تربتون ١٠ جم

ـ مستخلص اللحم ٣ جم

ـ ماء مقطر ١ لتر

ـ تذاب المكونات فى الماء بالتسخين – تعبأ فى أنابيب بواقع ٥ مل تقريبا – تعقم لمدة ١٥ دقيقة على درجة ١٢١ °م – درجة الـ pH ٧,٢ .

٧ـ بيئة إيوسين أزرق الميثلين : (إى إم بى EMB) :

ـ ببتون ١٠ جم

ـ لاكتوز ١٠ جم

ـ فوسفات ثنائي البوتاسيوم ٣ جم

ـ صبغة الايوسين ٠,٤ جم

obeikandl.com

ـ أزرق الميثلين ٠,٠٦٥ جم

ـ آجار ١٣ جم

ـ ماء مقطر ١ لتر

ـ تستعمل هذه البيئة خاصة للكشف عن بكتريا القولون حيث تعطى لون طوبى مع بكتريا القولون النموذجى – وتوجد هذه البيئة محضرة فى عبوات خاصة حيث يؤخذ منها حوالي ٣٦ جم لكل لتر ماء مقطر ثم تعقم على درجة حرارة ١٢١ °م لمدة ١٠ دقائق ودرجة pH النهائية للبيئة تكون ٧,٦ .

٨ـ بيئة بطاطس الآجار :

ـ شوربة البطاطس ٢٠٠ مل

ـ دكستروز ٢٠ جرام

ـ آجار ١٥ جرام

ـ ماء مقطر ٨٠٠ مل

ـ حمض طرطريك ١٠%

ـ الـ pH = ٣,٥

تذاب تلك المكونات بتسخينها فى الماء لدرجة الغليان ثم تصب فى أنابيب أو دوارق مخروطية وتعقم على درجة حرارة ١٢١ °م لمدة ١٥ دقيقة .

٩ـ بيئة أحمر الميثايل وفوجس بروسكور :

(بيئة مرق ببتون فوسفات الجلوكوز) :

ـ ببتون ٧ جم

ـ دكستروز ٥ جم

ـ فوسفات بوتاسيوم ٥ جم

ـ ماء مقطر ١ لتر

obeikandl.com

تذاب المكونات فى الماء بالتسخين – تعبأ فى أنابيب وتعقم لمدة ١٥ دقيقة على درجة ١٢١ °م – درجة تركيز أيون الأيدروجين (PH ٦,٩)

١٠ ـ بيئة اللاكتوز السائلة :

ـ مستخلص لحم ٥ جم

ـ لاكتوز ٠,٥ جم

ـ ماء مقطر ١ لتر

ـ تذاب المكونات بتسخينها مع الماء لدرجة الغليان ثم يضاف السكر بعد عملية التسخين ويصب فى أنابيب الإختبار وذلك بعد وضع أنبوبة درهام فى كل أنبوبة – تعقم الأنابيب على درجة حرارة ١٢١ °م درجة مئوية لمدة ١٠ دقائق (pH ٦,٧) .

obeikandl.com

(١)اختبار رقم (٣٩)

الكشف عن البكتريا العنقودية وميكروب السالمونيلا

Staph. Bacteria & Salmonella

تجهيز العينة :

يوزن ١١ جم من العينة فى زجاجة أو دورق مخروطى معقم سعة ٢٥٠ مل على الأقل ويضاف ٩٩ مل ماء مقطر معقم – تترك العينة حتى تتشرب بالماء لمدة ٣٠ دقيقة على درجة حرارة الثلاجة ثم ترج العينة بشدة لمدة دقيقتين .

الكشف عن البكتريا العنقودية (الاستافيلوكوكاس اوريس) :

يجرى عمل تخطيط من العينة السابق تحضيرها فى أطباق بترى معقمة محتوية على بيئة آجار الدم – تحضن الأطباق على درجة حرارة ٣٢ °م لمدة ٣ أيام – تفحص بعد ذلك مجاميع البكتريا العنقودية .

لا بد أن تكون المجاميع المعزولة موجبة لصبغة جرام ، مخمرة لسكر الماليتول وموجبة لاختبار التجمع .

الكشف عن ميكروب السالمونيلا :

يوضع حوالي ٢ جم من المادة الغذائية فى ٨ مل من بيئة **مرق السيلينيت** (١٥) وتمزج جيدا . وتحضن على درجة حرارة ٣٧ °م لمدة ١٦–٢٤ ساعة ثم يجرى تخطيط منها على سطح بيئة آجار سلفيت البزموث المتلائ – تحضن أطباق إس . إس آجار على درجة حرارة ٣٧ °م لمدة٢٤ ساعة.

تلاحظ الحركة وتكوين كبريتور الأيدروجين والاندول – المجاميع المشتبه فيها تجرى عليها الاختبارات المصلية وذلك أما بطريقة الأنبوبة أو الشريحة .

التدريب العملى :

أمامك عينات من السردين والسلامون **المعلب والمطلوب تحديد مدى وجود البكتريا العنقودية وكذلك ميكروب السالمونيلا ؟**

بيئات وكواشف أخرى

١١- محلول ايرليك ـ بوهم :

أ- بارا ثنائي الميثايل أمينو بنزالدهيد ١ جرام

- كحول أيثايل (٩٥%) ٩٥مل

- حمض أيدوركلوريك مركز ٢٠ مل

يذاب الألدهيد في الكحول ثم يضاف الحامض مع التقليب المستمر.

ب ــ فوق كبريتات البوتاسيوم المشبعة.

١٢- كشاف أحمر الميثايل :

ــ أحمر الميثايل ٠,١ جرام

- كحول ٩٥% ٢٥٠ مل

- ماء مقطر ٢٥٠ مل

- يذاب أحمر الميثايل في الكحول ثم يضاف الماء ويرشح.

١٣- محلول الفانا فثول :

ــ الفانافثول ٥ جرام

ــ كحول ٩٥% ١٠٠ مل

١٤- كشاف بروموكريزول بربل :

ــ يوزن ٠,١ جرام من البروموكريزول بربل ويطحن مع ٣,٧ مل محلول ايدوروكسيد الصوديوم (٠,٠٥ مل) يكمل إلى ٢٥ مل بالماء المقطر. للاستعمال خفف المحلول السابق ١مل منه + ١ مل ماء مقطر .

١٥- مرق السلينيت :

ــ ببتون ٥ جرام

obeikandl.com

ـ لاكتوز	٤ جرام
ـ سلينيت صوديوم	٤ جرام
– فوسفات الصوديوم الحامضية	١٠ جر
– ماء مقطر لتر لكل	٢٣ جرام
– درجة الحموضة	٧,٢ ± ٠,٢

١٥- أجار سلفيت بزمز :

ـ ببتون	١٠ جرام
ـ مستخلص اللحم	٥ جرام
ـ دكستروز	٥ جرام
– فوسفات ثنائي الصوديوم	٤ جرام
– سلفيت الحديدوز	٠,٣ جرام
– دليل سلفيت بزموث	٨ جرام
– أخضر البريلانتين	٠,٠٢٥ جرام
– آجار	٢٠جرام
– ماء مقطر لتر لكل	٥٢ جرام
– درجة الحموضة pH	٧,٦

١٦- آجار سالونيللا شجلا (اس. اس. آجار) :

ـ مستخلص اللحم	٥ جرام
ـ ببتون	٥ جرام
– لاكتوز	١٠ جرام
ـ ملح بيل (Bile)	٨,٥ جرام

obeikandl.com

- سترات الصوديوم ٨,٥ جرام
- فوسفات ثلاثي الصوديوم ٨,٥ جرام
- سترات الحديديك ١ جرام
- أخضر البريلانتين ٠,٠٠٠٣٣ جرام
- أحمر متعادل ٠,٠٢٥ جرام
- آجار ١٣,٥ جرام
- ماء مقطر لتر لكل ٦٠ جرام
- درجة الحموضة ٧ ± ٠,٢

١٧- آجار أخضر البريلانت :

- مستخلص الخميرة ٣ جرام
- ببتون ١٠ جرام
- كلوريد الصوديوم ٥ جرام
- لاكتوز ١٠ جرام
- سكروز ١٠ جرام
- أحمر الفينول ٠,٠٨ جرام
- آجار ٢٠,٠ جرام
- أخضر البريلانتين ٠,٠١٢٥ جرام
- آجار ٢٠ جرام
- ماء مقطر لتر لكل ٥٨ جرام
- درجة الحموضة ٦,٩

obeikandl.com

١٨- بيئة سلفيد أندول موتلتي :

ببتون	٣٠جرام
مستخلص اللحم	٣ جرام
حديد ببتونيد	٠,٢ جرام
ثلاثي كبريتات الصوديوم	٠,٠٢٥
آجار	٣ جرام
ماء مقطر لتر لكل	٣٦جرام
تركيز أيون الأيدروجين	٧,٣

١٩- بيئة الأزيد ـ جلوكوز ـ جليسرول :

بيتون	٢٠جرام
جلوكوز	٥جرام
فوسفات ثنائي البوتاسيوم	٤جرام
أزيد صوديوم	٠,٥جرام
كلوريد الصوديوم	٥جرام
جليسرول	٥مل
ماء مقطر	لتر
درجة الحموضة	٦,٩

obeikandl.com

المصطلحات الفنية للاختبارات الميكروبيولوجية :

Potato Dextrose agar	آجار دكستروز بطاطس
Broth A.B.T	مرق أ.ب.ت
Brilliant Green Lactose Broth	مرق لاكتوز الأخضر اللامع
Eosine methylene blue (E.M.B)	أيوسين أزرق ميثلين
Ehrlich- boehm solution	محلول ايرليك بوهم
Methy Red and Voges Proskauer (MR.VP)	بيئة أحمر الميائل وفوجز بروسكور
Indicator	دليل
Koser's citrate medium	بيئة سترات كوسر
Staphylococcus medium No.110	بيئة إستافيلوكوكس /١١٠
Bromocresol Purple Indicator	دليل بروموكريزول بيربل
Selenite Broth	مرق السلينيت
Bismuth sulfite Agar	آجار سلفيت بزوموث
Sal. Shigella Agar (S.S. Agar)	آجار سالمونيللا . شجلا
Brilliant Green Agar (B.G. Agar)	آجار أخضر البريانت
Sulfide lndol Motility (SIM Medium)	بيئة سلفيد أندول موتلتي
Azide- Glucose-glycerol broth	مرق الأزيد ــ جلوكوز ــ جليسرول
Reagent	كاشف

obeikandl.com