التحليل الميكروبيولوجى للأغذية

ا.د محمد عبد الرازق النواوى

استاذ الميكروبيولوجى

قسم علوم الأغذية – كلية الزراعة

جامعة عين شمس

ا.د.ابراهيم رزق سيد أحمد

استاذ الصناعات الغذائية

قسم علوم الأغذية – كلية الزراعة

جامعة عين شمس

www.oxpdf.com

2011

المحتويات

	رقم الصفحة
مقدمة	٤
تعريفات عامة	٥
الخطوات الاساسية لأخذ العينات	٦
طرق نقل عينات الغذاء للتحليل الميكروبيولوجى	٨
تقسيم الكائنات الحية الدقيقة بدائية النواة الهامة فى مجال الغذاء طبقا لدرجة خطورتها	١٠
معمل التحليل الميكروبيولوجى للأغذية	١١
الأساسيات التى يجب أن يراعيها العاملين بمعمل ميكروبيولوجى الأغذية	١٦
العوامل التى تؤثر على النشاط الميكروبى فى الاغذية	١٩
البكتريا الهامة التى تحدد سلامة الأغذية وتأثيرها على صلاحية الغذاء للاستهلا ك	٣٣
أولا: شعبة**Firmicutes**	٣٣
- عائلة**Lactobacillaceae**	٣٤
- عائلة**Micrococcaceae**	٤٦
ثانيا: شعبة**Gammaproteobacteria**	٤٧
- عائلة **Enterobacteriaceae**	٤٧
الطرق الميكروبيولوجية المستخدمة لتحليل عينات الغذاء	٥١
أولا:- طرق عد البكتريا والخمائر والفطريات	٥١
١- الطرق المستخدمة فى عد البكتريا الهوائية الحية المحبة لدرجة الحرارة المتوسطة	٥١
٢- طريقة تقدير الاعداد الكلية من البكتريا اللاهوائية الحية	٥٦
٣- تقدير اعداد البكتريا الثرموفيلية (المحبة لدرجة الحرالرة المرتفعة)	٥٧
ثانيا:- تقدير بكتريا القولون بواسطة العد الكلى الاحتمالى	٦٠
ثالثا:- الكشف عن السالمونيلا	٦٦
رابعا:- الكشف عن**Enteropathogenic *E.coli***	٧٢
خامسا:- تنمية وعد البكتريا ***Staphylococcus aureus***	٧٦
سادسا:- عزل وتعريف مجموعة**Enterococci**	٨٠
سابعا:- الكشف عن***Listeria monocytogenes***	٨٤
ثامنا:- تنمية بكتريا***Vibro parahaemolyticus***	٨٦
تاسعا:- تنمية وعد بكتريا***Bacillus cereus***	٩٠
عاشرا:- تنمية وعد بكتريا***Clostridium perfrigens***	٩٣

www.Oxpdf.com

احد عشر:- التعرف على ميكروب *Clostridum botulinum* ٩٦
الكشف عن الفيروسات فى عينات الغذاء ٩٩
ملاحق ١٠٦
ملحق (١) الحدود الميكروبيولوجية لبعض الكائنات فى بعض الاغذية ١٠٧
أ- اختبارات سلامة الغذاء ١٠٧
ب- محددات الشئون الصحية للتصنيع ١١١
ملحق (٢) **Culture media** ١١٤
- **Reagents, Indicators and Stains** ١٣٢
ملحق (٣) الاجهزة المقترحة لمعمل ميكروبيولوجى الاغذية ١٣٤
ملحق (٤) الادوات المقترحة لمعمل ميكروبيولوجة الاغذية ١٤٠
ملخق (٥) شكل تخطيطى لمقترح لترتيب معمل صغير للتحليل الميكروبيولوجى للأغذية وتوزيع الاجهزة به ١٤٣
مراجع مختارة ١٤٦

www.Oxpdf.com

مقدمة

اصبح الإهتمام بجودة وسلامة الغذاء من الأساسيات الحياتية للمستهلك فى السنوات العشر الأخيرة على مستوى العالم بصفة عامة نتيجة العديد من العوامل بعضها يرجع الى العولمة ومشاكلها والبعض الآخر نتيجة زيادة إهتمام المنتج والمصنع و المستهلك بسلامة الغذاء. ومن اكثر العناصر التى تهم المستهلك هى الخلو الغذاء من الميكروبات المرضية و إفرازاتها نتيجة لإنتشار الكثير من الأمراض من خلال الغذاء . فيوجد اكثر من ٢٠٠ مرض يمكن انتقالهم من خلال الغذاء . وقد ازداد انتشار بعض امراض الغذاء فى صورة اوبئة فى السنوات العشر الأخيرة نتيجة العولمة فى الإنتاج والتصنيع والتصدير بالإضافة الى تغير سلوك المستهلك فى النمط الغذائى.

ولكى نرضى احتياجات المستهلك ونؤكد على السلامة والجودة فى مجال الغذاء ، فإنه يجب ان يتوافر نظام متكامل لطرق التحليل الميكروبيولوجى و الذى يمكن للصناعة والجهات الإنتاجية والرقابية الإعتماد عليها فى الحكم النهائى على الجودة والسلامة ولتقليل مصادر الخطر فى سلسلة إنتاج الغذاء .

لذلك الهدف من هذا الكتاب تعريف القارئ ببعض التعبيرات الخاصة بالتحاليل الميكروبيولوجية ثم توضيح الاقسام المختلفة للكائنات المختلفة طبقا لدرجة خطورتها على صحية الغذاء وصحة القائم على التحليل والبيئة . يلى ذلك تبيان المواصفات المختلفة لمعامل التحليل الميكروبيولوجى ثم العوامل التى تؤثر على نمو الميكروبات فى الغذاء . ثم مناقشة للطرق التقليدية القياسية والطرق السريعة المستخدمة للكشف عن بعض الكائنات فى الغذاء .

وفى النهاية نأمل أن يقدم هذا الكتاب إضافة نوعية للمكتبة العربية فى مجال التحليل لجودة وسلامة الغذاء ونأمل للدارسين فى أن يتحقق لهم الأهداف المرجوة من هذا المقرر لتنمية قدراتهم الذهنية والفنية والتقنية فى هذا المجال.

والله الموفق،،،،

المؤلفان

سبتمبر ٢٠١١

www.o-pdf.com

تعريفات عامة

قبل التحدث عن التحاليل الميكرروبيولوجية يجب معرفة بعض التعريفات الآساسية المستخدمة فى التحاليل الميكروبيولوجية:

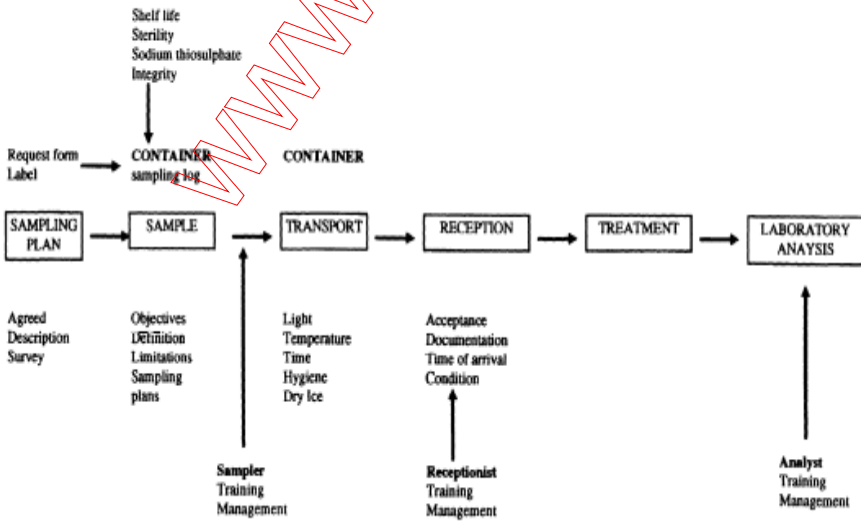
المادة المطلوب تقديرها **Analyte** وهى العنصر او الميكروب المراد تقديره او افرازاته.

المادة الغذائية **Food Matrix** تتمثل فى المنتج او عناصره التى سوف يتم التحليل فيها.

جهات التقييس **Standardisation body** والمقصود بها الجهات الدولية او الإقليمية او المحلية المسئولة عن وضع الطرق القياسية

العينة **sample**:- ويقصد بها جزء من منتج غذائي مكون من وحدة واحدة أو عدد من الوحدات أو تم سحبه بوسائل مختلفة أو كمية هامة من غذاء ما، بهدف تقديم معلومات عن المنتج الغذائى او عناصره المطلوب تحليلها أو دراسة لبحث ما بغرض اتخاذ قرار بشأن هذا المنتج الذى سحبت منه العينة أو الاجابة عن سؤال ما يتعلق بعملية الانتاج وتعتمد جودة النتائج النهائية ومدى مطابقتها للحدود على مدى جودة اخذ العينة.

وتعتمد جودة النتائج على آخذ العينة ومستقبلها ومن سوف يقوم بالتحليل ويوضح شكل ١ طريقة اخذ العينة والعوامل التى تؤثر عليها بدءا من اخذها ونقلها واستقبالها ومعاملات الإعداد ثم التحليل.



شكل ١ العوامل المؤثرة على عملية اخذ العينة

www.oxpdf.com

عينة ممثلة:- يقصد بها العينة التي يتم فيها تمثيل كافة خواص التشغيله التي تم السحب منها. وخاصة في حالة العينة العشوائية البسيطة حيث يمثل بها كل الوحدات او العينات الأولية من التشغيله بنفس احتمال تمثيلها بالعينة.

التشغيلة Lot:- يقصد به مجموعة من منتج ما أو مجموعة محددة من المنتجات تم الحصول عليها من عملية معينة تحت ظروف متماثلة عمليا ومن مكان محدد وفي غضون فترة إنتاج محددة.

سحب العينات: هى العملية اللازمة للقيام بإجراء مخطط يمكن من خلاله اختيار أو سحب عينات منفصلة من التشغيله ، بغرض الحصول على المعلومات اللازمة عنها من حيث الجودة والسلامة.

الهدف من سحب العينات:

يتم سحب العينات لعدد من الأسباب منها:

١. التحقق من مدى مطابقة الغذاء للمواصفات والتشريعات المنصوص عليها وقبوله او رفضه.
٢. التحقق من سلامة المنتج النهائى من عدم احتواءه على تلوث بيولوجي يؤثر على صحية مستهلك الغذاء في حالة عدم وجود معايير بيولوجية محددة لمنتج غذائى محدد.
٣. تحديد مدى التلوث الميكروبي ونوع الميكروب او سمومه المحتمله فى المنتجات الغذائية المعروضة في الأسواق ومدى اثره على سلامة المستهلك.
٤. مراقبة سلسلة انتاج الغذاء بغرض التحقق من مدى تنفيذ نظم جودة إدارة سلامة الغذاء.
٥. التحقق من عدم احتواء المنتج الغذائى ومكوناته على مواد مثبطة للميكروبات يمكن أن تؤثر على صحية المنتج الغذائى.
٦. قيام منتج الغذاء بمتابعة حالة اشتباه لفساد او وجود ميكروب مرضى فى مصنعه.
٧. عزل المسببات فى حالات الإشتباه سواء في حالة تفشى اوبئة او وجود بلاغات من مستهلكين تكون راجعة لحالات تسمم غذائى.
٨. تقييم المخاطر الميكروبيولوجية الطارئة او الجديدة للحفاظ على صحية المستهلك.
٩. متابعة الحاله الصحية و البيئية لسلسلة انتاج الغذاء.

الخطوط الرئيسية لأخذ العينات:

لكى يتم تنفيذ عمليات سحب واخذ العينات بجب إتباع احد الخطط الآتية لسحب العينات من منتج غذائي أو المواد الأساسية في التصنيع:

www.0pdf.com

عينات عشوائية – عينات انتقائية – عينات اشتباه

حيث أن عملية سحب العينات تتم بغرض الحصول على معلومات مطلوبة. ويعتبر سحب العينات من غذاء ما واحدة من أهم القضايا الرئيسية في تحديد خطة سحب العينات طبقا لما هو مستهدف من التحليل ، مما سيحدد طريقة تفسير النتائج المتحصل عليها، وحتى يمكن إجراء مقارنة للمعلومات من عدمه سواء بين أنظمة مختلفة أو بين بلدان مختلفة.

<u>سحب العينات بالطريقة العشوائية</u>: يتم سحب العينة بطريقة عشوائية ، وتعتبر ممثله للغذاء الذى تم سحب العينة منه، ويمكن اخضاع نتائج الاختبارات المعملية لها طبقا للأسلوب الإحصائي، حيث أن كل وحدة في الإطار العام لسحب العينات لها احتمال خاص.

تسمح هذه الطريقة بتوفير بيانات يمكن تنفيذها عن طريق الاستدلال الإحصائي وبالتالى يمكن مقارنة نتائج التحاليل وتستخدم هذه الطريقة فى الحكم على الجودة والسلامة للأغذية الموجودة بالأسواق. كما يمكن استخدامها في حالة حدوث مشكلة من غذاء ما على المستوى القومى او الأقليمى او الدولى.

<u>سحب العينات بالطريقة الانتقائية :</u>

يتم سحب العينة بتخطيط مسبق فى إختيار العينة وذلك لتحديد موقف المنتج او مكوناته كما فى حالات الغش على سبيل المثال. فى هذه الحالة يتم سحب العينة بطريقة متحيزة وموجهة لمنتج محدد او مصنع محدد اومجموعة من كل منها خاصة اذا كان الهدف من التحليل ملوث عالى الخطورة .

<u>سحب عينات الاشتباه:</u>

يتم سحب العينة بناء على حكم مسبق ومن خلال خبرة مسبقة فيما يتعلق بهذا المنتج او النوعية من المنتجات اوالمواد الداخلة فى الإنتاج او التصنيع. ويتم جمع هذه النوعية من العينات فى حالة انتشار وباء ما او وجود مشكلة تختص بسلامة الغذاء .

وبصفة عامة يتحدد اسلوب سحب العينات طبقا للغرض المطلوب اتخاذ القرار بشأنه ونوعية الكائن الملوث او إفرازاته.

<u>خطة سحب العينات</u>

ينبغي اختيار خطة سحب العينات طبقا للحدود المكروبيولوجية المحددة بالتشريعات والمواصفات ووفقا لمصدر الخطر من المنتج الغذائى وطرق تداوله ونوعية المستهلك النهائى.

www.0xpdf.com

ويوجد طريقتين تعتبران الأكثر استخداما فى الفحص الميكروبيولوجى للغذاء وهما طريقة ثنائية الفئة وطريقة ثلاثية الفئة ويمكن توضيحهم فى الآتى:

١- خطة أخذ العينات ثنائية الفئة ، ونقسم فيها العينات (عدد وحدات العينة الواجب تحليلها = n ن) والتي تم اختبارها إلى فئتين : مرضية وغير مرضية ، على أساس ان = (M (m))

{ حيث m م تعبر عن مستوى الحد الميكروبى المطلوب تحقيقه فى المنتج الغذائى و M ق تعبر عن قيمة او مستوى الحد الميكروبى الذى يجب الا يصل اليه او يزيد فى اية وحدة من وحدات العينة } .

٢- خطة أخذ العينات ثلاثية الفئة ، تقسم فيها العينات التي تم اختبارها إلى ثلاث فئات : مرضية ومقبولة وغير مرضية ، وتستخدم في حالة اذا كانت النتائج مقبولة لبعض العينات التي قد تعدت فيها الحد الادنى (m) ولم تصل لمستوى خطورة احتمال التلوث الميكروبي (M) .

<u>طرق نقل عينات الغذاء للتحليل الميكروبيولوجى:</u>

يجب مراعاة نوعية العينة أثناء نقلها فالعينات المجمدة يجب نقلها فى صورتها وعدم اعطاء الفرصة لكى تسح وكذلك العينات المبرة يجب نقلها مبردة ويجب مراعاة ظروف التعقيم عند اخذ العينات للتحليل.

بصفة عامة يجب مراعاة احتياجات الميكروب المطلوب تحليله فى حالات الإشتباه فمثلا نجد ان الخلايا الخضرية لبكتريا *Clostridium perfringens* تكون حساسة للتجميد.

الآغذية المجمدة تنقل على -٢٠°م والطازجة يمكن نقلها على درجة حرارة الغرفة الانه يجب تحليلها فى غضون ٦ ساعات واذا زاد الوقت عن ذلك فيجب تبريدها من ٤-١٠°م حتى ٢٤ ساعة ويجب ذكر درجة الحرارة والمدة التى قضتها العينة قبل التحليل فى تقرير العينة

<u>المشاكل التى تقابل عمليات التحليل الميكروبيولوجى فى مجال الغذاء:</u>

i. عدم مطابقة الطرق المرجعية بين جهات التحليل المختلفة

ii. اختلاف الطرق الخاصة بالكشف عن الميكروب المرضى الواحد من مجموعات غذائية لأخرى وبين جهات التقييس المختلفة (AOAC تشمل ايضحات افضل من ISO او NordVal) مثلما فى حالة عزل Campylobacter من اللبن.

www.oxpcr.com

iii. مستوى الكمية الملقحة من العينة وهذه تختلف بإختلاف الميكروب والمادة الغذائية.

iv. عدد السلالات من التى يحتاجها الإختبار فى اختبارات الكشف عن حساسية الميكروبات

v. عدد اجزاء العينة المطلوب اختبارها

vi. الدليل على فاعلية الإختبار

vii. اختلاف مصدر السلالة المستخدمة للحكم على كفاءة الطريقة

viii. اختلاف طريقة اكثار الكائنenrichment method

ix. الطرق السيريولوجية والمناعية تعطى نتائج مختلفة من معمل لمعمل طبقا لعوامل كثيرة سوف نتعرض لها فى مكانها.

x. الكثير من الطرق المرجعية يتم مراجعتها دوريا مما يجعل اختلاف بين المعامل

xi. وجود الميكروبات فى توزيع عشوائى غير متجانس داخل الغذاء.

xii. يكون التوزيع فى بعض الاماكن داخل نفس العينة فى صور ميكروبية مختلفة حيث ان الميكروب قد يكون فى صورة ميته او فى صورة حية ، بالنسبة للصورة الحية قد سكون فى صورة حية قابلة للنمو على البيئة المستخدمة فى التحليل او قد يكون حى ولكن لايستطيع النمو على البيئة المستخدمة ، كما قد يكون فى صورة مضرورة وبالتالى فله احتياجات خاصة.

www.oxpdf.com

تقسيم الكائنات الحية الدقيقة بدائية النواة الهامة فى مجال الآغذية طبقا لدرجة خطورتها

Risk group classification of prokaryotes which important in food chain

تقسم الكائنات بدائية النواة طبقا لدرجة خطورتها على صحة مستهلك الغذاء وطبقا لمدى خطورتها على صحة العاملين بمعمل التحليل وطبقا لوجود طرق للوقاية او العلاج منها الى المجموعات التالية:

لمجموعة الأولى :تضم الكائنات التى لاتسبب امراض للإنسان. وتشمل الكائنات غير المذكورة فى المجموعات التالية.

المجموعة الثانية: تضم الكائنات التى قد تسبب امراض للإنسان والتى قد تمثل خطورة على العاملين بالمعامل ولكن لاتنتشر بالمجتمع. ونادرا مايمثل العمل بها خطورة على العاملين لوجود طرق وقاية او علاج.وتشمل الكائنات التالية التى يمكن ان تنتقل من خلال الغذاء:

i. *Arcanobacterium pyogenes* (*Actinomyces pyogenes*, *Corynebacterium pyogenes*). *Bacteroides fragilis*.

ii. *Campylobacter fetus*. *Campylobacter jejuni*. *Campylobacter* spp. *Clostridium botulinum*. *Clostridium perfringens*. . *Corynebacterium diphtheriae*. . *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Corynebacterium* spp. *Edwardsiella tarda*.

iii. *Enterobacter aerogenes* (= *Klebsiella mobilis*). *Enterobacter cloacae*. *Enterobacter*(=*Cronobacter*) *sakazkii* , *Enterobacter* spp.*Enterococcus* spp. *Escherichia coli*, except non pathogenic strains and verocytotoxigenic strains (group 3).

iv. *Helicobacter pylori* (*Campylobacter pyloridis* (*sic*), *Campylobacter pylori*, *Campylobacter pylori* subsp. *pylori*).

v. *Listeria ivanovii*. *Listeria monocytogenes*.

vi. *Morganella morganii* (*Proteus morganii*). *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (*Mycobacterium paratuberculosis*). .

vii. *Pseudomonas aeruginosa*.

viii. *Rickettsia rickettsii* (group 3) and *Rickettsia typhi* (group 3).

ix. *Salmonella enterica* subsp. *arizonae* (*Salmonella arizonae*, *Salmonella choleraesuis* subsp. *arizonae*). *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar

www.oxoid.com

Enteritidis (*Salmonella enteritidis*). *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Paratyphi A (*Salmonella paratyphi*), Paratyphi B, and Paratyphi C. *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium (*Salmonella typhimurium*). *Salmonella* spp., except *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhi (group 3). *Shigella dysenteriae*, except type 1 (group 3). .

ix. *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus*. *Streptococcus pyogenes*.

x. *Vibrio cholerae* (including El Tor). *Vibrio parahaemolyticus* (= *Beneckea parahaemolytica*).

Yersinia enterocolitica.

المجموعة الثالثة: تضم الكائنات التى تسبب امراض شديدة للإنسان وتمثل خطورة على العاملين بالمعامل وتمثل خطورة فى حالة انتشارها فى المجتمعولها طرق وقاية وعلاج.وتشمل الكائنات التالية التى يمكن ان تنتقل من خلال الغذاء:

i. *Bacillus anthracis*. ، *Brucella melitensis* (*sensu stricto*).. *Brucella melitensis* biovar Abortus (*Brucella abortus*). *Brucella melitensis* biovar Canis (*Brucella canis*). . *Brucella melitensis* biovar Suis (*Brucella suis*). .

ii. *Coxiella burnetii*.

iii. *Escherichia coli*, verocytotoxigenic strains (e.g. O157:H7, O103 0104:H4). . ،

iv. *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhi (*Salmonella typhi*). . *Shigella dysenteriae* type 1.

المجموعة الرابعة : تضم الكائنات التى تسبب امراض شديدة للإنسان وتمثل خطورة شديدة على العاملين بالمعامل وتسبب خطورة عالية عند انتشارها فى المجتمع لعدم وجود طرق وقاية او علاج. وهو لايضم بكتريا ولكن يضم الكائنات اللاخلوية مثل بعض انواع الفيروسات.

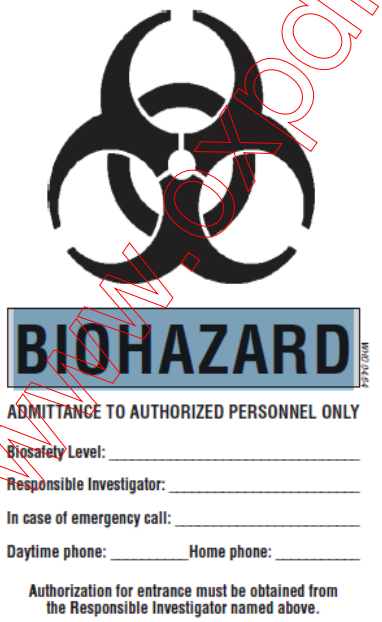
لايضم هذا التقسيم الكائنات الممرضة للنبات او الحيوان كما لايضم الكائنات المعدلة وراثيا .

ولكل مجموعة من هذه المجموعات احتياطات يجب اتباعها من حيث السلامة الحيوية فى المعامل التى تتعامل مع هذه المجموعات وذلك طبقا للعديد من الإتفاقيات والتشريعات الدولية المحددة فى هذا الشأن.

www.oxpdf.com

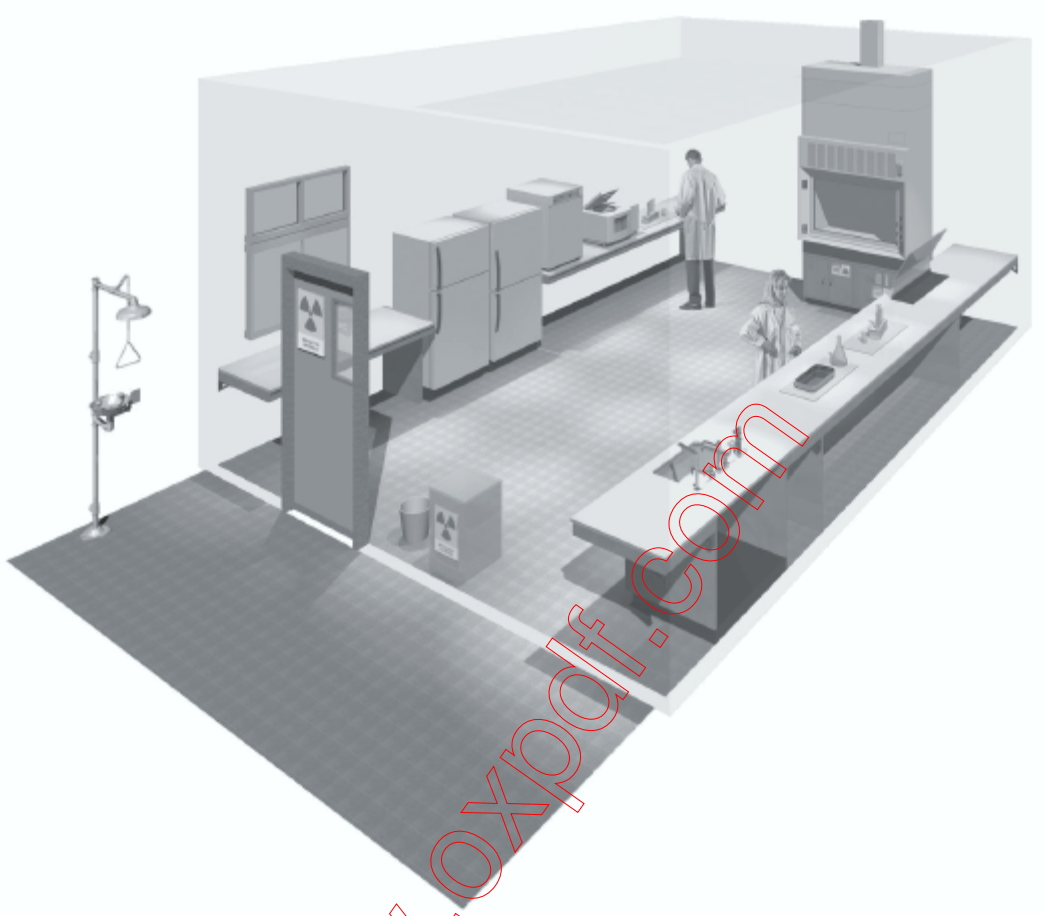
معامل التحليل الميكروبيولوجى للأغذية

يتحدد ترتيب معمل ميكروبيولوجى الأغذية طبقا لنوعية العينات ونوعية الميكروبات التى سوف يكلف بتحليلها وبصفة عامة يجب ان يوضع على باب المعمل بطاقة تشير الى مستوى الامان الحيوى للمعمل واسم مسئول المعمل والمسئول فى حالة حدوث مشكلة وكيفية التوصل اليه تلفونيا خلال الأربع وعشرون ساعة كما هو موضح فى شكل ٢.ويفضل ان تكون حجرة اعداد البيئات وتعقيمها خارج مكان التحليل ويجب ان يحتوى المعمل على اوتوكلاف ، فرن تعقيم ، وحدات تعقيم بالترشيح ، حمامات مائية ، حضانات هوائية ، وحدات تنمية لاهوائية بمشتملاتها ، جهاز قياس رقم الحموضة pH ، موازين ، جهازتقطير وازالة الايونات من الماء ، ثلاجات تبريد ، مجمدات ، مجنس للعينات ، ترمومترات ، عداد للمستعمرات ، ميكروسكوب ، وحدة تفاعل البلمرة التسلسلية بمشتملاتها PCR ،وحدة ELISA بمشتملاتها



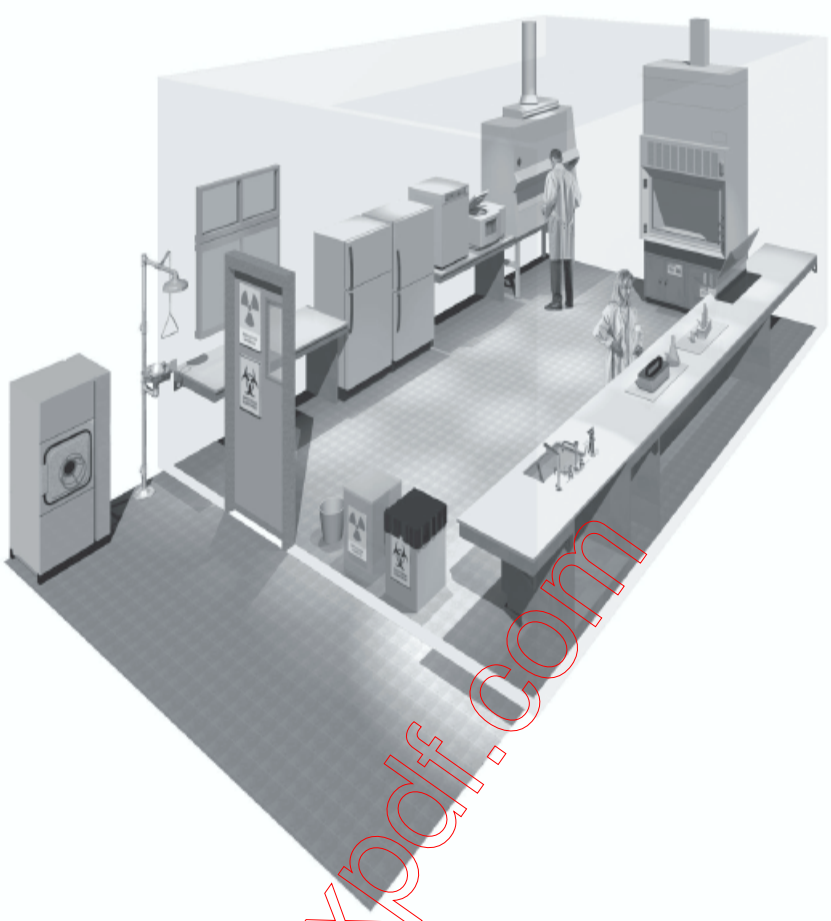
www.oxpdf.com

شكل ٢ يبين العلامة الواجب وضعها على باب المعمل لبيان مستوى الامان الحيوى للمعمل واسم المسئول وبيانات تحدد المسئولية



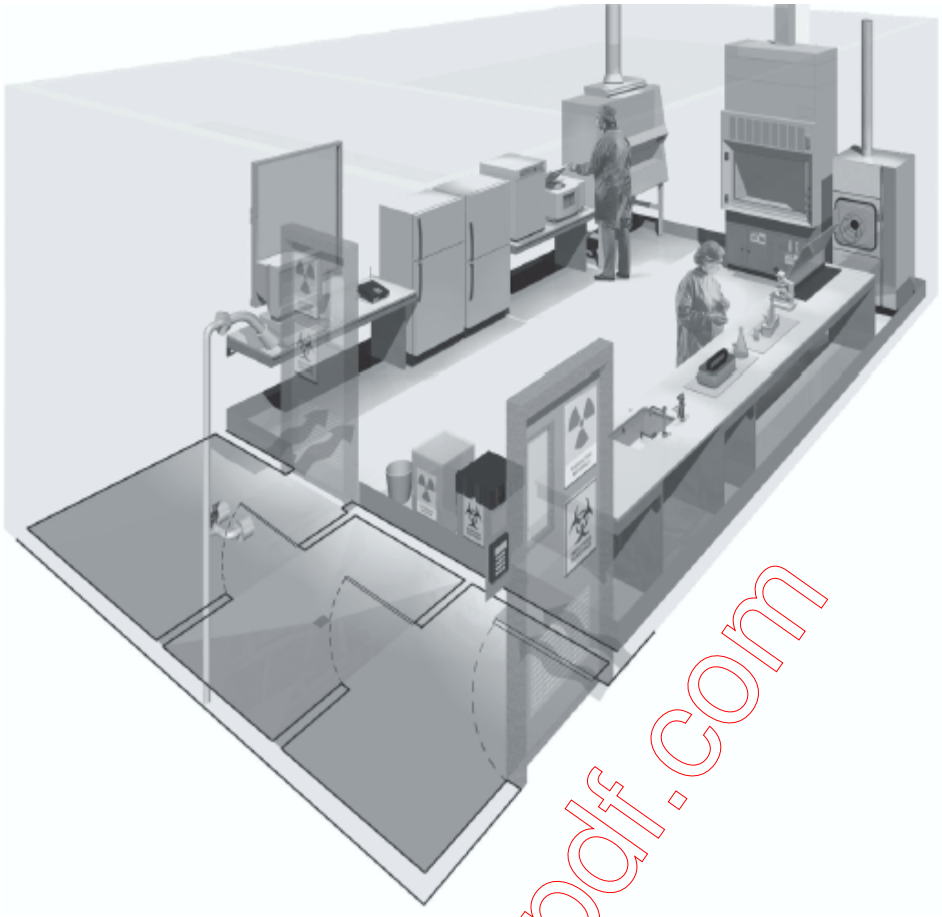
شكل ٣: يوضح ترتيب لمعمل ميكروبيولوجى مستوى درجة خطورة ١ ويلاحظ انه يمكن العمل به على طاولة المعمل ويستخدم فى التدريس والنشاط البحثى ومعامل صالات التصنيع. ويخضع فقط للإشتراطات العامة للعمل بالطرق الجيدة للميكروبيولوجى Good microbiological techniques (GMT)

www.oxpdf.com



شكل ٤: يوضح نموذج لترتيب معمل ميكروبيولوجى درحة خطورة ٢ ويلاحظ به ان العمل يتم من خلال كابينة متحكم فى هوائها وأن باب المعمل مغلق وموضح عليه بيانات الامن الحيوى كما انه يحتوى على وعائين لفصل المواد الملوثة عن المخلفات المعملية الأخرى · ويستخدم فى البحوث والخدمات الصحية الأولية والكشف والتحليل للكائنات درجة خطورة ٢ .ولايسمح بوجود هذه النوعية من المعامل بالقرب من صالات التصنيع الغذائى. وبجانب توفرالإشتراطات العامة للعمل بالطرق الجيدة للميكروبيولوجى ،يجب على العاملين استخدام ملابس خاصة بالمعمل وتركها بالمعمل قبل الخروج من المعمل.

www.cxpdf.com



شكل٥: يوضح نموذج لترتيب معمل درجة خطورة ٣ وبلاحظ ان المعمل معزول تمام ويتم الدخول له من حجرة خارجية لها باب مزدوج او من خلال معمل درجة خطورة ٢ ويتم تعقيم جميع المخلفات بواسطة اوتوكلاف داخل المعمل كما يحتوى على حوض مزود بصنبور ذاتى الفتح ويتم التعامل والتحكم فى الهواء قبل خروجه من المعمل كما يلبس العاملون ملابس خاصة مختلفة عن ملابس معامل درجة خطورة ٢ اثناء العمل ويتم التعامل مع العينات داخل كابينة الهواء المعقم وبأدوات مساعدة فى كل النشاطات بالمعمل .ويستخدم هذا المعمل فى البحوث او خدمات التحاليل الخاصة.

www.Oxpdf.com

ومن الاساسيات التى يجب ان يراعيها العاملين بمعمل ميكروبيولوجى الأغذية الآتى:

١) عدم تواجد اية افراد بالمعمل سوى المحللين فقط المسموح بتواجدهم ومسئول المعمل

٢) استخدام بالطو المعمل اجبارى داخل المعمل ويكون من القطن وليس الياف صناعية ويتم خلعه وكذلك اية ادوات حماية اخرى قبل الخروج من المعمل وغير مسموح بغير ذلك خاصة فى الاماكن التى يتم تداول غذاء بها كالمطعم.

٣) تستخدم الجوانتيات واية ادوات مساعدة اخرى لحماية المحلل .

٤) لايتم استخدام ماصات بالفم بل بالأدوات المساعدة.

٥) يتم اغلاق الشبابيك والآبواب فى حالة المعامل درجة خطورة ١ اثناء العمل.

٦) ممنوع منعا باتا اصطحال اية مأكولات او مشروبات الى المعمل او التدخين به.

٧) يتم تطهير المعمل مرة واحدة على الأقل يوميا.

٨) يتم ايقاف اية مراوح او تكييف اثناء تداول الميكروبات او العمل بها.

٩) يتم تعقيم اية مخلفات معملية او ادوات زجاجية قبل غسيلها لإعادة استخدامها.

١٠) يتم نقل المزارع الميكروبية والبيئات والمخلفات المعملية فى اوعية مبين عليها محتوياتها ومحكمة الغلق.

١١) المحافظة على الا يوجد تيار هواء قوى بالمعمل .

١٢) استخدام كابينة التلقيح والحضانات وخزانات الغازات لتقليل الخطى على المحللين من حيث الإصابة بالأمراض.

١٣) استخدام اوعية خاصة لبقايا المذيبات والمواد الخطرة وكذلك اوعية للزجاج المكسوراو بقايا الأدوات الحادة مثل سنون الحقن او المشارط.

تلك ملحوظات عامة لجميع المعامل فى مجال ميكروبيولوجى الأغذية بجانب الاحتياطات التى يجب مراعاتها فى المعامل مرتفعة الخطورة وكذلك ماتحدده خطة العمل بالمعمل .

ويفضل توافر الأجهزة والادوات الآتية بالمعمل درجة خطورة ١ مع مراعاة ان يتم المعايرة الدورية لها :

١- اوتوكلاف رأسى او افقى حساسية ٠،٠٥ بار ،درجة الحساسية ±١°م عند ١١٥و ١٢١°م.

٢- فرن تعقيم يصل الى ١٨٠°م ويحتفظ بهذه الدرجة لمدة ساعة على الأقل.

www.0xpdf.com

٣- حضانات درجات حرارة ٢٥-٥٠ °م مزودة بمروحة ، وحضانه ٤٤°م مزودة بمروحة.وحضانة تحت تبريد تعمل حتى ١°م

٤- حمامات مائية بدقة ١°م تعمل من ٢٠-٧٠°م و حمام مائى مزود بمضخة تقليب ماء يعمل على ٤٤°م.

٥- ترمومترات مقسمة ل٠،١ °م وحساسية ٠،١ °م زئبقية او كحولية

٦- نظام لتسجيل درجات الحرارة ومتصل بوحدة حاسب آلى

٧- جهاز تقطير مياه من زجاج بورسيليكات

٨- موازين حساسة احدها حساسية ١جرام وآخر حساسية ١ ملليجم

٩- جهاز لقياسpH بحساسية ٠،١ وحدة

١٠- مجنس عينات

١١- خلاط من الصلب غير القابل للصداء وقابل للتعقيم متغير السرعات

١٢- جهاز Stomacher لإعداد العينات سعة ٠،٥ الى ١ لتر

١٣- عداد مستعمرات

١٤- ثلاجات درجات حرارة حتى صفر مئوى ومجمدات تعمل على -٢٠°م ويفضل وجود مجمد على -٧٠°م

١٥- وحدة تعقيم بالترشيح تتحمل التعقيم باللهب او بالاوتوكلافويفضل ان تكون مزودة بمصفاة لحجز الشوائب

١٦- كابينة تلقيح آمنه حيوياbiohazard laminar flow

١٧- ميكروسكوب يفضل ان يكون فلورسنس او تباين الأطوار

١٨- جهاز ELISA كامل مع plate washers, plate readers

١٩- جهاز لتعريف الميكروبات او احد النظم التى يستفاد منها فى هذا المجال.

٢٠- نظام للكشف والتقدير بإستخدام تفاعل البلمرة التسلسلى RT-PCR

<u>كما يجب ان يحتوى المعمل على الادوات والمواد التالية:</u>

١- اوعية اخذ العينات واعدادها وادوات التحليل وقد تكون هذه الادوات من الزجاج البيركس او من البلاستيك .

٢- اقراص المرشحات

٣- الماصات واطباق بترى وانابيب التخفيف

٤- انابيب زجاجية اوانابيب ابندورف

www.Oxpdf.com

٥- البيئات والكيماويات والتى يراعى ظروف التخزين المناسبة لكل منها.

<u>عند اعداد البيئات يجب:</u>

- استخدام ميكروبات موجبة تناسبها البيئة واخرى سالبة اى لاتستطبع النمو على البيئة لإختبار مدى كفاءة البيئة فى التنمية واختبار مدى دقة النتائج
- تذاب مكونات البيئة على التوالى كما هو موضح ببيان التركيب .
- يجب الإحتفاظ بشهادات الجودة المصاحبة للبيئة اوالكيماوسات الأخرى ووضعها فى ملف التحليل
- يتم ضبط رقم الحموضة المناسب قبل التعقيم
- لايستخدم الميكروويف فى اعداد او تسييل البيئات
- يجب اختبار كفاءة الماء المقطر ومدى صلاحيته للإستخدام دوريا
- يجب تسجيل البيانات التالية لكل دفعة بيئة يتم تحضيرها:

التاريخ – طبيعة البيئة – الكميات المستخدمة فى التحضير – كمية الماء المستخدمة – عدد وحجم الانابيب او الاطباق التى تم اعدادها – ظروف التعقيم – التأكد من كفاءة التعقيم.

www.Oxpdf.com

العوامل التى تؤثر على النشاط الميكروبى فى الأغذية

توجد عوامل متعددة تحدد نمو أو وقف نمو الكائنات الحية الدقيقة فى الأغذية تنحصر هذه العوامل فى توفر الرطوبة والأكسجين وعناصر التغذية والحموضة ، بالإضافة إلى توفير درجة الحرارة المناسبة للنمو ومدى وجود مثبطات للنمو من عدمه. وبصفة عامة تختلف الفلورا الطبيعية التى توجد فى الأغذية على حسب التركيب الكيماوى والطبيعى للغذاء.

ومن العوامل التى تؤثر على نمو الميكروبات :

١- مصادر الكربون والنتروجين Nitrogen and carbon sources.
٢- المعادن .
٣- الفيتامينات .
٤- الضغط الأسموزى وكمية الرطوبة.
٥- جهد الأكسدة والأختزال.
٦- الحموضة.
٧- المواد المضادة لنمو الميكروبات.
٨- التركيب الطبيعى للغذاء.
٩- درجة حرارة النمو .
١٠- العلاقة بين نمو الميكروبات بعضها ببعض.

وسنتكلم عن تلك العوامل بشئ من التفصيل:-

١- مصادر الكربون والنتروجين:

وجد أن بعض الميكروبات لها القدرة على استخدام المواد البروتينية فى حصولها على الطاقة اللازمة لها وتسمى Proteolytic bacteria حيث أن هذه الميكروبات تفرز الأنزيمات اللازمة لتحليل البروتين proteolytic enzyme حيث تكسر البروتينات إلى احماض أمينة حرة بالسلسلة الآتية أثناء التكسير:

بروتين ← بروتيوز ← ببتون ← ببتيدات عديدة ← ببتيدات ← أحماض أمينية.

وتسمى عملية تحويل البروتين إلى أحماض أمينة عملية proteolysis وحدوث تحويل للبروتين فى وجود الأوكسجين يطلق عليه تعفن أو انحلال decay بينما تحلل البروتين فى عدم وجود الهواء يطلق عليه putrefaction والمصادر العضوية للنتروجين

www.oxpdf.com

التىيمكن استخدامها بواسطة الميكروبات هى البروتين ونواتج تكسيره والبيورين والأمينات والأحماض الأمينية. والمصادر الغير عضوية للنتروجين هى اليوريا ونترات الصوديوم وأملاح الأمونيا.

ومن ذلك يتضح أن فساد الأغذية البروتينية (لحم أحمر – دواجن – سمك) يكون غالباً بالميكروبات التى تسبب تحلل البروتين **proteolytic** وأهمية النتروجين ترجع إلى أنه يدخل فى تركيب الخلية والسيتوبلازم والأنزيمات وجدار الخلية فى الميكروبات.

وتحصل الميكروبات على الطاقة اللازمة لها من أكسدة المركبات الكربونية مثل السكريات الأحادية(جلوكوز– فركتوز– جلاكتوز) والسكريات الثنائية مثل (السكروز – لاكتوز – مالتوز) والسكريات الثلاثية مثل رافينوز والسكريات العديدة مثل النشا والبكتين والسليولوز.

ويدخل الكربون فى تركيب سيتوبلازم الخلية وجدار الخلية وفى تركيب الأنزيمات والمواد المخزنة فى الخلية.

وبصفة عامة يعتبر سكر الجلوكوز من أهم مصادر الكربون التى تستخدم بواسطة كل من الفطر والخميرة والبكتريا.

٢– الاحتياجات المعدنية:

تحتاج معظم الميكروبات على مصدر معاون فى بيئة النمو فمثلاً الفطريات تحتاج إلى البوتاسيوم والمغنسيوم والزنك والنحاس والكالسيوم ومنجنيز وكوبالت ، بينما تحتاج البكتريا إلى بوتاسيوم وكالسيوم ومغنسيوم وحديد ومنجنيز.

وتحتاج الميكروبات إلى عناصر غير معدنية مثل الهيدروجين والأوكسجين والكبريت ، ولقد وجد أن الميكروبات تحتاج إلى عناصر مثل المنجنيز والمغنسيوم والزنك حيث تعمل كـ Coenzymes فى دورة الجلكزة بينما المغنسيوم والمنجنيز والحديد تعمل كـ Coenzymes أو مرافق أنزيم فى دورة كريس.

٣– الفيتامينات

هناك العديد من الميكروبات التى تستطيع أن تنمو فى بيئة خالية من الفيتامينات حيث تكون لها القدرة على تخليق الفيتامينات اللازمة لها مثل كثير من أجناس الفطريات.

هناك بعض الفطريات تحتاج إلى أنواع معينة من الفيتامينات للنمو مثل الثيامين ولذلك لابد من توفرة فى بيئة النمو.

www.oxpdf.com

وتلعب الفيتامينات دور حيوى فى تنظيم التفاعلات الحيوية فى الخلية الحية فمثلاً البيوتين يدخل فى تركيب مرافق الأنزيم **$Biotin-Co_2$** والذى يقوم بتثبيت ثانى أكسيد الكربون وتخليق الأحماض الدهنية فى الخلية – ويدخل حامض النيكوتنيك فى تركيب مرافق الأنزيم المسئول عن نقل مجاميع الهيدروجين والأمثلة على ذلك كثيرة.

٤- كمية الرطوبة والضغط الأسموزى ودرجة النشاط المائى:

يوجد الماء فى عدة صور فى الغذاء (ماء حر – ماء مرتبط ، ماء التأدرت)، وإذا انخفضت كمية الرطوبة **water content** فى الخضر عن ٣-٥% وعن ١٥-٢٠% فى الفاكهة فإن الميكروبات لا تستطيع النمو.

ويعرف **water content** كنسبة مئوية كما يلى:-

$$\text{\% الرطوبة} = \frac{\text{الوزن قبل التجفيف} - \text{الوزن بعد التجفيف}}{\text{الوزن قبل التجفيف}} \times ١٠٠$$

ونظراً لأن الأغذية تحتوى على مركبات مختلفة مثل النشا والسيليلوز والبروتين وبالتالى فإن مقدرة تلك الأغذية على الارتباط بالماء تختلف ويعرف **water activity a_w** بأنه الضغط البخارى للغذاء مقسوم على الضغط البخارى للماء على نفس درجة الحرارة . ومن ذلك نجد أن الماء النقى له a_w يساوى واحد.

ويوضح جدول ١ احتياجات الميكروبات من a_w :-

البكتريا العادية	٠,٩١
الخميرة العادية	٠،٨٨
الفطريات العادية	٠،٨٠
البكتريا المحبة للمولحة	٠،٧٥
البكتريا المحبة للضغط الأسموزى العالى	٠،٦٠
فطريات **xerophilic**	٠،٦٥

ويعرف الضغط الأسموزى **Osmotic pressure** بأنه الضغط الغير متوازن الناتج من وضع محلول سكرى (سكروز) داخل غشاء شبه منفذ فى الماء. وهناك علاقة بين الضغط الأسموزى ودرجة نشاط الماء a_w وكذلك التركيز الجزئى ودرجة الحرارة المطلقة كما يلي:-

www.ofpdf.com

$$O.P. = \frac{-RT \log e\, a_w}{\bar{V}}$$

حيث : V الحجم المولى الجزئى للماء .

ويوجد هناك علاقة عكسية بين الضغط الأسموزى والـــ a_w حيث كلما زاد a_w قل الضغط الأسموزى . وبالتالى نجد أن المحاليل الملحية المركزة والمحاليل السكرية المركزة والمستخدمة فى كثير من الصناعات الغذائية يكون لها ضغط أسموزى عالى وبالتالى يصعب فسادها بواسطة الميكروبات العادية نظراً لأنخفاض a_w . فمثلاً فى صناعة المخللات يستخدم فى بادئ الأمر تركيز من الملح مقداره ١٠% له a_w ٠,٩٣٨ وفى نهاية عملية التخليل ترفع نسبة الملح إلى ١٥% (٠,٩١ a_w) وعلى هذه الدرجة من a_w وكمية الحامض المتكونة أثناء التخليل تحفظ المخللات لفترة طويلة بدون تكوين طبقة من الخميرة على السطح.

وتعرف **Sorption Isotherms** بأنها درجة الحرارة والرطوبة النسبية التى يجب توافرها فى الجو المحيط بالغذاء بحيث لا يفقد ولا يمتص رطوبة فمثلاً على درجة حرارة ثابتة إذا أرتفعت الرطوبة النسبية فى الجو فأنه قد يحدث تكثيف رطوبة على الأغذية مما يؤدى إلى نمو بعض الفطريات على سطح الأغذية وفى حالة الأغذية المحفوظة بالتجفيف فأنه يؤدى إلى أمتصاص رطوبة من الجو الخارجى مما يعرضها للفساد.

وفى حالة انخفاض الرطوبة النسبية فى الجو فإن الأغذية تفقد الرطوبة بسرعة مما يؤدى إلى حدوث جفاف وذبول للأغذية الطازجة.

ولقد وجد أن هناك ميكروبات لها القدرة على النمو فى ضغط أسموزى مرتفع أو a_w منخفض مثل سلالات من ***A.glaucus, A.niger*** ويطلق على الميكروبات التى لها القدرة على النمو فى تركيزات مرتفعة من الملح والسكر **halophilic or osmophilic microorganisms** ، ويطلق على الميكروبات التى تنمو على الأغذية المجففة **xerophilic microorganisms**.

٥- جهد الأكسدة والأختزال : **Oxidation-Reduction potential**

يعتمد عند تقسيم البكتريا على مدى احتياجها للأوكسجين فى التقسيم (هوائية – غير هوائية – هوائية اختيارية).

وتعرف عملية الأكسدة بأنها فقد الكترونات بينما الأختزال هو عملية اكتساب الكترونات. ويقاس جهد الأكسدة والأختزال بالـــ **millivolts** فى الغذاء فالأرقام الموجهة

www.oxpdf.com

تدل على ظروف هوائية بينما الأرقام السالبة تدل على ظروف لا هوائية. وتؤثر بعض المركبات الموجودة فى الغذاء على جهد الأكسدة والاختزال مثل فيتامين جـ ، الأحماض الأمينية الكبريتية أو بعض المركبات التى تحتوى على مجاميع SH- .

وتختلف قيم E_h فىالغذاء فمثلاً اللبن + ٣٤٠ إلى +٢٢٠ وعصير الليمون +٣٨٣ بينما فى الجبنة تكون –٢٠ إلى –٣١٠ .

وعن طريق معرفة E_h للأغذية المختلفة ومعرفة الصفات العامة للميكروبات يمكن توقع الفساد الذى يمكن أن يتعرض له الأغذية.

ولقد وجد أن إضافة مادة مثل ثيوجليكولات الصوديوم ($Na\ OOCCH_2SH$) أو *L. lysine* ($S\text{-}CH_2\text{-}CH\ (NH_2)\ COOH)_2$ إلى بيئة الثيوجليكولات حيث أن ثيوجليكولات الصوديوم فى الصورة المختزلة و *L.lysine* فى الصورة المؤكسدة يعملا كمادة مؤكسدة أو مختزلة فى البيئة. حيث أن ٥٠ ملجم/١٠٠ مل فى البيئة يؤدى إلى خفض E_h بحيث يمكن للميكروبات اللاهوائية النمو فى البيئة.

وبالتالى فأنه يمكن جعل ظروف النمو لاهوائية بإضافة مادة كيماوية تخفض E_h بدون الحاجة إلى استخدام طرق معقدة للتنمية.

والجدول التالى يوضح الاصطلاحات المستخدمة فى تقسيم الكائنات الحية على أساس قدرتها على المعيشة فى المستويات المختلفة من الأكسجين وجهد الأكسدة والأختزال.

جدول ٢ :المصطلحات المستخدمةلتوضيح العلاقه بين جهد الأكسدة والإختزال والكائنات الحية الدقيقة

Group	Environment		O_2 effect
	Oxidizing	Reducing	
Obligate aerobes	Growth	Not Growth	Required
Facultative	Growth	Growth	Not required, but growth better with O_2
Anaerobes Aerotolerant	Growth	Growth	Not required, and growth not better when O_2 present.
Aerophobic (obligate anaerobes)	Death	Growth	Harmful
Microaerophilic	Growth if level not too high	Growth if level not too low	Required, but at levels lower than 0.2 atmosphere

الكائنات الهوائية إجباراً

الكائنات الهوائية إجباراً مثل بكتريا حمض الخليك Acetic تنمو جيداً في الظروف البيئية الهوائية وتحتاج إلى الأكسجين (O_2) لأنها لا تتمكن من توليد الطاقة اللازمة لها عن طريق التخمر. وأيضاً تحتاج إلى الأكسجين الجزيئي لعمليات البناء الحيوية للستيرولات Sterols والأحماض الدهنية الغير مشبعة Unsaturated fatty acids.

الكائنات الاختيارية Facultative organisms

الكائنات الهوائية اختيارياً هى التي لها القدرة على الحصول على الطاقة سواء بواسطة عملية الفسفرة الأكسيدية (OP) أو بواسطة التخمر fermentatively ولا تحتاج إلى الأكسجين فى عمليات البناء الحيوية التي تقوم بها Biosynthesis ويمكن لهذه الكائنات أيضاً أن تستخدم بعض المستقبلات الالكترونية بديلة مثل النترات nitrate عند غياب الأكسجين الجزيئي (O_2).

الكائنات اللاهوائية Anaerobes

وهى تلك الكائنات التي لا تتمكن من استخدام الأكسجين (O_2) كمستقبل الكتروني طرفي Terminal electron acceptor في توليد الطاقة، وهى عادة تعاني نقص في السيتوكرومات الطرفية التي تنقل الالكترونات إلى الأكسجين. وهى تقع في مجموعتين وهى Aerophobic, Aerotolerant والمجموعة الأولى (Aerotolerant anaerobes) وهى اللاهوائية اختياري. وهى لا تستخدم الأكسجين الجزيئي (O_2) لا تضار به وتنمو جيداً وبالتساوي في وجود أو غياب الأكسجين.

Aerophobic anaerobes اللاهوائية إجباري obligate anaerobes أو يعبر عنها Strict anaerobes وهى لا تستخدم O_2 وتضر به في حالة وجوده سواء لأنه يحدث تسمم مباشر direct O_2 toxicity أو لأنه يرفع جهد الأكسدة Eh والاختزال في البيئة.

الكائنات من النوع The microaerophilic organisms

وهى الكائنات التي تحتاج إلى كمية قليلة من الأكسجين (O_2) ولكن بتركيزات أقل من ٠,٢ جوي؟ ربما لأن أزيد من هذا يحدث تسمم بالأكسجين.

www.ofpdf.com

الكائنات اللاهوائية Anaerobic microogrnaisms

البيئات ذات جهد الأكسدة والاختزال المنخفض Redox potential البيئات اللاهوائية– وتشمل الرواسب الموجودة في البحيرات والأنهار والمحيطات والطين والأغذية المعلبة والأمعاء وفراغ الفم في الحيوانات خاصة حول الأسنان وأنظمة معينة من المجاري والمناطق تحت الأرض مثل جيوب الزيت والعيون Springs والمياه الأرضية. وفي هذه المصادر السابقة فإن انخفاض جهد الأكسدة والاختزال يكون راجع لنشاط الكائنات التي تستهلك الأكسجين ويصبح الوسط لاهوائي. ومن المعروف أن اللاهوائيات الإجبارية Obligates تقع في جنس فقط هما البكتريا والبروتزوا Protozoa. وأغلب البكتريا اللاهوائية تقع في جنس Clostridium وهى عصويات متجرثمة موجبة لجرام. منتشرة بكثرة فى التربة ورواسب البحيرات والقنوات الهضمية وهى التى تسبب فساد الأغذية المعلبة. وبكتريا لاهوائية اجبارياً أيضاً توجد فى الأجناس Methanobacterium ، Bacteroides ، Fusobacterium ، Ruminococcus ، وعدد قليل من Streptococcus . والبكتريا اللاهوائية حتى الاجبارى منها تختلف فيما بينها فى حساسيتها للأكسوجين فبعضها لديه القدرة على مقاومة آثار الأكسوجين أن وجدت بينما لا يستطيع البعض الأخر ذلك.

وهناك عدد من الفطريات التى تشرح لماذا تقتل البكتريا اللاهوائية إجبارى بالأكسوجين أو العوامل المؤكسدة منها:-

المعروف أن أغلب الكائنات الحية تنتج فوق أكسيد الأيدروجين (H_2O_2) عند تواجد الأكسوجين (O_2) وهذه مادة سامة تهدم بواسطة أنزيم الكتاليز Catalase وهو يوجد فى الكائنات الهوائية ولا يوجد فى اللاهوائية ولذلك فالهوائيات المعروفة تقتل بالأكسوجين الجزيئى لأنها تكون H_2O_2 ولا تستطيع التخلص من سميته لأنها لا تفرز الكتاليز.

يدخل الأكسوجين فى تكوين مادة شديدة النشاط وهو شق free-radical O_2^- بينما اللاهوائيات الإجبارية تعانى نقص فى هذا الأنزيم.

مع ملاحظة أن الكائنات من النوع اللاهوائى اختيارى aerotolerant لا تمتلك الكتاليز Catalase فإن مقاومتها للأكسوجين (O_2) لا ترجع إلى قدرتها على هدم فوق أكسيد الأيدروجين.

وفى بعض الأحيان فإن الكائنات اللاهوائية إجباريا لا تقتل بالأكسوجين (O_2) لو أن جهد الأكسدة والأختزال منخفضاً. ولقد أكتشف دليل على هذا بأن أنزيم nitrogenase حساس جداً لجهد الأكسدة والأختزال العالى ويثبط بسرعة فى هذه الظروف.

www.0xpdf.com

وللحفاظ على الظروف اللاهوائية فى البيئات المزرعية تحتاج إلى عناية كبيرة لدرجة أن آثار من الأكسوجين يمكن أن تثبط النمو البكتيري. وبعض صبغات الأكسدة والأختزال Redox dyes مثل صبغة أزرق الميثلين ، الريزازيورين Resazurin تستعمل فى الدلالة على جهد الأكسدة والأختزال فى البيئات المزرعية. وشائع استعمالها حيث تكون عديمة اللون Colorless عندما يختزل وملونة عندما تؤكسد . والأكسوجين الذائب يطرد من الأنبوبة إلى الخارج أثناء التعقيم الحرارى ويمكن التحكم فى عدم رجوعه باستعمال قفل محكم غير منفذ للأكسوجين مثل السدادات من المطاط.

وللكائنات الأكثر حساسية للأكسوجين فإن كل العمليات التجهيزية مثل التلقيح والنقل المزرعى يجب أن تتم تحت جو من النيتروجين أو الهيدروجين أو غاز الهليوم helium (خامل) وأنابيب المزارع والزجاجات والدوارق يجب أن تحضن تحت ظروف لاهوائية.

وأحسن طريقة للحصول على مستعملات معزولة لمزرعة نقية تستخدم الأنابيب الدائرية roll tubes حيث يوضع فيلم رقيق من الآجار يوزع فى الزجاجة بإدارة الأنبوبة خلال عملية التسخين . وفى نفس الوقت يظل الجو خالى من الأكسوجين. وتقفل هذه الأنواع من الأنابيب بواسطة أغطية خاصة غير منفذة للأكسوجين. وتوجد أوعية خاصة لتحضين العدد القليل من الأنابيب أو الأطباق تحضيناً لاهوائياً يزال منها الأكسوجين بحرق وقود أو هيدروجين فى داخل الوعاء المغلق.

ومن الأمور السهلة تنمية اللاهوائيات الإجبارية فى مزرعة مختلطة مع الأنواع الهوائية اختيارى حيث تستهلك الأخيرة الأكسوجين وتحافظ على الظروف المختزلة فتعطى بذلك الفرصة لنمو اللاهوائى الاجبارى.

٦- درجة الحموضة pH :

يعرف الـــ pH بأنه مساو للوغاريتم السالب لتركيز ايونات الهيدروجين (H^+) log 1/(H^+) or-log وللـــ pH أهمية كبيرة فى نمو الميكروبات التى تسبب فساد الأغذية وتنحصر قيم الـــpH فى الأغذية ما بين ٢,٢ (ليمون) إلى ٩,٣ لبياض البيضة المخزن ، وفى معظم الأحيان فإن pH الأغذية لا يزيد عن ٧ .

ولقد وجد أن معظم سلالات البكتريا تميل إلى النمو فى pH قريب من التعادل أو قلوى بعض الشئ وهذه أمثلة لـــ pH بعض سلالات البكتريا:

www.oxoid.com

جدول ٣: امثلة لبعض الكائنات الحية الدقيقة ودرجة الحموضة

Bacteria	Optimum pH	Range
Enterobacter aerogenes	6.0	4.4 to 9.0
Escherichia coli	6.0-7.0	4.3 to 9.5
Bacillus subtillis	6.0-7.5	4.5 to 8.5
Clostridium sporogenes	6.5-7.5	5.0 to 9.0

وتحتاج الخمائر والفطريات إلى pH يتراوح بين ٢,٤-٩,٢ وبالتالى نرى أن الخمائر والفطريات تتحمل مدى pH أوسع من البكتريا ، ونجد أهمية الـ pH فى أنه له قوة تنظيمية أثناء نمو الميكروبات فى البيئة.

٧- المواد المضادة لنمو الميكروبات :

Antimicrobial substances found in foods

هناك القليل من المركبات والتى توجد طبيعياً فى الغذاء وتعمل كمواد مضادة لنشاط أو لنمو الميكروبات مثل مادة Lactinin فى اللبن و lysozyme فى البيض و essential oils فى التوابل Spices.

٨- التركيب الطبيعى : Biological structure

هناك العديد من التركيبات الطبيعية الموجودة فى الغذاء والتى تحميه من الفساد بواسطة الميكروبات مثل القشرة الخارجية فى البيض وطبقة الأيبدرم فى الخضروات والفاكهة وطبقة الجلد تحمى لحم الحيوانات. ولقد وجد أن الأنسجة السليمة الغير مهشمة فى

www.Oxpdf.com

النبات والحيوان تكون خالية من التلوث الميكروبى وبالتالى تكون أقل عرضة للفساد من الأنسجة المهشمة.

والميكروبات التى تسبب فساد الأغذية تنتقل إليها من الهواء والتربة وأثناء النقل والتعبئة وعمليات التداول مما يؤدى إلى سرعة حدوث الفساد بها وبالتالى فإن إتباع الشئون الصحية أثناء عملية النقل والأعداد تكون هامة جداً فى تأخير فساد الأغذية.

٩- درجة حرارة النمو : Temperature

تقسم عادة الميكروبات على حسب درجة الحرارة المثلى اللازمة لنموها إلى ثلاثة أقسام هى :-

أ- *Psychrophiles*

وهى الميكروبات التى تنمو على درجة حرارة تتراوح بين -٧ – ١٠°م وعادة تلك الميكروبات تنمو على الأغذية المحفوظة بالتبريد لفترة طويلة ، وهذه النوعية من الميكروبات لا تسبب فساد للأغذية التى تحفظ على درجة حرارة الغرفة. وعادة تسبب تلك المجموعة من الميكروبات فساد اللحوم والدواجن والأسماك والمحاريات ومنتجات الألبان التى تحفظ بالتبريد.

ب- *Mesophiles*

وهى الميكروبات التى لها مدى نمو من ١٠ – ٤٠°م ولكن درجة الحرارة المثلى لنموها تكون ٣٥ – ٣٧°م. وتضم هذه المجموعة معظم الميكروبات المرضية والتى تصيب الإنسان كما أنها تضم مجموعة الميكروبات التى تسبب التسمم الغذائى والتى تنمو على معظم الأغذية المحفوظة أو الطبيعية.

جـ- *Thermophiles*

وهى الميكروبات التى لها القدرة على النمو بين ٣٠ – ٧٣°م وهذه الأنواع تسبب فساد الأغذية المحفوظة بالتعليب مع إنتاج حامض بدون غاز (Flat sour). وتوجد عادة الميكروبات الثرموفيلية فى التربة والماء والسكر والنشا والتوابل وتنتج هذه الميكروبات عادة جراثيم شديدة المقاومة للحرارة very heat-resistant spores.

حدود درجات الحرارة بالنسبة للحياة :

www.oxpdf.com

معظم البكتريا يمكنها البقاء حية لفترات طويلة عند درجات حرارة تقترب من الصفر المطلق 0°C وعلى هذا فالحرارة المنخفضة ليست بحد أساسى لاستمرار الحياة.

ومن جهة اخرى فأنه من الممكن الاستدلال العقلى إثبات وجود حداً أعلى لاستمرار الحياة. والأحماض النووية .DNA هى المكان الجزيئى للعوامل المحددة الوراثية حيث تمتد إلى جميع الكائنات الحية الأرضية. ومن المعروف أن نموذج الأحماض النووية الشهير المقترح بواسطة Waston & Grick يفترض اعتماد المركب فى ثباته على الروابط الهيدروجينية ويعتمد ذلك علىالمحتوى النووى من القواعد جوانين – سيتوزين.

حدود درجات الحرارة للنمو :

من الصعب تقدير حدود درجات الحرارة للنمو بواسطة الاستدلال العقلى – بعض البكتريا يمكنها النمو على درجات حرارة منخفضة حتى -٧,٥°م ، كما أن بعض البكتريا يمكنها النمو على درجات حرارة عالية حتى ١٢٠°م.

تأثير درجة الحرارة على سرعة التفاعلات:

وجد ارهينيوس Arrhenius تجريبياً أن تأثير درجة الحرارة على سرعة تحلل السكروز ينطبق على المعادلة الأتية :-

$$V = AE^{-E/RT}$$

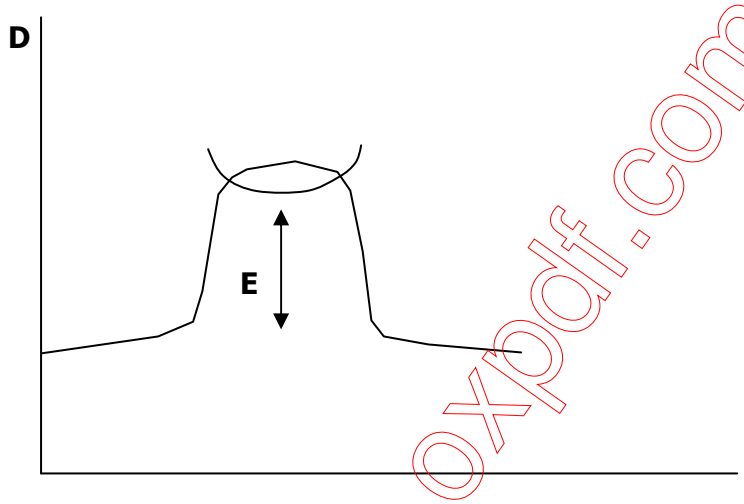
حيث :

طاقة التنشيط	=	E
السرعة	=	V
ثابت يعتمد على نوع التفاعل الجارى قياسه	=	A
درجة الحرارة المطلقة	=	T
الثابت العام للغازات	=	R

www.oxpdf.com

ومن الممكن الوصول إلى معادلة من نفس العينة من القوانين الثرموديناميكية إذا ما افترضنا أن الجزيئات لابد أن تصل إلى مستوى معين من الطاقة حتى يمكنها أن تتفاعل .

الأقتراح الحلزونى المزدوج بواسطة Watson and Grick. توجد الأحماض النووية فى الخلية على هيئة سلسلتين مرتبطتين ببعض بواسطة قاعدة بيورين Pureine فى سلسلة وقاعدة بيريميدين Pyrimidine مجاورة فى السلسلة الأخرى ، بحيث يكون لكل قاعدة زميل ، مثل رابطة T-A أن القاعدة بيورين من نوع أدنين مترتبطة برابطة هيدروجينية مع قاعدة بيريميدين من نوع ثيمين ، C-g (جوانين وسيتوزين) يرتبطان بثلاث روابط هيدروجينية وكلما زادت نسبة g-c فى DNA كلما زاد ثبات المركب للحرارة.



www.Oxpdf.com

ويأخذ لوغاريتم كل من الطرفين فى المعادلة السابقة:

حيث : H = E

Lin V = E/R – 1/T + Lin A

Lin V = -H/RT + Lin A

وحيث أن هذه المعادلة تأخذ صيغة معادلة خط مستقيم . فبرسم اللوغاريتم الطبيعى للسرعة (Lin V) على المحور العادى ، 1/T على المحو السينى نحصل على خط مستقيم ميله = H/R .

ويمكن التعبير عن السرعة V بمعدل النمو النوعى K .. ولتفادى المعنى الدقيق H بالنسبة للتفاعلات المركبة (المعقدة) مثل نمو البكتريا فيستبدل H بالتعبير U والذى يطلق عليه Temperature characteristic أى الحرارة النوعية أو المميز الحرارى. وهذا الرقم من المقاييس الأساسية لكل صنف من البكتريا.

درجات الحرارة الرئيسية للكائنات :

١- درجة الحرارة العليا :

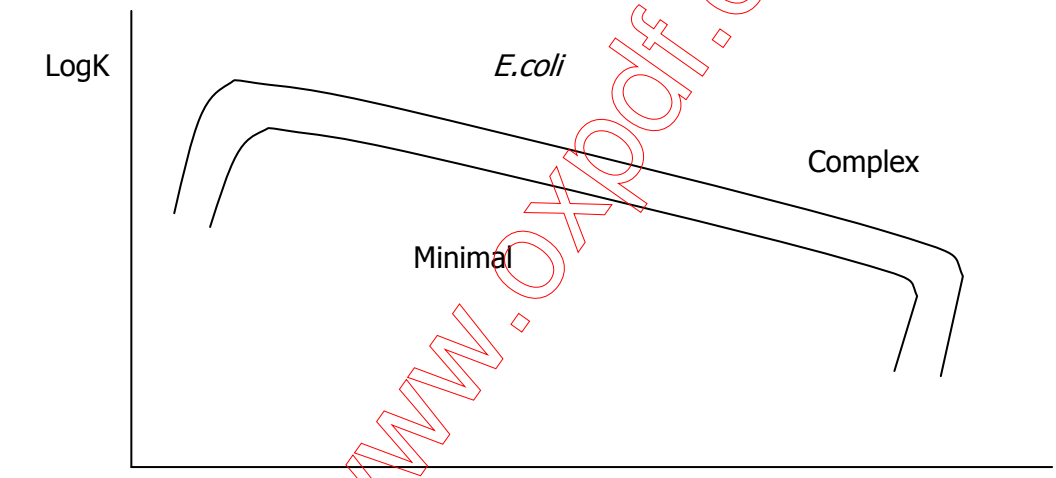
هى درجة الحرارة التى تقترب عندها سرعة النمو النوعية من الصفر بزيادة درجة الحرارة وتعرف بـــ Maximum temperature.

٢- درجة الحرارة المثلى : Optimum temperature

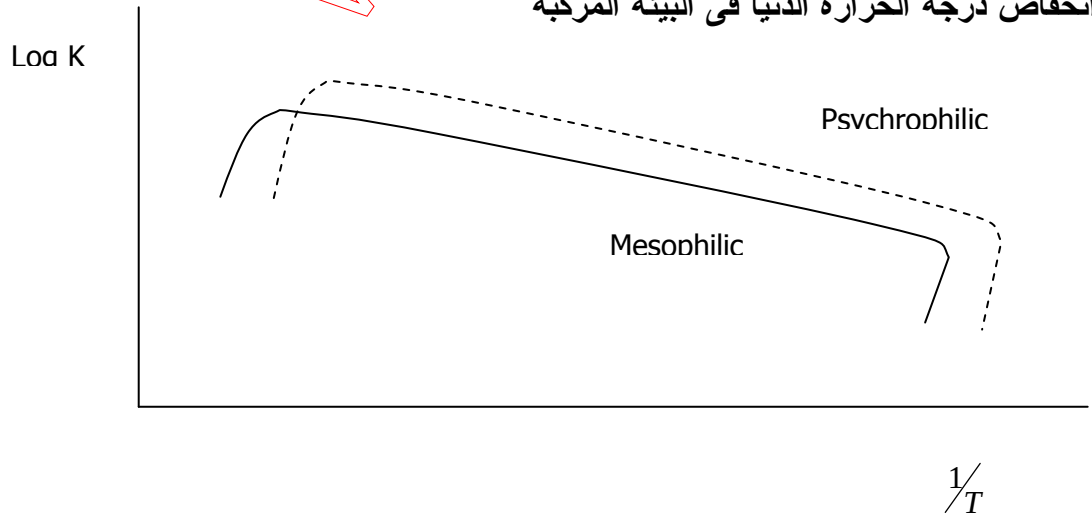
هى درجة الحرارة التى تبلغ عندها سرعة النمو النوعية غايتها القصوى.

٣- درجة الحرارة الدنيا :

هى درجة الحرارة التى تقترب عندها سرعة النمو النوعية Sp. Growth rate من الصفر بأنخفاض درجة الحرارة.



انخفاض درجة الحرارة الدنيا فى البيئة المركبة



www.Oxpdf.com

١٠- العلاقة بين نمو الميكروبات بعضها ببعض فى الغذاء :

والمقصود بذلك أن الميكروبات عندما تنمو فى الغذاء توفر الظروف الملائمة لنمو بعض من الميكروبات الأخرى فى الغذاء ، والأمثلة على ذلك عديدة مثل :-

- Metabiosis :

ومن أمثلة Metaboisis التغير فى جهد الأكسدة والأختزال حيث يمكن أن تنمو الميكروبات الهوائية وتخفض Eh للحد الملائم لنمو الميكروبات اللاهوائية. وكذلك التغير فى الحموضة فمثلاً مجموعة الكوليفورم ممكن أن تنمو فى بداية عملية تخمر الكرنب ولكن تحدث بعد فترة لزيادة الحموضة وتبدأ ميكروبات أخرى فى النمو . وفى عمليات التخمر التى تتم طبيعياً ممكن أن تنمو *Leuconostoc mesenteroides* وتنتج حامض يسمح للـ *Lactobacillus plantarum* من النمو وتموت هى نتيجة أرتفاع الحموضة. كما أن ارتفاع الحموضة قد يؤدى إلى نمو الخمائر الغشائية التى تستخدم lactic acid كمصدر للطاقة.

كما قد يحدث تغير فى كمية التحول حيث تنمو الخمائر السطحية مستخدمة الكحول الناتج من تخمر السكر بواسطة *S.cerevisiae* وتسكرة وتنتج CO_2 و H_2O مكونة غشاء على سطح المحلول السكرى المتخمر.

ويمكن للبكتريا التى تسبب التسمم الغذائى فى الأغذية المبسترة أو المعاملة حرارياً أن تنمو منتجة أعداداً كبيراً بحيث لا تعطى فرصة للميكروبات التى تسبب الفساد أن تنمو . والأغذية التى تسبب التسمم الغذائى قد لا يحدث بها تغير فى الطعم والرائحة وبالتالى تكون خطراً على الصحة العامة حيث يمكن استهلاكها . ولكن الأغذية التى تتعرض للفساد بواسطة الميكروبات العادية فأنه يحدث بها تغير فى الطعم والرائحة يمنع استهلاكها.

وهناك كذلك ظاهرة Antibiosis حيث تنمو بعض الميكروبات مثل *Streptococcus lactis* وتنتج مضاد حيوى يسمى nisin وبالتالى يمنع نمو الميكروبات الأخرى فى الغذاء. وحامض البروبيونيك الذى ينتج بواسطة بعض أنواع البكتريا فى الجبن السويسرى يكون مثبط لنمو الفطريات . والكحول المتكون بكمية كبيرة فى الخمور بواسطة الخميرة يمنع نمو العديد من الميكروبات وكذلك حامض الخليك المنتج بواسطة الخمائر يثبط حدوث التخمر الكحولى.

www.Oxpdf.com

البكتريا الهامة التى تحدد سلامة الأغذية وتأثيرهاعلى صلاحية الغذاء للأستهلاك

توجد العديد من الكائنات الحية الدقيقة والتى تتواجد فى الأغذية بصفة عامة ، وتحدد أنواع وأعداد هذه الميكروبات مدى سلامة الغذاء من الناحية الصحية وبالتالى صلاحيته للأستخدام من عدمه . وتتباين وجود هذه الأنواع من الكائنات الحية الدقيقة فى الغذاء تبعاً لطبيعة الغذاء وفى نفس الوقت مقدار التلوث بهذه الكائنات للغذاء عن طريق التداول الغير سليم لهذه الأغذية مما يزيد من مقدار التلوث بأنواع عديدة من الميكروبات والتى تؤثر سلبياً على سلامة الغذاء وبالتالى مدى صلاحيته للأستهلاك عند نمو هذه الميكروبات فى الأغذية لتوفر الظروف المناسبة للنمو.

وتوجد العديد من الأحياء الدقيقة فى الأغذية تؤثر على سلامته وصلاحيته للأستهلاك ، وتمثل البكتريا أهم الكائنات الحية الدقيقة التى توجد بالأغذية ، وطبقاً للتقسيمات المختلفة للبكتريا فأنه توجد عدة أجناس تتبع العائلات المختلفة ، حيث توجد العديد من الأنواع تؤدى إلى فساد الأغذية وتؤثر على سلامته وفى نفس الوقت قد تكون هذه الأنواع من البكتريا التى تقوم بإفراز السموم والتى تؤدى فى بعض الأحيان إلى حدوث وفاة للإنسان الذى يتناول هذا الغذاء المحتوى على السموم البكتيرية.

وسنتناول فى هذا الجزء أهم أنواع البكتريا والتى لها دور فى التأثير على سلامة الأغذية . ومعظم أنواع البكتريا هذه توجد فى الأغذية بصفة عامة حسب طبيعية ونوع الغذاء . وسوف تتناول أهم العائلات البكتيرية ومعرفة خواص وصفات الأنواع المختلفة من البكتريا.

www.oxford.com

أولاً :شعبة ***Firmicutes***

وتشتمل على٣ طوائف اهمهم طائفة ***Bacilli*** و طائفة***Clostridia***

وتشتمل طائفة ال ***Bacilli*** على العديد من الرتب واهمها رتبة ***Bacillales*** والتى يتبعها ١٢ عائلة منها عائلة ***Bacillaceae*** والتى تضم ١٤ جنس منها اجناس ***Bacillus*** و ***Alkalibacillus*** و***Geobacillus*** و***Halobacillus*** و ***Halolactibacillus*** اما طائفة***Clostridia*** فتضـــم ١٧ عائلة منها عائلة ***Clostridiaceae*** والتى تضم ١٣ جنس منهم جنس ***Clostridium*** وبكتريا كلاً من

جنسي ال Bacillusو Clostridium عصوية – موجبة لجرام او مختلفة الصبغ وهى عادة متحركة بأسواط تحيط بجميع سطح الخلية. وعدد كبير من جنس *Bacillus* dتنتج أنزيم الكتاليز حيث يحول فوق أكسيد الهيدروجين إلى أكسجين وماء.

١- جنس *Bacillus*

عزلت أفراده من التربة والهواء ويمكن عزلها بالتخطيط على أطباق الآجار المحتوية على البيئات المغذية المختلفة وذلك بعد تعريض العينة لحرارة ٨٠°م لمدة ١٠ إلى ٣٠ق وهى معاملة كافية للتخلص من الخلايا الخضرية بينما تبقى الجراثيم viable. هذه العينات المبسترة تخطط على الأطباق تحضن هوائياً aerobically فالبكتريا التى تنمو غالبيتها تكون تابعة لجنس *Bacillus* . وأفراده تنمو جيداً على البيئات الصناعية المحتوية علىالسكريات والأحماض العضوية والكحولات كمصدر للكربون وبعضها يحتاج إلى الفيتامينات. وعديد منها يفرز أنزيمات خارجية Extracellular لتكسير المواد عديدة التسكر أو الأحماض النووية أو الليبيدات لتمكن هذه الكائنات من استخدام هذه المواد كمصدر للكربون والطاقة اللازمة لها . وعديد من أنواع الـ *Bacillus* تنتج مضادات حيوية مثل:

Bacitracin, Circulin, Polymyxin, Gramicidin

من أمثلة بكتريا جنس *Bacillus* :

جراثيم النوع *B.stearothermophilus* الثرموفيلية إجبارياً شديدة المقاومة للحرارة. وتسبب التدهور الحامضى Flat-sour فىالمعلبات الغير حامضية – منتجات الخضراوات – ويحدث هذا الفساد فىالعلب التى بها عدد من جراثيم هذا النوع تبقت بعد التعقيم التجارى. ثم تنشط بسبب الحجز أو التخزين على درجة حرارة عالية. أو البطء فى عملية التبريد التى تلى التعقيم التجارى مباشرة بالسرعة المطلوبة لتحطيم كل جراثيم هذه الأنواع الثرموفيلية.

وجراثيم *B.thermoacidurans (B.coagulans)* تسبب التدهور الحامضى Flat-sour فى منتجات الفواكه المعلبة. وجراثيمها أقل نسبياً فى المقاومة الحرارية من النوع الأول.

وهذه الأنواع قادرة على مهاجة الكربوهيدرات وتكوين الحامض بدون غاز فى العلب. ومصدر التلوث بجراثيم هذا الفساد هو الآلات المستخدمة فى الصناعة خاصة أجهزة

www.oxpdf.com

السلق أو التسخين، والمصدر الأصلى لها هو النشا والسكر بينما المصدر الطبيعى الأساسى لكل أنواع جراثيم الــ **Bacillus** هو التربة (الأتربة).

وقد تم عزل كلا من النوعين السابقين من البكتريا من أغذية معلبة مصرية.

الأنواع ***B.polymyxa*** ، ***B.macerance*** مسئولة عن الانتفاخ الذى قد تتعرض له البسلة والسبانخ المعلبة أو الخوخ والطماطم وهى قد تتبقى بجراثيمها بعد المعاملة الحرارية الغير كافية. وقد تدخل جراثيمها خلال ثقوب العلبة من مناطق اللحام أو الغطاء . وهى أنواع تكون حامض وغاز من الجلوكوز المتيسر أو من السكريات. وتتكون كميات صغيرة من الأمونيا الناتجة من الأغذية النيتروجينية التى قد تتعادل مع الحامض.

وجدت أنواع من هذا الجنس مثل ***B.cereus*** ، ***B.coagulans*** ، ***B. licheniformis*** ، ***B.subtilis*** تهدم اللحوم المعلبة وتسبب هرى أو طراوة الأسماك المعلبة. وقد تسبب التدهور الحامضى **Souring** .

أيضاً فى اللحوم المملحة المعلبة قد تنمو فيها الأنواع الأربعة المشار إليها وتنتج بها CO_2 وأكاسيد النيتروجين من النترات أو السكر أو اللحم المملح.. ومما هو جدير بالذكر أن واحداً من هذه الأنواع بمفرده لا يكون الغاز.

جنس ***Clostridium*** :

البكتريا التابعة لهذا الجنس كلها من النوع اللاهوائى الإجبارى وهى ليست فقط لا تستطيع النمو فى وجود الهواء ولكنها تموت فى وجود الأكسوجين إذا لم تكن فى الصورة المتجرثمة. الأسبورانجيا منتفخة من الوسط أو الطرف أو قرب الطرف مثل عصى الطبلة. وكل الأنواع غير منتجة لأنزيم الكتاليز. وأغلب الأنواع تهاجم الكربوايدرات مع إنتاج أحماض عادة البيوتيريك وغازات مثل CO_2 والأيدروجين. ومنها أنواع ميزوفيلية وأخرى ثرموفيلية وقد تكون محللة للبروتين أو لا تحلل البروتين.

ويجب أتخاذ الاحتياطات اللازمة للحفظ على الظروف اللاهوائية عند تنمية هذه الميكروبات. وهناك طرق عديدة للحصول على هذه الظروف مثل استعمال غاز النيتروجين. وتغلى البيئات السائلة وتضاف مادة الثيوجليكولات أو المركبات الكبريتية الأخرى. واستخدام الأنابيب المقفلة تماماً أو الملحومة. وهذه المواد التى ذكرت تساعد على خفض جهد الأكسدة والاختزال للبيئة. ومن الاحتياطات الهامة عند التعامل مع هذه الأنواع – الكلوستريديا – هو غلى البيئات المزرعية قبل التقيح المباشر لطرد كل آثار الأكسوجين واستخدام ادوات خاصة وأوانى يدفع الأيدروجين (H_2) أو يدخل الغاز ويتم حرقة كهربياً لاستهلاك الأكسوجين الموجود.

وهذه البكتريا تعانى نقصا فى نظام السيتوكروم. وفى ميكانيكية الفسفرة الأوكسيدية. وبالتالى فهى تحصل على جزيئات ATP عن طريق الفسفرة من النوع (SLP).

تفاعل الفسفرة وإنتاج غاز الهيدروجين:

Phosphoroclastic reaction and H_2 production (PC reaction)

توليد الطاقة خلال التكسير اللاهوائى للبيروفات بواسطة بكتريا Clostridia اللاهوائية مثال لعملية الفسفرة على مستوى مادة التفاعل (SLP) حيث تقوم هذه البكتريا اللاهوائية باستخدام المواد القابلة للتخمر وتشمل الأحماض الأمينية والأحماض العضوية والبيورينات والبيريميدينات Pyrimidine ، ثم تسير البيروفات بعد ذلك فى سلسلة من الخطوات تسمى (PC) حيث يستخدم الفوسفات الغير عضوى ويتم تخليق جزيئات (ATP) كما يلى :-

$$\text{Pyruvate} + \text{Coenzyme A} \rightarrow \text{Acetyl} - \text{CoA} + CO_2 + H_2PO_4^-$$

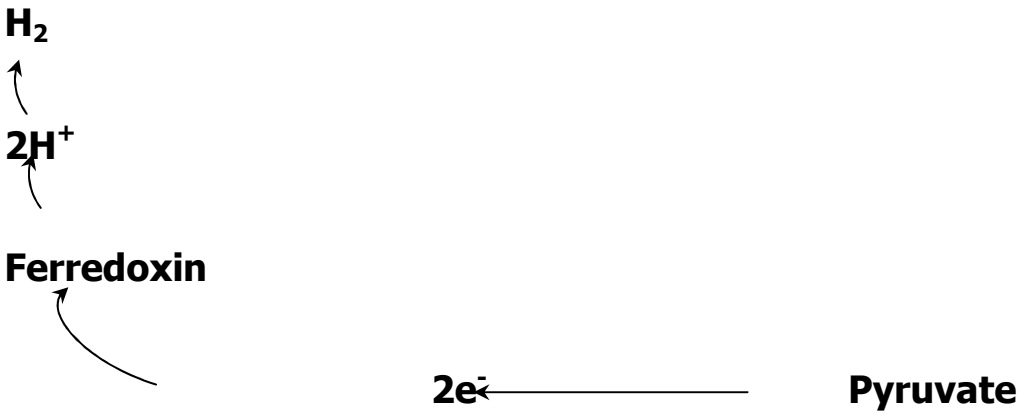
Coenzyme A + Acetyl phosph.

ورابطة الفوسفات التى تكونت فى مركب أستيل فوسفات هى من نوع الروابط الغنية فى الطاقة. وتستخدم فى تخليق الرابطة فى تخليق الـــ ATP.

$$\text{Acetyl phosphate} + \text{ADP} \rightarrow \text{Acetate} + \text{ATP}$$

وفى التفاعل من النوع السابق (PC) اتزان جهد الأكسدة والأختزال يكون عن طريق إنتاج الأيدروجين (H_2) . حيث تنتج أنواع عديدة من البكتريا اللاهوائية تنتج غاز الأيدروجين لتنظيم زيادة الالكترونات وفى بكتريا الكلوستيرديا نجد أن إنتاج الأيدروجين مرتبط بوجود بروتينات صغيرة تسمى Ferrodoxin حيث تعمل كمادة حاملة للالكترونات لها جهد أكسدة وأختزال منخفض (-0.430 volt) تحتوى على حديد. وهى تدخل ليس فقط فى إنتاج الأيدروجين ولكن أيضاً فى عملية البناء الضوئى Photosynthesis وتتلخص الميكانيكية فى أن الالكترونات تنتقل أولاً من البيروفات إلى الفيريدوكسين ثم منه إلى البروتون H^+ ثم فى تفاعل يقوم بها أنزيم Hydrogenase كما فى الشكل :-

www.oxford.com



والتفاعل السابق له أهمية كبيرة خاصة فى المعلبات الغذائية حيث عن طريقة تستطيع جراثيم بكتريا **Clostridium** إذا ما أتيح لها فرصة الإنبات والنمو أن تكون كمية كبيرة من الغاز أغلبه أيدروجين بالإضافة إلى CO_2 وتؤدى إلى انتفاخ هذه المعلبات بسرعة ووصولها لمرحلة الأنفجار.

وعموماً توجد اختلافات عديدة فى ميكانيكية إنتاج الطاقة فى هذه البكتريا **Clostridia** وأدى ذلك إلى تقسيمها إلى تحت مجموعات على أساس المواد التى يمكن أن تستخدمها كما فى جدول ٤

عدد كبير من بكتريا **Clostridia** تستخدم السكريات وتنتج حمض البيوتيريك كمنتج نهائى رئيسى. وبعض هذه الأنواع ينتج أيضاً الأسيتون والبيوتانول بحيث كان الاعتماد عليهما كبير فى الحصول على هذه المذيبات الهامة.

www.oxpdf.com

جدول ٤: "أهم صفات مجموعات جنس Clostridium "

نوع المواد المستخدمة	ناتج التمثيل	الأنواع الممثلة
١-الكربوهيدرات : أ- السليلولوز	أحماض الخليك واللاكتيك والسكسنيك وكحول الايثانول ، CO_2, H_2	*Cl.cellulosolvens* *Cl.dissolvens* *Cl.thermocellum*
ب- السكريات العديدة مثل النشا والبكتين	الاسيتون والبيوتانول والايثانول الايزوبروبانول وأحماض البيوتيريك والخليك ، CO_2، البروبيونيك ، H_2. والبعض له القدرة على تثبيت النيتروجين (N_2).	*Cl.butyricum* *Cl.acetobutylicum* *Cl.pasteurianum* *Cl.perfringens*
جـ-تخمر السكريات وتنتج أساساً حمض الخليك	تنتج الاسيتات من CO_2	*Cl.aceticum* *Cl.thermosaccharolyticum*
٢- البروتينات أو الأحماض الأمينية	حامض الخليك والأمونيا(CO_2,NH_3) وفى بعض الأحيان H_2 . وبعضها يتخمر السكريات أيضا وتنتج حامض البيوتيريك وربما تنتج التوكسينات الخارجية.	*Cl. soprogenes* *Cl.tetani* *Cl.botulinum* *Cl.histolyticum* *Cl.tetanomorphum*
٣- تخمر البيورينات	تستخدم حامض البوريك والبيورينات الأخرى وتكون الخليك ، CO_2,NH_3	*Cl.acidiurici*
٤- تخمر كحول الايثانول إلى أحماض دهنية	تنتج حامض الكابرويك ولا تهاجم السكريات أو الأحماض الأمينية أو البيورينات.	*Cl.Kluyveri*

www.oxpot.com

وأهم أنواع البكتريا التابعة لجنس الـ *Clostridium* هى :-

Cl. thermossaccharolyticum

وهو لا هوائى إجبارى – ثرموفيلى – يحلل السكريات ويسبب انتفاخ المعلبات (T.A spoilage) خاصة مجموعة الأغذية المعلبة الأولى المنخفضة الحموضة مثل البسلة والفاصوليا ولحوم وأسماك والمتوسطة الحموضة (لها رقم حموضة ٥،٣ – ٤،٥٠) مثل السبانخ والبنجر والغازات المتكونة خليط من CO_2، الهيدروجين ويحدث الانتفاخ خاصة عندما تتواجد جراثيم هذه البكتريا فى الغذاء المعلب ثم يخزن على حرارة مرتفعة. ويؤدى إلى انتفاخ سريع قد يؤدى إلى انفجار العلب.

هذه البكتريا لا تكون مزارع بسهولة فى بيئات الآجار وعند الكشف عنها يجرى ذلك فى أنابيب من بيئة سائلة خاصة بيون الكبد أو الثيوجليكولات أو بيئة سائلة مناسبة لنمو الأنواع اللاهوائية.

Cl.nigrificans:

جراثيم مقاومة للحرارة – تحدث فساد فى المعلبات يسمى **Sulfur stinker or sulfide** فى الأغذية المنخفضة الحموضة مثل البسلة أو الذرة . ونسبياً فإن جراثيم هذا الميكروب أقل مقاومة للحرارة من جراثيم النوع السابق (المسبب لفساد **T.A**) أو الجراثيم المسببة للفساد الحامضى **Flat-sour** فإن وجود جراثيم الفساد الكبريتى فى الغذاء بعد عملية التعقيم دليل هام على عدم كفاءة التعقيم واحتمال وجود جراثيم الأنواع الأخرى الأكثر مقاومة للحرارة . وكما ذكرنا فإن هذا النوع ثرموفيلى حتمى ولذلك فالفساد يحدث عادة بسبب عدم إجراء عملية التبريد بالسرعة المطلوبة مباشرة عقب التعقيم التجارى – أو أن تخزن العلب فى درجة حرارة مرتفعة.

ويكشف عن جراثيم هذا النوع باستخدام بيئة تسمى آجار كبرتيت الحديد **Iron-sulfite-agar (ISA)** . فتعطى مزارع سوداء مميزة **(FeS colonies)**.

ويتكون غاز كبرتيد الأيدروجين فى علب البسلة والذرة وتكون الرائحة واضحة عند فتح العلبة ومحلول التعبئة رمادى مزرق **Bluish-gray** والحبوب سوداء (ذرة سكرية).

والبسلة المصابة (المعلبة) تعطى رائحة كبريتيد الأيدروجين دون تغير فى اللون.

Cl.pasteurianum, Cl.butyricum:

هذه الأنواع تسبب الأنتفاخ فى المعلبات أو عبوات الغذاء خاصة الحامضية أو المتوسطة الحموضة (٤،٥ – ٣،٧ الحامضية مثل الطماطم والكمثرى ، ٥،٣ – ٤،٥ مثل السبانخ والخضروات) وتسبب تكوين غازات ثانى اكسيد الكربون والهيدروجين.

Cl. Putrefaciens, Cl. Sporogenes ,Cl. butulinum

هى أنواع ميزوفيلية نشطة فى تحليل البروتين وإنتاج المركبات الغير مرغوبة مثل كبريتيد الأيدروجين ، الميركبتان ، الأمونيا ، الأندول ، الاسكاتول . وتنتج الأيدروجين وثانى أكسيد الكربون.

والنوع ***Cl,perfringens*** ميزوفيلى ويسمى ***Cl.welchii*** وهو يسبب التخمر العاصف **Stormy Fermentation** وينتج روائح كريهة وغازات خاصة فى الجبن ومنتجات الألبان الملوثة بجراثيم هذا النوع . ودرجة الحرارة المثلى له ٣٥–٣٧°م.

www.oxcart.com

والمصدر الرئيسى لبكتريا جنس *Clostridium* هى التربة حيث تعيش فى ظروف لاهوائية فى جيوب **pockets** وربما تكون هذه الظروف اللاهوائية تنتج من الكائنات الاختيارية التى تعمل على مختلف المركبات العضوية الموجودة.

وعدد من الكوستريديا تتأقلم مع الظروف اللاهوائية فى أمعاء الحيوانات الثديية وأيضاً تختلف عن تلك التى تعيش فى التربة وتسبب مختلفة الأمراض فى ظروف خاصة.

ثانياً عائلة *Lactobacillaceae*

بكتريا هامة جداً فى مجال الأغذية وتسمى بكتريا حامض اللاكتيك لأنها تنتج حامض اللاكتيك كمنتج أساسى وهى بكتريا موجبة لجرام ولا تنتج أنزيم الكتاليز. وهى تعانى نقص فى البورفيرينات والسيتوكرومات. وهى بذلك لا تستطيع الحصول على الطاقة عن طريق الفسفرة الأكسيدية **Oxidative Phosphorylation** وتحصل على الطاقة عن طريق الفسفرة على مستوى مادة التفاعل (SLP).

وكل بكتريا حامض اللاكتيك تنمو لا هوائيا وعلى عكس طبيعة اللاهوائيات من الأنواع الأخرى فأنها غير حساسة للأكسوجين (O_2) وتنمو فى وجود أو غيابه وبذلك تعتبر لاهوائية اختيارياً **Facultative anaerobes** .

وبعض سلالات بكتريا حامض اللاكتيك لها القدرة على امتصاص اكسوجين (استخدامه) خلال نظام الفلافوبروتين **Flavoprotein oxidase** منتجة فوق أكسيد الأيدروجين يد٢ أ٢ ولا يتكون جزيئات **ATP** فى هذه العملية ولكن نظام **Oxidase** يستعمل لاعادة تنشيط **$NADH_2$**.

ومعظم أفراد بكتريا حامض اللاكتيك يمكن أن تحصل على الطاقة فقط من السكريات والمركبات المماثلة ولها قدرة تخليقية محددة ولذلك فإن احتياجات النمو لها معقدة مثل ضرورة توفير الأحماض الأمينية والفيتامينات والبيريميدينات وتقسم بكتريا حمض اللاكتيك على أساس طبيعة المواد المتكونة أثناء تخمر السكريات وإنتاج حامض اللاكتيك إلى قسمين:-

١- أنواع متجانسة : **Homofermentative**

وهى تنتج حامض اللاكتيك كمنتج وحيد أساسى فى التخمر وهذه الأنواع تنتج أنزيم **aldolase** ويعتبر المفتاح الأساسى فى الجلكزة وتنتج ٢ جزئ **ATP** لكل جزئ جلوكوز وكذلك فهى تنتج ضعف الكمية من الكتلة الخلوية **cell mass** عن الغير متجانسة من نفس كمية الجلوكوز.

www.6pdf.com

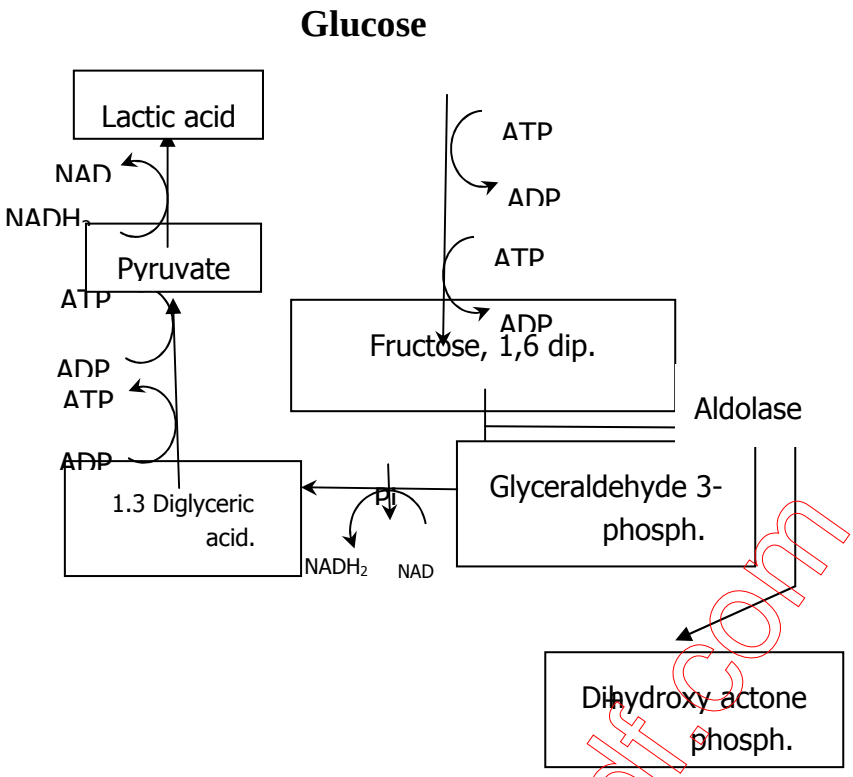
٢- أنواع غير متجانسة : **Heterofermentative**

حيث تنتج منتجات أخرى بجانب حامض اللاكتيك وهى تعانى نقص فى أنزيم الالدوليز وبالتالى لو يحدث كسر الهكسوز ثنائى الفوسفات إلى التريوز الفوسفاتى ولكنها تؤكسد الجلوكوز -٦- فوسفات إلى -٦- فوسفوجلوكونيك ثم تجرى على هذا المركب نزع كربوكسيل ويتحول إلى سكر خماسى ثم سكر ثلاثى ، اسيتيل فوسفات بواسطة أنزيم phospho ketolase ويتحول التريوز إلى حامض لاكتيك وينتج جزئ واحد من ATP بينما يستقبل الالكترونات $NaDH_2$ المتولد أثناء إنتاج السكر الخماسى المفسفر كما فى الشكل.

ولأن الأنواع الغير متجانسة تؤكسد الجلوكوز ثم تحدث نزع كربوكسيل وإنتاج ك أ٢ كمنتج من فعلها بينما ذلك لا يحدث بواسطة الأنواع المتجانسة Homo حيث تنتج كمية صغيرة من ك أ٢ أو لا تنتج إطلاقاً ولذلك فإن من أبسط الاختبارات التميز بين الأنواع المتجانسة ، والغير متجانسة هو كشف ملاحظة الغاز فى مزارع الأنواع الغير متجانسة. وعلى مستوى المحتوى من الأنزيمات نجد أن الأنواع الــHetero تعانى نقص فى أنزيم الالدوليز Aldolase بينما يوجد بها أنزيم Phosphoketolase وعدد من سلالات الأنواع الغير متجانسة يمكن أن تستخدم O_2 كمستقبل الكترونى وتكون بذلك ك أ٢ ، حمض الخليك واللاكتيك كمنتجات نهائية وبالتالى تنتج ٢ جزئ من جزئ واحد من الجلوكوز.

www.oxpdf.com

التخمر المتجانس للجلوكوز:

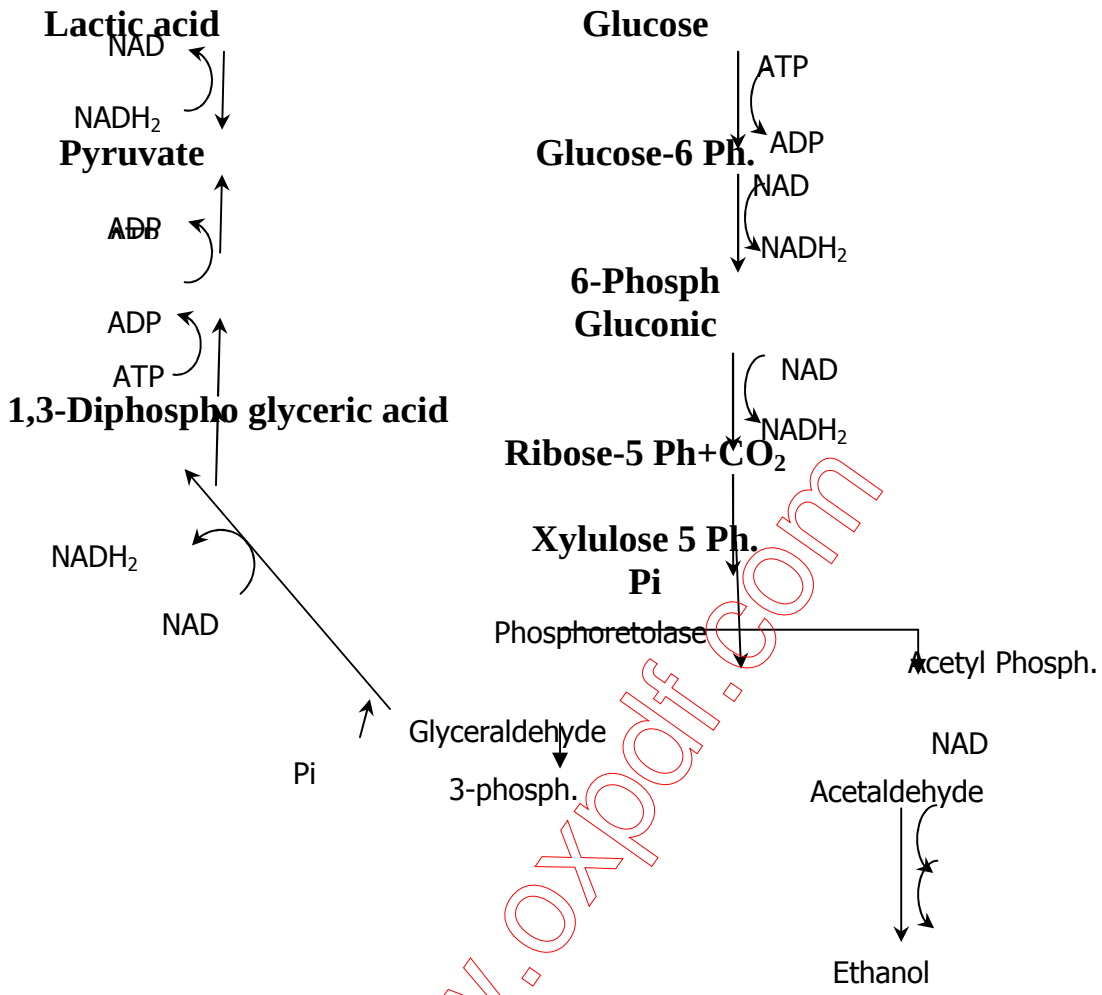


Net gain = 2ATP

2 Lactic acid/glucose molecule ferm.

www.oxpdf.com

التخمر المختلط للجلوكوز:



www.Oxpdf.com

Net gain = 1 ATP

(1 Lactic acid + 1 ethanol + 1CO_2)

Minor products (actic acid, formic acid, glycerol) from alternate pathways.

وتختلف الأجناس التابعة لبكتريا هذه العائلة على أساس شكل الخلية. ونوع التخمر الذى تقوم به. عموماً فهى كما ذكرنا تقسم إلى متجانسة التخمر وغير متجانسة، أما من حيث شكل الخلية فتوضع البكتريا الكروية من هذه العائلة فى عائلة ***Streptococcaceae*** و عائلة***Enterococcaceae*** *وعائلة* ***"Leuconostocaceae*** أما العصوية منها فتتبع عائلة ***Lactobacillaceae*** .

١- جنس ***Streptococcus***

كما ذكر هى بكتريا كروية فى أزواج أو سلاسل قصيرة أو طويلة وكلا من النوع المتجانس التخمر . ويمكن عزلها بسهولة من المواد الطبيعية. ويمكن استخدام بيئات مضاف لها ٠,٠٥% أزيد الصوديوم (N_aN_3) وهى تكون من الجلوكوز والببتون أو مستخلص اللحم ليكون مصدر لعوامل النمو اللازمة والأحماض الأمينية وينظم رقم الحموضة إلى ٧،٥ وبذلك تكون مناسبة لنمو أنواع **Stroptococci** وسائر أنواع بكتريا حامض اللاكتيك الكروية. ويجرى أيضاً إضافة أزيد الصوديوم إلى بيئات آجار الدم لاختبار كشف الأنواع المرضية من **Streptococci**

٢- جنس **Lactococcus**

ويشمل على أنواع بكتريا حامض اللاكتيك الموجودة فى اللبن مثل ***Lactococcus lactis, Lactoccus.cremoris*** .

وهذه البكتريا تستخدم كبادئات للجبن وبعض أنواع وجدت مع أنواع من **Leuconostoc** فى الزبد واللبن الخام والمتخمر وهى عادة لا تقاوم أكثر من ٢-٤% ملح ولذلك لا تخص التخمر اللاكتيكى للخضروات المخللة. وعادة مصدرها النباتات الخضراء والعلف والسيلاج والأوانى.

٣-جنس ***Enterococcus***

وتشتمل على***Enterococcus faecalis , Enterococcus faecium*** وهى أكثر انتشاراً فى الأغذية وتشبه كل منها الآخر ويمكن التفرقة بينهم بواسطة الاختبارات الفسيولوجية وكذلك تشتمل على***Ent. durans*** وبكتريا ***Enterococcus faecalis***اكثرهم مقاومة للحرارة ومصدره فضلات الإنسان ، بينما ***Ent.faecium*** من مصدر نباتى.

www.oxpdf.com

والنوع *Enterococcus. liquefaciens* من النوع المحلل للبروتين بينما الصنف *Entero.zymogenes* من النوع *B.hemolytic* وبكتريا هذا الجنـــس يمكن أن تنمو عند ١٠°م ، ٤٥°م.

وهذا الجنس يشار إليها **Fecal** له صفات تختلف عن باقىالاجناس الكروية مما يجعله هاما فى مجال الغذاء وهى:

- مقاومته للحرارة **thermoduric** حيث يتبقى بعد البسترة.
- يتحمل أكثر من ٦،٥% ملح.
- ينمو فى المدى القاعدى من رقم الحموضة يبلغ ٩،٦.
- ينمو فى مدى واسع من درجات الحرارة فالبعض يتكاثر على أقل من ٥° إلى ٨°م وأغلبها عند درجة ٤٨°م إلى ٥٠°م.

٤-جنس : *Pediococcus*

والنوع الذى وجد منها فى الأغذية هو *P.cerevisiae* وهى بكتريا كروية توجد منفردة أو فى أزواج أو سلاسل قصيرة أو رباعيات (تنقسم فى اتجاهين) وهى لا تفرز الكتاليز ومن النوع المتجانس التخمر **Homo** وهى من **Microaerophilic** وتخمر السكريات معطية ٠,٩-٠,٥% حامض أغلبه حامض لاكتيك وتنمو فى برافين ملحى أكثر من ٥،٥% ويضعف نموها إلى تركيزات ملح أكثر من ١٠%. وتستطيع النمو فى مدى من درجات الحرارة ٧-٤٥°م والدرجة المفضلة ٢٥-٣٢°م.

ومن أهم الصفات التى تجعل بكتريا هذا الجنس هامة فى الغذاء: مقاومتها للملح ، إنتاجها للحامض ، قدرتها على النمو فى مدى واسع من درجات الحرارة خاصة القدرة على النمو فى درجات حرارة التبريد.

٥- جنس *Leuconostoc*

هذا الجنس يشمل على الأنواع غير المتجانسة **Hetero** الكروية وتخمر أفراده السكر إلى حامض لاكتيك وكميات محسوسة من الخليك والأيثايل ، CO_2 والأنواع مثل *L.citrovorum, L.dextranicum* لها قدرة على تخمر حامض الستريك الموجود فى اللبن وتنتج المركبات المرغوبة (داى استيل ، مركب ٣،٢ بيوتانديول) وهى تدفع بكتريا حامض اللاكتيك للنمو فى بادئات الزبد والجبن.

والأنواع *L.dextranicum, lactococcus lactis ssp. diacetylactis* تتشابه وتنتج المركبات المرغوبة فى إعطاء النكهة وتنتج كميات أكبر من الغاز.

www.ofpdf.com

ومن الصفات الهامة لبكتريا هذا الجنس *Leuconostoc* والتى تجعله هاماً فى الأغذية:

١- إنتاج الداى استيل وسائر المركبات المسئولة عن النكهة.

٢- مقاومة التركيزات العالية من الملح الموجودة فى السوركروت وبعض المخللات الأخرى. وهى تدفع النمو فى المرحلة الأولى للتخمر حيث تعمل *L.mesenteroides* فى المرحلة الأولى فى التخليل وتهئ الظروف لبكتريا حمض اللاكتيك.

٣- قدرتها على بدء التخمر فى الخضروات بسرعة وتنتج كمية كافية من الحامض تثبط الأنواع خلاف بكتريا حمض اللاكتيك.

٤- تحملها لتركيزات عالية من السكر تصل إلى ٦٠% للنوع *L.mesenteroides* وبالتالى تسمح للميكروب بالنمو فى الشراب والآيس كريم وسائر المركزات.

٥- إنتاجها لكميات محسوسة من غاز ك أ٢ من السكريات وتعطى بذلك العيب المعروف "Openness" الثقوب فى بعض أنواع الجبن وأفسادها للأغذية ذات المحتوى العالى من السكر ، والتخمر فى بعض أنواع الخبز.

٦- بعض سلالات منها تنتج كمية كبيرة من مادة الدكستران عديد التسكر dextran polysaccharides (a-1,6glucan) فى البيئات المحتوية على السكروز . وبعض سلالات منها أيضاً تنتج فراكتوز بوليمر يسمى ليفان Levan.

وتطبيق ذلك يكون فى مظهر تكوين للزوجة الكثيفة فى البيئات المحتوية على السكروز ، ومصدر هذه البكتريا عادة هو سطوح النباتات..

٦- بكتريا جنس Lactobacillus

البكتريا العصوية التابعة لمجموعة بكتريا حامض اللاكتيك التابعة لعائلة Lactobacillaceae وهى عادة طويلة اسطوانية فى سلاسل فى معظم الأنواع وهى من أنواع Microaerophilic ولا تنتج أنزيم الكتاليز وموجهة لجرام وتخمر السكريات وتعطى حامض اللاكتيك كمنتج رئيسى وبعض الأنواع متجانس التخمر -Homo وأخرى غير متجانسة -Hetero أو تقسم على حسب درجة الحرارة المفضلة للنمو.

والصفات التى تجعل بكتريا *Lactobacilli* هامة فى الأغذية هى:-

١- قدرتها على تخمر السكريات مع إنتاج كميات من حامض اللاكتيك تمكن من استخدامها فى المخللات ومنتجات الألبان أو تصنيع حامض اللاكتيك. ولكنها تكون غير مرغوبة فى

www.oxpdf.com

بعض المنتجات مثل البيرة السويسرى أو *L.hilagardii* أو *L.trichodes* فى المشروبات الكحولية.

٢- عدم قدرتها على تخليق الفيتامينات اللازمة لنموها تجعلها غير قادرة على النمو جيداً فى الأغذية الفقيرة منها إلا أنها تجعلها من وجهة أخرى مفيدة فى طرق تقدير بعض الفيتامينات فى الأغذية.

٣- مقاومتها للحرارة وتحملها لدرجات عالية لاغلب أنواع تمكنها من البقاء بعد البسترة أو المعاملات الحرارية مثل تلك التى تعطى للخثرة فى بعض أنواع الجبن المطبوخ.

٤- وقد وجدت أنواع أخرى من بكتريا Lactobacillus تختلف عما ذكر نامية فى اللحوم المحفوظة بالتبريد وأقترحت لها الأسماء *L.viriodescens* حيث تسبب الأخضرار فى السجق *L.salimandus* تنمو أيضاً فى السجق ، وهى تعتبر أستثناء من بكتريا حمض اللاكتيك لقدرتها على النمو فى درجات الحرارة المنخفضة.

هذا ومما هو جدير بالذكر أن كثير من البكتريا الأخرى خلاف بكتريا حامض اللاكتيك يمكنها أن تنتج حامض اللاكتيك مثل كثير من أنواع جنس Bacillus مثل *B.cereus* بكتريا أخرى مثل *E.coli, B.stearothermophilus* .

عائلة : *Micrococcaceae*

الأجناس الهامة فى الغذاء فى هذه العائلة هى :

Micrococcus, Sarcina, Staphylococcus

جنس *Micrococcus*:

خلايا كروية تكون عادة فى تجمعات غير منتظمة . ومعظم الأنواع الموجودة منها فى الغذاء موجبة لجرام هوائية تنتج أنزيم الكتاليز ودرجة الحرارة المثلى للنمو ٢٥-٣٠°م.وتنمو جيداً فى البيئات المعملية المعتادة. وأفراد هذا الجنس تختلف أختلافاً كبيراً بحيث يجعل من الصعب تحديد صفات عامة لها. ولكن الصفات العامة لأفراده هى كما يلى:-

١- بعض أنواعها يستخدم أملاح الأمونيوم أو المركبات النيتروجينية البسيطة الأخرى كمصدر وحيد للنيتروجين.

٢- معظمها يستطيع تخمير السكريات مع إنتاج كميات متوسطة من الحامض.

٣- بعضها مقاوم جداً للملح salt-tolerant وبالتالى تستطيع النمو فى مستويات منخفضة من الرطوبة الحرة. فهى تنمو على اللحم المملح ومحاليل التمليح وفى تنكات البراين Brines.

www.Oxpdf.com

٤- عديد منها **Thermoduric** وبالتالى تبقى بعد البسترة التى تعطى للألبان مثل *M.verians* .

٥- بعضها ينتج صبغات. وتغير بذلك لون سطوح الأغذية التى تنمو عليها *M.flavus* يعطى اللون الأصفر *M.roseus* تعطى اللون الوردى.

٦- بعضها ينمو جيداً عند درجات حرارة ١٠°م أو أقل.

وعموماً فإن البكتريا الكروية **Micrococci** شائعة الانتشار فى الطبيعة وعزلت من التراب والماء. وغالباً تتواجد فى أوانى والالات والأوعية المستخدمة فى التصنيع الغذائى الغير معتنى بنظافتها.

جنس *Staphylococcus*:

خلايا منفردة. موجبة لجرام فى أزواج أو رباعيات أو فى شكل غير منتظم مشابه لعناقيد (عنقودية). ومن الأنواع الهامة لهذا الجنس ***S. aureus*** وهى تعطى لون أصفر أو برتقالى أو أبيض.والأنواع المختلفة تحتاج إلى مصدر عضوى للنتروجين. وهى اختيارية بالنسبة لاحتياجها للأكسوجين. معظمها من النوع **Beta hemolytic** وتنتج الأنواع المرضية أنزيم **Coagulase** والبعض يفرز توكسين داخلى **Enterotoxin** يسبب التسمم الغذائى. ***S.epodermidis*** متطفلة .

www.oxpdf.com

ثانيا شعبة**Gammaproteobacteria**

عائلة *Enterobacteriaceae*

وهذه العائلة تضم الأجناس التالية *Aranicola* ،*Aquamonas* *Alishewanella* ،*Alterococcus* ، *Budvicia* ، *Buchnera* ، *Brenneria* ، *Blochmannia*، *Azotivirga* ، *Arsenophonus* ، *Edwardsiella* ، *Dickeya* ، *Cronobacter* ، *Citrobacter* ، *Cedecea* ، *Buttiauxella* ، *Hafnia* ، *Grimontella* ، , *Ewingella* , *Escherichia* *Erwinia* ، *Enterobacter* ، *Morganella* ، *Moellerella* ، *Leminorella* ، *Leclercia* ، , *Kluyvera* *Klebsiella* ، *Plesiomonas* ، *Photorhabdus* ، *Pectobacterium* ، *Pantoea* ، *Obesumbacterium* ، *Raoultella* ، *Rahnella* ، *Providencia* , *Proteus* ، *Pragia* ، *Poodoomaamaana* *Trabulsiella* ، *Tatumella* ، *Sodalis* ، , *Shigella* *Serratia* ، *Samsonia* ، *Salmonella* , *Yokenella* *Yersinia* ، *Xenorhabdus* ، *Wigglesworthia*

وهى عصويات غير متجرثمة سالبة لجرام ، لاهوائية اختيارية ، تنمو جيداً فى البيئات الصناعية.

مجموعة بكتريا القولون "الكلوليفورم" Coliform or coliserogenes:

وتضم أجناس *Citrobacter* ، *Cronobacter*، *Enterobacter* ، *Escherichia* , وهى عصويات قصيرة. تستخدم كدليل ميكروبى على إحتمالية التلوث بمخلفات الإنسان او الحيوان . والكشف عن وجودها يعتبر من الطرق القياسية فى فحص الماء واللبن والغذاء بصفة عامة وتحديد صلاحيته للأستعمال الآدمى وهى لاهوائية اختيارياً وسالبة لجرام وغير متجرثمة وتخمر اللاكتوز مع تكوين غاز . الأنواع المثله لها , *Escherichia coli* *Enterobacter aerogenes*لأن *E.coli* المصدر الأساسى لها هو أمعاء الحيوان والإنسان بينما*Enterobacter .aerogenes* مصدره نباتى . (على الرغم من أنها عزلت أيضاً من الأمعاء) ، *E.coli* يكون حامض بكمية أكبر فى مرقالجلوكوز . وباستخدام اختبار دليل أحمر الميثيل يمكن التفرقة . كذلك تكون الأندول ولا تكون مركب Acetoin (A.M.C.) معطية ثانى أكسيد الكربون والهيدروجين بنسبة ١ : ١ ولا تمثل السترات كمصدر وحيد للكربون. بينما*Enterobacter aerogenes* تنتج حموضة بكمية أقل ، أستيل ميثيل كربينول ولا تكون أندول وتعطى ثانى أكسيد الكربون وهيدروجين بنسبة ٢ : ١ وتمثل السترات كمصدر وحيد للكربون ، وتعطى كمية أكبر من الغاز عن *E.coli* وبالتالى سوف تكون أخطر من حيث الفساد الغازى فى الجبن واللبن وسائر الأغذية التى يمكن أن تنمو عليها وكلا من النوعين تخمر اللاكتوز معطية حامض اللاكتيك بكمية أكبر من *E.coli* والأيثانول وحمض الخليك والسكستيك وثانى أكسيد الكربون والهيدروجين.

وهناك عدد من بكتريا الكوليفورم تعتبر أنواع متوسطة بين *E.coli,Ent.aerogenes* فى صفاتها . وبعض أنواع الكوليفورم تخمر اللاكتوز ببطء أو لا تخمر مطلقاً كما فى جنس *Paracolobacterum* .

وبصفة عامة بكتريا مجموعة الكوليفورم غير مرغوب فى وجودها فى الغذاء والماء والأسماك وتعتبر دليل على التلوث من ماء المجارى واحتمال وجود البكتريا المرضية.

ومن الصفات الهامة لبكتريا مجموعة الكوليفورم :

www.oxoid.com

١- قدرتها على النمو جيداً واستخدام عديد من المواد المختلفة. كربوايدراتية أو بعض المركبات العضوية للحصول على الطاقة. كذلك قدرتها على استخدام بعض المركبات النيتروجينية البسيطة.

٢- قدرتها على تخليق الفيتامينات الضرورة اللازمة لنموها.

٣- قدرتها على النمو فى مدى واسع من درجات الحرارة من أقل من ١٠°م (٥٠°ف) إلى ٤٦°م (١١٤،٨°ف).

٤- قدرتها على تكوين كميات كبيرة من الحامض والغاز من السكريات .

٥- تكون روائح غيرمرغوبة توصف عادة **"unclean"** أو **"barny"** (الحظائر) فى الأغذية التى تنمو فيها.

٦- قدرة ***Enterobacter aerogenes*** على تكوين لزوجة أو عفن فى الأغذية الملوثة بها **Sliminess or ropiness**.

جنس ***Erwinia*** :

الأنواع الخاصة بهذا الجنس ممرضة للنبات. وتسبب أنواع الهدم المختلفة للنباتات والخضراوات والفواكه. مثل أنواع العفن المختلفة. والنوع الممثل ***E.carotovera*** تسبب مرض **Bacterial soft rot** وهى سالبة لجرام عصوية.

جنس ***Serratia***:

بكتريا هذا الجنس عصوية صغيرة هوائية سالبة لجرام متحركة تنتج صبغات حمراء وتسبب تغير الألوان إلى اللون الأحمر على سطوح الأغذية ***S.marcescens*** من الأنواع الهامة.

جنس ***Proteus***:

عصويات ميزوفيلية سالبة لجرام يتميز أفراده بالحركة الكبيرة وينتج اليورييز **Urease** حيث يسبب عدوى للقناة البولية للأنسان ويحدث التهاب الأمعاء المستعمرة النامية منها تظهر كسلاسل حلقات. عزلت من اللحوم والبيض الفاسد ومنتجات البحار. وأعطت الروائح العفنة **Putrefactive** ووجود أعداد كبيرة من بكتريا هذا الجنس فى الغذاء الغير مبرد سوف يكون هناك احتمال حدوث تسمم غذائى وهى تكون حامض وغاز من السكريات. ومن الأنواع المنتشرة ***P.vulagris*** .

www.ofpdf.com

جنس *Salmonella*:

الأنواع الخاصة بهذا الجنس يتسبب الأمراض المعوية *S.enteritidis* يمكن أن تنمو فى الأغذية ويصبح الغذاء وسيلة للعدوى ويمكن التحكم فى الأمراض الناتجة بأفراد السالمونيلا عن طريق البسترة السليمة للبن ومعاملة مياه المجارى وتنقية مياه الشرب وعزل الأشخاص الحاملين للمرض وأبعادهم عن صناعة الأغذية وتداولها لأنها يمكن أن تنتقل من شخص لأخر فى الطعام أو الماء الملوث من مصادر البراز. والتهاب الأمعاء Gastroenteritis يتسبب عن أنواع من السالمونيلا وهو يضم الأصناف *التالية* *Salmonella enterica subsp. enterica serovar* Enteritidis , *Salmonella enterica subsp. Enteric* , *Salmonella enterica subsp. enterica serovar* Paratyphi A , *Salmonella enterica subsp. enterica serovar* Paratyphi B , *Salmonella enterica subsp. enterica serovar* Paratyphi C , *Salmonella enterica subsp. enterica serovar* Typhi , *Salmonella enterica subsp. enterica serovar* Typhimurium

جنس *Shigella*:

أنواع هذا الجنس تسبب الدوسنتاريا ويمكن أن تنتقل بواسطة الغذاء *Shigella dysenteriae*، توجد غالباً فى بقايا وآثار براز الإنسان وتسبب الدوسنتاريا البكتيرية لتميزها عن الدوسنتاريا الأميبية. ولله الحمد فإن الميكروب لا يهاجم الدم والمرض غير مميت أنما دوسنتاريا حادة لأيام قليلة لأفرازها لتوكسين داخلى قوى وتنتشر فى التجمعات حيث لا تتبع الاشتراطات الصحية السليمة.

www.gxpdf.com

الطرق الميكروبيولوجية المستخدمة لتحليل عينات الغذاء

تستخدم طرق عديدة ومختلفة لأجراء تحليل ميكروبيولوجى للأغذية للحكم على جودة وصلاحية الغذاء للأستهلاك الآدمى ، ويمكن تقسيم الطرق المستخدمة فى التحليل تبعاً لنوعية الميكروبات الموجودة بالمادة الغذائية. وبناء على ذلك يمكن تقسيم الميكروبات إلى:

١- ميكروبات تستخدم كدلائل.
٢- ميكروبات مرضية.
٣- ميكروبات مسببة للفساد.

ويجب فى البداية شرح الطرق العامة لعد البكتريا وكذلك شرح للطرق المستخدمة لتقدير أعداد الخمائر والفطريات فى المادة الغذائية.

أولاً : طرق عدد البكتريا والخمائر والفطريات :

طرق عد البكتريا الحية: Methods for determining the viable count

الأساسيات : جميع الطرق المستخدمة فى إجراء التحليلات الميكروبيولوجية تعتمد على :

١- الحصول على عينة المادة الغذائية بحيث تكون ممثلة للمادة الغذائية التى تجرى عليها التحليلات المطلوبة وأتخاذ جميع الإجراءات الخاصة بمنع تلوث هذه العينات من مصادر خارجية .

٢- رج المزرعة المراد عد البكتريا فيها أو مزج عينة المادة الغذائية مزجاً جيداً فى محلول التخفيف حتى يتم توزيع مستعمرات مزارع البكتريا جيداً فى محلول التخفيف وتتفتت إلى خلايا منفردة.

٣- إجراء خطوات مختلفة من التخفيف بناء على الأعداد المتوقع وجودها فى المادة الغذائية.

٤- زرع التخفيفات المختلفة على أطباق ، حيث يتم مزج الميكروبات بالعينة ببيئة الآجار على أن يكون كل ميكروب بعد ذلك مستعمرة يمكن مشاهداتها بعد تحضين الأطباق على درجة الحرارة المناسبة لنمو الميكروبات .

٥- عد هذه المستعمرات بعد فترة التحضين المناسبة.

وتستخدم ثلاث طرق لتقدير أعداد البكتريا الحية فى المادة الغذائية وهى :

أ- طريقة الصب على الأطباق **Pour plate**.
ب- طريقة الأطباق المنشورة**Spread plate**

www.oxdf.com

ت- طريقة التنقيط على الأطباق Drop plate.

جـــ- طريقة العد فى الأنابيب.

ويجب أن يؤخذ فى الاعتبار أن لهذه الطرق بعض العيوب منها أن الخلايا الميكروبية توجد دائماً فى شكل تجمعات أو سلاسل أو فى أزواج فى المادة الغذائية وقد لا تنفصل كلية عند مزج العينة وعمل التخفيفات. وعلى أى حال فإن كل مستعمرة تظهر قد تنشأ من خلية مفردة أو مجموعة من الخلايا ، ولذلك فإن العدد الكلى قد لا يعطى نتيجة حقيقية للأعداد البكتيرية الموجودة فعلاً فى عينة الغذاء بالإضافة إلى ذلك فإن بعض الميكروبات لا تستطيع النمو وتكوين مستعمرات يمكن رؤيتها على بيئية الآجار وذلك نتيجة للظروف غير الملائمة لها مثل درجة الحرارة ووجود الأكسجين ونقص المواد الغذائية أو أن المستعمرة أصلاً ضعيفة.

١-الطرق المستخدمة فى عد البكتريا الهوائية الحية المحبة لدرجة الحرارة المتوسطة:

أ- **طريقة الصب فى الأطباق :**

الأجهزة والزجاجيات :

١- أطباق بترى قطر ٩٠-١٠٠ مم (زجاج أو بلاستيك) معقمة.

٢- ماصات سعة ٠،١ ، ٠،٥ ، ١ ، ١٠ مل مدرجة ومعقمة.

٣- حمام مائى مضبوط درجة حرارته على (٤٥-٥٠°م) وبه ترمومتر لقياس درجة الحرارة.

٤- حضانة يتم ضبط درجة حرارتها على درجة الحرارة المطلوبة (٣٠°م) تقريباً .

٥- عداد لعد البكتريا.

البيئات :

١- محلول ببتون معقم او منظم ببتون يستخدم لعمل التخفيفات اللازمة ويحضر بإذابة ٩ جرام كلوريد الصوديوم و ١ جرام ببتون فى لتر ماء مقطر.

٢- بيئة العد الكلى Plate count agar .

٣- محلول التخفيف Buffered peptone water .

ملحوظة : يمكن استخدام محلول الببتون أو ماء الببتون المنظم فى عمل التخفيفات اللازمة.

طريقة العمل:

أ- تجهيز العينة :

www.oxpdf.com

يوزن ٢٥ جرام من العينة الممزوجة بطريقة معقمة وذلك بوضعها فى خلاط او جهاز ستوماخر (تحت ظروف التعقيم) ثم يضاف ٢٢٥مل من ماء الببتون المنظم. ويتم تشغيل الخلاط على سرعة ١٥،٠٠٠ إلى ٢٠،٠٠٠ لفة فى الدقيقة لمدة ٢-٣ دقائق لتجانس وتوزيع محتويات المادة الغذائية فى محلول التخفيف.

ب- عمل التخفيفات :

١- تمزج العينة وترج جيداً ثم ينقل ١ مل منها ويوضع فى الأنبوبة المحتوية على ٩مل من ماء الببتون المنظم الذى سبق تحضيره ثم يمزج جيداً عن طريق الرج بأستخدام الأيدى أو بأستخدام جهاز رج الأنابيب لتوزيع وتجانس المحلول. (تخفيف ١)

٢- يؤخذ من المحلول الأول (تخفيف ١) ١ مل إلى أنبوبة أخرى محتوية على ٩مل من ماء الببتون ويتم المزج جيداً (تخفيف ٢) .

٣- تكرر هذه العملية ثلاث أو أربع مرات حتى تصل إلى التخفيف المطلوب بناء على الأعداد المتوقعة من البكتريا فى عينة المادة الغذائية.

جـــ- صب الأطباق :

١- يوضع ١ مل من التخفيف المطلوب فى أطباق بترى معقمة بأستخدام ماصة معقمة.

٢- يصب فى كل طبق بترى ١٥مل من بيئة الآجار المغذى (بيئة العد الكلى) المحفوظة على درجة حرارة (٤٥-٥٠°م) فى حمام مائى وذلك فى خلال ١٥ دقيقة من بداية صب التخفيفات.

٣- يمزج التخفيف مع بيئة الآجار وذلك بتحريك الأطباق حتى يتصلب.

ملحوظة :

١- يتم اسالة بيئة الآجار المغذى التى تم تحضيرها مسبقاً فى حمام مائى على درجة حرارة ١٠٠°م حتى يتم اسالة كاملة للبيئة ، ثم توضع الدوارق المحتوية على البيئة فى الحمام المائى لحين الاستخدام ولايستخدم الميكرويف فى الإسالة.

د- التحضين :

تحضن الأطباق المصبوبة وذلك بوضعها مقلوبة فى الحضانة على درجة الحرارة المناسبة لنمو الميكروبات (٣٠°م) لمدة ٤٨-٧٢ ساعة.

هــ- عد المستعمرات :

www.oxpdf.com

بعد أنتهاء فترة التحضين يتم عد جميع المستعمرات النامية فىالطبق وذلك فى الحدود (٣٠–٣٠٠ مستعمرة) فى كل طبق ، وتدون النتائج بعد ضرب العدد المتحصل عليه فى مقلوب التخفيف المستعمل.

و– طريقة الحساب :

١- إذا لم يظهر فى الطبق أى مستعمرات فإن النتيجة يعبر عنها بأنها أقل من ١ × ١٠^١ ميكروب/جرام أو ١مل من المادة الغذائية.

٢- إذا أحتوت الأطباق (تخفيف ٢) على عدد أقل من ٣٠ مستعمرة فأنه يعبر عنها أقل من ٣ × ١٠^٢ = (٣٠ × ١٠).

٣- إذا أحتوت الأطباق على عدد أكثر من ٣٠ تجرى عملية عد للطبقين فى التخفيف المراد ويحسب المتوسط ثم يضرب فى مقلوب التخفيف المستعمل ليعطى عدد الميكروبات لكل جرام أو ١ مل من المادة الغذائية.

مثال :

فى تخفيف ١/١٠٠

الطبق الأول كان العدد به ١٧٥ مستعمرة.

الطبق الثانى كان العدد به ٢٠٨ مستعمرة.

العدد الكلى فى الطبقين = ١٧٥ + ٢٠٨ = ٣٨٣ مستعمرة

المتوسط = ٢ = ١٩١ (تقريباً ١٩٠)

∴ العدد = ١٩٠ × ١٠٠ = ١٩٠٠٠ = ١،٩ × ١٠^٤وحدة مكونة للمستعمرات/جرام او المليلتر من الغذاء

ب– طريقة الأطباق المنشورة :Spread plate count

مـــع الطريقـــة تتشـــابه ولكن يتم صب الأطباق اولا ثم تترك لتتصلب ثم يتم اخذ ٠،١ مل من التخفيف ويتم نشره بواسطة ناشر زجاجى اومعدنى معقم على سطح الطبق وتكمل الخطوات كما هو فى الطريقة السابقة

ت– طريقة التنقيط على الأطباق :

فى هذه الطريقة يتم تحضير التخفيفات أولاً بنفس الطريقة التى تم ذكرها سابقاً. ثم بواسطة ماصة باستير المعقمة والتى تم معايرتها (لمعرفة كم عدد النقاط التى تساوى ١مل ، ثم يتم نقل المحلول الذى يساوى ١مل فوق سطح الآجار الذى تم صبه سابقاً فى الطبق

www.oxpdf.com

البترى المعقم ويتم توزيع المحلول بأنتظام فوق سطح طبقة الآجار ويترك لفترة لأمتصاص المحلول بواسطة الآجار (حوالى ٥-١٠ دقائق) ، بعد ذلك يمكن قلب الأطباق وتحضينها. ويتم تحضين الأطباق وهى مقلوبة على درجة الحرارة المناسبة لنمو الميكروب لفترة زمنية تتراوح بين ٤٨-٧٢ ساعة.

جـ- العد بطريقة الأنابيب :

هناك فرق طفيف جداً بين هذه الطريقة وطريقة العد على الأطباق . ومميزات هذه الطريقة تنحصر فى انخفاض كمية البيئة المستعملة وإمكانية استعمال الأنابيب بدل الأطباق . ويمكن تلخيص تلك الطريقة فى الخطوات التالية:

١- يتم عمل التخفيفات المطلوبة بنفس الطريقة السابقة.

٢- يتم تحضير البيئة المستخدمة فى أظهار النموات البكتيرية بوضع ٣مل من البيئة فى الأنابيب ثم يتم تعقيمها على درجة حرارة ١٢١°م/٢٠ دقيقة.

٣- رقم ثلاثة أنابيب أختبار المحتوية على ٣مل آجار بأرقام التخفيفات 10^{-2} ، 10^{-3} ، 10^{-4} . ويمكن زيادة التخفيف أكثر من ذلك فى حالة التوقعات المحتملة بأحتواء المادة الغذائية على أعداد كثيرة من البكتريا .

٤- ضع التخفيفات السابق تحضيرها فى طريقة الأطباق المصبوبة فى الحمام المائى (٤٥-٥٠°م) لمدة خمس دقائق حتى يتم تدفئتها.

٥- باستعمال ماصة معقمة يتم نقل ١،٠ مل من التخفيفات السابقة إلى أنابيب الأختبار المحتوية على الآجار المسال (٤٥-٥٠°م).

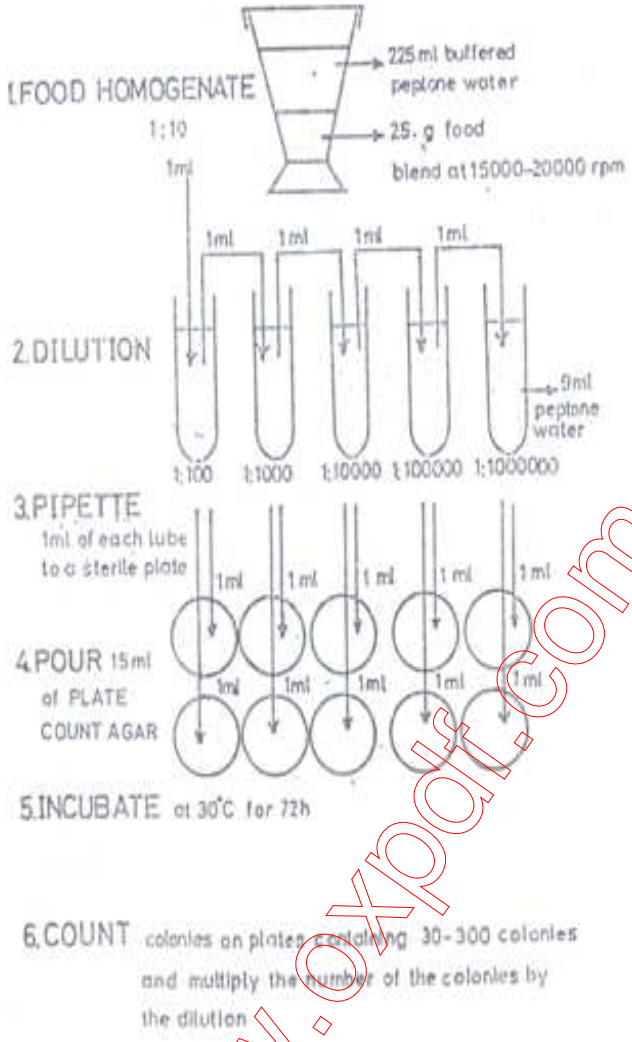
٦- أنقل أنابيب الاختبار بعد تلقيحها إلىالحمام المائى (٤٥-٥٠°م) مرة أخرى ثم رجها وهى فى داخل الحمام لمدة دقيقة لفرض توزيع معلق البكتريا فى الآجار وعدم تجمده.

٧- أنقل أنابيب الآجار من الحمام المائى إلى الحوض وأفتح صنبور الحنفية حتى يتدفق الماء ببطئ ويتم إمالة الأنبوبة قليلاً بحيث تكون زاوية قدرها ٣٠°وضعها أسفل الماء المتدفق مع إدارة الأنبوبة باستمراء حتى يجمد الآجار فى صورة طبقة واحدة منتظمة داخل جدار الأنبوبة.

٨- تحضن الأنابيب على درجة الحرارة المناسبة لمدة ٤٨-٧٢ ساعة.

٩- يتم عد مستعمرات البكتريا التى ظهرت على طبقة الآجار ومنها يمكن حساب أعداد البكتريا الموجودة فى كل جرام أو مل من المادة الغذائية كما هو موضح سابقاً

www.oxpdf.com



شكل ٦ رسم تخطيطى لطريقة الأطباق المصبوبة

www.oxpaf.com

٢- طريقة تقدير الأعداد الكلية من البكتريا اللاهوائية الحية:

Anaerobic total plate count

توجد عدة طرق تستخدم لتقدير العدد الكلى اللاهوائى من البكتريا فى المادة الغذائية منها:-

أ- **طريقة العد بأستخدام الصب فى الأطباق :**

تستخدم نفس الخطوات السابق الإشارة إليها فى طريقة تقدير أعداد البكتريا الهوائية باستخدام طريقة الصب فى الأطباق ولكن يتم تحضين الأطباق تحت ظروف لاهوائية لمدة ٣ أيام على درجة حرارة ٣٢°م. ويتم توفير الظروف اللاهوائية أما بتحضين الأطباق مباشرة

بعد تصلب الآجار فى حضانات تحت ظروف لاهوائية او فى اوعية تنمية لاهوائية أو يتم تهيئة الظروف اللاهوائية بوضع طبقة من الآجار تحتوى مادة مختزلة – فوق سطح طبقة الآجار التى تم اضافتها والمحتوية على التخفيفات لتوفير الظروف اللاهوائية.

ب- طريقة العد باستخدام الأنابيب الدوارة **Role tube method**:

وفيها تستخدم أنابيب بيضاوية ذات عنق مستدير وتوضع بها بيئة النمو السابق ذكرها ، حيث يتم غلى البيئة أولاً لطرد كل آثار الأكسجين ثم تبرد. بعد ذلك يتم تلقيح الأنابيب بالتخفيفات السابق تجهيزها ثم تترك لتتصلب ثم تغطى باستخدام بيئة آجار أزرق الميثيلين ويسمى هذا (**Indicator cap**) التغير فى لون أزرق الميثيلين أثناء التحضين. ويمكن استخدام بيئة آجار الثيوجليكولات فى التغطية. تحضن الأنابيب على ٣٢°م لمدة ٤٨–٧٢ ساعة وتسجل أعداد المزارع لكل جرام من المادة الغذائية.

<u>٣–تقدير أعداد البكتريا الثرموفيلية (المحبة لدرجة الحرارة المرتفعة) **Thermophilic counts**</u>

أ- العدد الكلى الهوائى:

يتبع نفس الإجراء الذى استخدم فى تقدير العد الكلى باستخدام نفس بيئة النمو ونفس الخطوات السابق ذكرها فيما عدا تحضين الأطباق بعد التصلب على درجة حرارة ٥٥°م لمدة ٤٨ ساعة . وتسجل النتائج كعدد كلى هوائى ترموفيلى للجرام من المادة الغذائية.

ويلاحظ أن هذه الطريقة تسجل أعداد البكتريا الثرموفيلية الاختيارية والإجبارية ، كما وأن بعض بكتريا الـــ **Lactobacilli** الميزوفيليه (المحبة لدرجة الحرارة المتوسطة) والتى لها درجة حرارة مرتفعة قصوى تظهر فى هذه الأطباق.

ب- العدد الكلى اللاهوائى :

يتبع نفس الإجراء السابق فى تقدير أعداد البكتريا اللاهوائية الميزوفيليه فيما عدا التحضين على ٥٥°م لمدة ٤٨ ساعة.

<u>٤–تقدير أعداد البكتريا السيكروفيليه (المحبة لدرجة الحرارة المنخفضة **Psychrophilic count**):</u>

www.o4pdf.com

تستخدم نفس الخطوات السابقة فى تقدير العدد الكلى للبكتريا المحبة لدرجة الحرارة المتوسطة (Mesophilic bacteria) فيما عدا تحضين الأطباق أو الأنابيب على درجة حرارة منخفضة تتراوح بين (٦-٧°م).

ب- تنمية وعد الخمائر والفطريات المحبة للحرارة المتوسطة او المحبة للبرودة Enumeration of yeasts and moulds:

أساس الطريقة :

هذه الطريقة تشابه طريقة تنمية وعد البكتريا المحبة للحرارة المتوسطة او المحبة للحرارة المنخفضةالهوائية مع استخدام البيئة المتخصصة لنمو الخميرة والفطر.

الأجهزة والزجاجيات:

١- أطباق بترى معقمة (زجاجية أو بلاستيك).
٢- ماصات معقمة.
٣- حمام مائى يضبط درجة الحرارة عند (٥٠°م).
٤- حضانة تضبط درجة حرارتها عند (٢٥°م).
٥- عداد مستعمرات.

البيئات ومحاليل التخفيف :

١- محلول التخفيف Buffered peptone water .
٢- بيئية جلوكوز ومستخلص الخميرة والتتراسيكلين .

طريقة العمل :

١- تحضير وتجنيس المادة الغذائية كما سبق ذكره.
٢- عمل التخفيفات المطلوبة بناء على الأعداد المتوقعة من الخمائر والفطريات الموجودة فى المادة الغذائية كما سبق ذكره.
٣- صب الأطباق يتم صب (١٥-٢٠ ملل) من بيئة النموونترك لتتصلب ، ثم يوضع ٠،١ ملل من كل تخفيف فى كل من طبقين بترى لكل تخفيف ،ويتم توزيعهم على السطح بواسطة ناشر

www.oxpdf.com

٤- التحضين وتدوين النتائج ، حيث تحضين الأطباق وهى مقلوبة فى الحضانة على درجة حرارة ٢٥°م لمدة ٥ أيام ، وإذا ظهرت نموات غريزه يتم العد بعد ٣ أيام ثم بعد ٥ أيام مرة أخرى. ويتم حساب عدد الخمائر والفطريات لكل جرام أو ملل من المادة الغذائية كما سبق ذكره.

ج-تنمية وعد الخمائر والفطريات المحبة للحرارة Heat-resistant fungi:

ازداد فى الفترة الأخيرة فساد الكثير من المنتجات الغذائية المعملة بالحرارة خاصة مرتفعة الحموضة مثل العصائر بالفطريات والتى يتحمل بعضها حتى ٩٥ °م ومن امثلة تلك الفطريات *Byssochlamys fulva, B. nivea , B. spectabilis , Eurotium herbariorum , Eupenicillium javanicum, Monascus ruber , Neosartorya fischeri , N. pseudofischeri , Talaromyces flavus , T. helicus , T. macrosporus , T. stipitatus , T. trachyspermus , Xeromyces bisporus*

لـذلك زاد الإهتمام فى السنوات الأخيرة لتقدير الفطريات المحبة للحرارة فى العصائر وهى نفس الطريقة المستخدمة فى العينات الآخرى ولكن يتم بسترة العينة اولا على ٨٠°م لمدة ١٠ دقائق ثم التخفيف والصب كما فى طريقة الأطباق المصبوبة والتحضين على ٥٥°م لمدة ٤٨ ساعة.

www.OXpdf.com

ثانياً : تقدير بكتريا القولون بواسطة العد الاحتمالى :

Enumeration of Coliform Bacteria (Determination of the most probable number).

الأساسيات :

تعتمد هذه الطريقة على إجراء العد الاحتمالى باستخدام بيئة مرق Louryl Suphate Tryptase يلى ذلك التأكد من الأنابيب الموجبة لإنتاج الغاز بتلقيحها فى بيئة مرق Brillant green Lactose bile broth ويتم التحضين فى كلا الاختبارين على درجة حرارة ٣٧°م لمدة ٢٤-٤٨ ساعة.

وعند إجراء الاختبار على Faecal Coliforms (*E.coli*) يستعمل مرق E.C (*E.coli*) ويحضن على ٤٤،٥°م لمدة ٤٨ ساعة ولاختبار وجود *E.coli* فإن الأنابيب التى يظهر بها الغاز يخطط منها على بيئة E.M.B. وتجرى اختبارات الأندول والمثيل رد و V.P. وتستعمل السترات كمصدر للكربون.

الأجهزة والزجاجيات :

١- أنابيب اختبار ١٨ × ١٨٠مم.
٢- أنابيب درهام ١٠ × ٧٥مم .
٣- ماصات ١ مل
٤- حضانات ٣٥ ، ٣٧°م.
٥- حمام مائى ٤٤،٥°م.

Culture media and reagents:

١- بيئة Brilliant-Green Lactose bile broth 2% .
٢- محلول التخفيف Buffered peptone water
٣- بيئة الأندول والكشاف (الدليل).
٤- بيئة كوسرسترات.
٥- Lauryl Sulphate tryptase broth
٦- بيئة EMB .
٧- بيئة V.P.
٨- بيئة Ec (*E.coli*) السائلة

www.Oxpdf.com

الطريقة :

أ- تجهيز العينة كما سبق ذكره.

ب- عمل التخفيفات كما سبق ذكره.

ج- التلقيح :

١- يلقح ٣ أنابيب من L.S.T المحتوية على أنابيب درهام بـــ ١ مل من محلول العينة (١٠/١).

٢- يجرى نفس الأجراء بالنسبة لتخفيفات ١٠٠/١ و ١٠٠٠/١ مستخدما ماصات معقمة فى كل مرة .

د- التحضين : تحضن أنابيب L.S.T على درجة حرارة ٣٧°م لمدة ٢٤-٤٨ ساعة.

هـــ- قراءة النتائج : تسجل نتائج العينات التى ظهر بها وجود غاز بعد ٢٤ ساعة ثم يعاد التحضين لمدة ٢٤ ساعة أخرى ثم تسجل نتائج العينات التى ظهر بها وجود الغاز.

و- الاختبارات التأكيدية :

١- يتم التلقيح بواسطة إبرة تلقيح إلى أنابيب من بيئة .B.G.L.B من الأنابيب التى أعطت غاز فى الخطوة السابقة.

٢- تحضن هذه الأنابيب على درجة حرارة ٣٧°م لمدة ٤٨ ساعة.

٣- يشير تكوين الغاز إلى وجود بكتريا الكوليفورم. يسجل عدد الأنابيب التى أعطت غاز فى الاختبار التأكيدى.

طريقة الحساب :

مثال :

إذا أظهرت القراءات ٣ × ١٠/١ ، ١ × ١٠٠/١ ، صفر × ١٠٠٠/١ يتم الكشف عنها فى جداول العدد الأكثر احتمالا .M.P.N فإن العدد الاحتمالى هو ٤٣ ميكروب/جرام.

اختبار Feacal coliform

١- عند إجراء الاختبار التأكيدى باستعمال بيئة .B.G.L.B ينقل من الأنابيب الموجبة إلى بيئة .E.C .

٢- تحضن الأنابيب على درجة حرارة ٤٥،٥°م لمدة ٢٤ ساعة وتسجل النتائج عن تكوين الغاز وتستخدم جداول .M.P.N لمعرفة العدد الاحتمالى .

www.ofpdf.com

٣- وللتمييز بين مجموعة الكوليفورم تستخدم تفاعلات IMViC(اختبار الأندول والميثيل رد ، V.P. والسترات) كما يلى :

اختبار الأندول :

تلقح بيئة الأندول من المستعمرات ثم تحضن على درجة حرارة ٣٧°م لمدة ٢٤ ساعة . يضاف ١مل من دليل الأندول ،تكون اللون الأحمر بدل على إيجابية الاختبار.

اختيار الـــ V.P. :

بواسطة أبرة تلقيح أمزج جزء من المستعمرة فى أنبوبتين يحتوى كلاهما على ٠،٢ مل من البيئة. حضن أحدهما على درجة حرارة الغرفة والأخرى على ٣٧°م لمدة ٤٨ ساعة . أضف إلى كل أنبوبة نقطتين من محلول الكرياتين ثم ٣ نقط من محلول الآلفانفثول الكحولى ونقطتين من محلول أيدروكسيد البوتاسيوم. رج بعد إضافة كل محلول ثم لاحظ النتيجة خلال ١٥ دقيقة. يدل تكوين اللون الأحمر على إيجابية الاختبار.

اختبار الـــ MR

تلقح بيئة الـــ VP السائلة الموجودة فى الأنابيب من المستعمرات ثم تحضن على درجة حرارة ٣٥°م لمدة ٤٨ ساعة. يضاف ٥ نقط من دليل أحمر الميثيل إلى الأنابيب ، تكون اللون الأحمر دليل على إيجابية الاختبار.

اختبار السترات :

تلقح بيئة السترات من المستعمرات ثم تحضن على ٣٥°م لمدة ٩٦ ساعة ، ثم تختبر نمو المستعمرات فى البيئة.

اختبار *Escherichia coli*

١- ينقل لوب بواسطة أبرة التلقيح من الأنابيب التى بها الميكروب وبيئة L.S.T التى أعطت غاز إلى أنابيب منفصلة من بيئة E.C. السائلة .

٢- تحضن الأنابيب على درجة حرارة ٤٤،٥°م لمدة ٤٨ ساعة وتسجل نتائج الأنابيب المنتجة للغاز على انها موجبة.

www.Oxpdf.com

٣- يخطط من هذه الأنابيب على بيئة أجار .E.M.B وتحضن على درجة حرارة ٣٥°م لمدة ١٨-٢٤ ساعة.

٤- ينقل من ٢-٣ مستعمرات من أطباق .E.M.B إلى بيئة الأجار المائل Slants وتحضن على درجة حرارة ٣٥°م لمدة ١٨-٢٤ ساعة وفى نفس الوقت يجرى الصبغ بصبغة جرام.

٥- يجرى اختبار الأندول والمثيل رد والـــ .V.P واختبار السترات (IMViC).

جدول ٥: تقسيم بكتريا الكوليفورم طبقاً لاختباراتIMViC

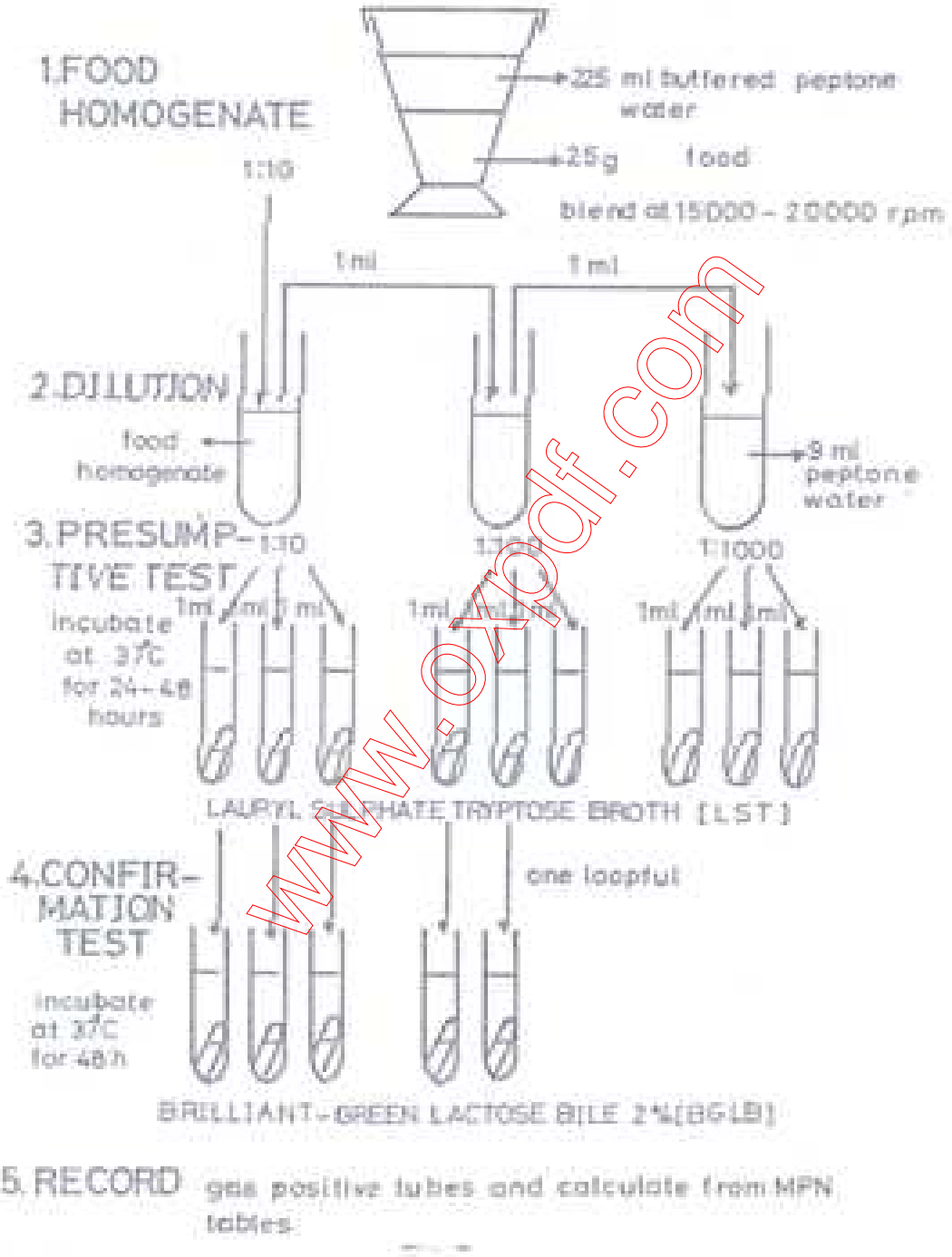
النوع	سترات كمصدر للكربون	V.P.	M.R	إنتاج الأندول
Typical *E.coli*	-	-	+	+
Atypical *E.coli*	-	-	+	-
Typical intermediate	+	-	+	+
Atypical intermediate	+	-	+	-
Typical *E. aerogenes*	+	+	-	-
Atypical *E. aerogenes*	+	+	-	+

www.Oxpdf.com

جدول ٦ : معامل العدد الأكثر احتمالا بإستخدام ٣ انابيب MPN index and 95% confidence limits when 3 tubes are used

Number of Positive tubes			ber g or ml	95% confidence limits	
		0			
0	0	0	<3		
0	0	1	3	<0.5	9
0	1	0	3	<0.5	13
1	0	0	4	<0.5	20
1	0	1	7	1	21
1	1	0	7	1	23
1	1	1	11	3	36
1	2	0	11	3	36
2	0	0	9	3	36
2	0	1	14	1	37
2	1	0	15	3	44
2	1	1	20	7	89
2	2	0	21	4	47
2	2	1	28	10	150
3	0	0	23	4	120
3	0	1	39	7	130
3	0	2	64	15	380
3	1	0	43	7	210
3	1	1	75	14	230
3	1	2	120	30	380
3	2	0	93	15	380
3	2	1	150	30	440
3	2	2	210	35	470
3	3	0	240	36	1,300
3	3	1	460	71	2,400
3	3	2	1,100	150	4,800
3	3	3	>2,400		

www.oxoid.com



www.oxbdf.com

شكل ٧ رسم تخطيطى للكشف عن مجموعة بكتريا القولون

ثالثاً: الكشف عن السالمونيلا Detection of Salmonella

الأساسيات :

إذا وجدت ميكروبات السالمونيلا فأنها توجد عادة بأعداد قليلة فى المواد الغذائية ولذلك تعتمد طرق التنمية على إعطاء الفرصة لهذه الأعداد القليلة لكن تنمو أولاً على البيئات غير المتخصصة السائلة على درجة حرارة ٣٧°م وتسمى هذه Pre-enrichment وتسمح هذه البيئة ودرجة الحرارة لهذه البكتريا وكذلك الميكروبات الأخرى أن تنمو ، لذلك يجب أن تستخدم بعد ذلك البيئات السائلة المتخصصة وتحضن على درجة حرارة من ٤٢-٤٣°م ثم بعد ذلك تلقح فى البيئات الصلبة المتخصصة وبعد التحضين على درجة حرارة ٣٧°م فإن الأطباق تفحص لوجود السالمونيلا. ثم تختبر هذه المستعمرات بالطرق الكيماوية والسيرولوجية.

الأجهزة والأدوات الزجاجية :

١- أنابيب اختبار ١٨ × ١٨٠مم ودوارق زجاجية ٥٠٠-١٠٠٠ مل .
٢- أنابيب اختبار ٨ × ١٦٠ مم
٣- ماصات
٤- أطباق بترى صغيرة وكبيرة .
٥- حضانة ٣٧ ، ٤٢-٤٣°م.
٦- كابينة تجفيف ٥٠°م.
٧- حمام مائى .

البيئات والمحاليل:

١- Bismuth sulphite agar
٢- Brillient-green phenol red agar
٣- Buffered peptone water
٤- B-galactosidase reagent
٥- Indole medium and reagent
٦- Lysine decarboxylation medium
٧- Nutrient agar
٨- Saline solution
٩- Selenite cystine broth
١٠- Semi-Solid nutrient agar
١١- Tetrathionate medium

www.oxpdf.com

١٢- Triple sugar/iron agar
١٣- Urea agar
١٤- V.P.

الطريقـــة :

١- تحضير العينة كما سبق

٢- التنشيط الإبتدائى :

أ- تنقل العينة المجهزة (٢٥ جرام عينة مخلوطة مع ٢٢٥مل ماء بيتون) بطريقة معقمة فى دورق سعة ٥٠٠مل.

ب- التحضين على درجة حرارة ٣٧°م لمدة ١٦-٢٠ ساعة.

٣- التنشيط :

أ- ينقل ١٠مل من (٢) إلى ١٠٠مل من بيئة Tetrathionate broth و ١٠مل أخرى إلى بيئة Selenit broth التى تكون على درجة حرارة ٤٢-٤٣°م.

ب- التحضين على درجة حرارة ٤٢-٤٣°م لمدة ٤٨ ساعة.

٤- التخطيط :

أ- يتم التخطيط بعد ١٨-٢٤ ساعة من كلا البيئتين على بيئات bismuth sulphite agar, Brilliant green/phenol red agar.

ب- تحضن الأطباق على درجة حرارة ٣٧°م لمدة ٢٠-٢٤ ساعة.

ج- تفحص الأطباق لوجود المستعمرات النموذجية من السالمنيلا بعد ٢٤-٤٨ ساعة.

٥- الاختبارات التأكيدية :

أ- الاختبارات الكيماوية:

١- يتم اختيار ٥ مستعمرات وتخطط على أطباق من بيئة الآجار المغذى وتحضن على ٣٧°م لمدة ٢٤ ساعة.

٢- يتم تلقيح البيئات التالية من المستعمرات التى على أطباق الأجار المغذى:-

بيئة آجار T.S.I : يخطط الآجار المائل وكذلك يتم الوخز وتحضن على ٣٧°م لمدة ٢٤-٤٨ ساعة وتسجل النتائج كما يلى :

أسفل الأنبوبة :

أصفر	تخمر الجلوكوز
أحمر أو لم يتغير اللون	لم يحدث تخمر للجلوكوز
أسود	تكون الهيدروجين سلفيد

www.oxpdf.com

تكون فقاقيع أو حدوث تشقق　　تكون غاز من الجلوكوز

سطح الآجار المائل :

أصفر　　مخمرة للاكتوز أو السكروز

أحمر أو لم يتغير اللون　　لم يحدث تخمر للجلوكوز

آجار اليوريا :

يتم التخطيط على الآجار المائل ويتم التحضين على درجة حرارة ٣٧°م لمدة ٢٤–٤٨ ساعة ويدل تكون اللون الوردى على أن الاختبار موجب.

بيئـــة Lysine decarboxylation

لقح البيئة السائلة بحذر تحت السطح مباشرة. ويتم التحضين على درجة حرارة ٣٧°م لمدة ٢٤ ساعة –يدل اللون القرمزى على النتيجة الموجبة.

دليل β-galactosidase

انقل بواسطة أبرة تلقيح من النمو إلى ٠،٢٥ مل من المحلول الملحى فى انبوبة اختبار . أضف نقطة من التولوين. ضع الأنبوبة فى حمام مائى ٣٧°م لعدة دقائق. أضف ٠،٢٥ مل من دليل β-galactosidase ثم أمزج. ضع الأنبوبة ثانية فى الحمام المائى على ٣٧°م لمدة ٢٤ ساعة يدل اللون الأصفر على أن النتيجة موجبة.

بيئة V.P.

بواسطة أبرة تلقيح أمزج جزء من المستعمرة فى أنبوبتين يحتوى كلاهما على ٠،٢ مل من هذه البيئة. حضن أحدهما على درجة حرارة الغرفة والأخرى على ٣٧°م لمدة ٤٨ ساعة. أضف إلى كل أنبوبة نقطتين من محلول الكرياتين ثم ٣ نقط من محلول الالفانفثول الكحولى ونقطتين من محلول ايدروكسيد البوتاسيوم. رج بعد إضافة كل محلول ثم لاحظ النتيجة خلال ١٥ دقيقة. تكوين اللون الأحمر يدل على إيجابية الاختبار.

بيئة الأندول :

www.qxpdf.com

تلقح بيئة الأندول من المستعمرات ثم تحضن على درجة حرارة ٣٧°م لمدة ٢٤ ساعة يضاف ١مل من دليل الأندول. تكون اللون الأحمر يدل على إيجابية الاختبار.

التفاعلات البيوكيماوية للسالمونيلا:

TSI agar	−	
	But : yellow	+
	Black	+
	Bubbles or cracks	+
Slant :	red or unchanged	-
Urea agar	No change of color −	
		-
Lysine decarboxylase purple color		+
β -galactosidase	reaction no change of −	-
color		
VP reaction	no change of color −	-
Indole test;	yellow brown test	-

المستعمرات المثالية للسالمونيلا :

١- بيئة Brilliant green agar تتكون مستعمرات عديمة اللون أو وردية .

٢- بيئة Bismuth sulphite agar تتكون مستعمرات بنية أو سوداء ذات بريق معدنى أحياناً.

الاختبارات السيرولوجية:

تختبر المستعمرات لوجود الانتجن O,H بواسطة Slide agglutination بواسطة poly and monovalent sera .

www.oxpdf.com

re-enrichment	
noculate pre-enrichment medium e.g.	Day 0
uffered peptone water	
1 part test portion + 9 parts medium)	
⇓	Incubate 35 °C or 37 °C/16–20 h
⇓	
elective enrichment	
ubculture to 2 selective	Day 1
nrichment broths,	
.g. Selenite-Cystine (SC) Medium (1 + 9),	
appaport Vassiliadis (RV) broth (1+ 100)	
⇓	Incubate SC 37 °C/24 h + 24 h
⇓	RV 42 °C/24 h + (if necessary) 24 h
elective plating	
treak onto 2 selective agars, e.g.	Days 2 and 3
rilliant Green Agar (modified)	
lektoen Enteric Agar	
LD Agar	
⇓	Incubate 35 °C or 37 °C/20–24 h and
⇓	a further 18–24 h if necessary
nspect plates for the presence of	
haracteristic colonies and any primary	Days 3/4 or 4/5
iochemical reactions	
onfirmation of suspect colonies	
urify suspect colonies on Nutrient Agar	Incubate 35 °C or 37 °C/18–24 h
⇓	Days 4–6
erology 'O' & 'H'	
noculate media or test strips to obtain	
iochemical profile	
⇓	Incubate according to the
⇓	manufacturer's instructions,
	usually 35 °C or 37 °C/18–24 h
ead reactions	Days 5–7

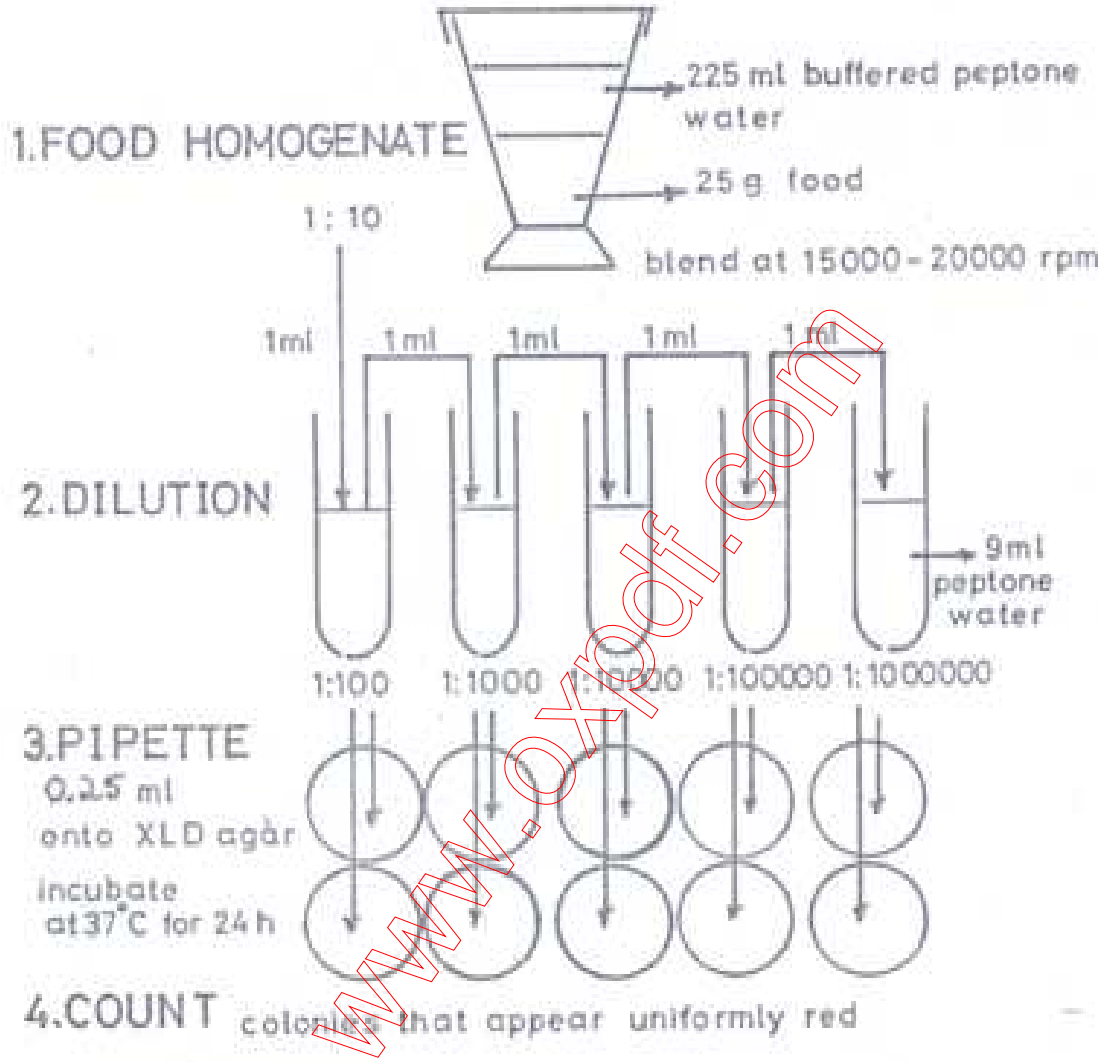
www.Oxpdf.com

شكل ٨ يبين ملخص لطريقة عزل وتعريف السالمونيلا من عينة غذاء

الى جانب الكشف عن السالمونيلا فيتم الكشف عن الشيجلا لإنتاجها توكسينات سامة

ويوضح شكل ٩ التالى رسم تخطيطى للكشف عن الشيجلا

ا



www.oxpdf.com

5.CONFIRMATION:

a. TSI : red slant, yellow butt, no gas, no H_2S
b. UREASE : negative
c. KCN : no growth
d. CITRATE : no growth
e. CARBOHYDRATE: no gas
f. INDOL: positive or negative
g. VP : negative
h. MOTILITY : non-motile
i. SEROLOGICAL IDENTIFICATION

رابعاً : الكشف عن Enteropathogenic *E.coli*

Detection of Enteropathogenic *E. coli*

الأساسيات :

تعتمد هذه الطريقة على التنشيط الابتدائى فى محاليل مغذية وكذلك فى بيئة ماكونكى السائلة ثم التنشيط على بيئة LST ومرق E.C ثم التخطيط على بيئة E.M.B. آجار ثم تجرى الاختبارات الكيماوية والسيرولوجية.

الأجهزة والزجاجات :

١- حمام مائى ٤١،٥°م ، ٤٤°م.

٢- حضانة على ٣٥°م.

٣- خلاط كهربائى

٤- أنابيب اختبار ، ماصات ، أطباق بترى.

Culture media and reagents

١- بيئة تخمير الكربوهيدرات.

٢- بيئة Levinces eosin methylene blue agar.

٣- بيئة Enteric enrichment (E.E.) broth

٤- بيئة Indole media and reagent

٥- بيئة Lauryl sulphate tryptose broth

٦- بيئة ماكونكى آجار.

٧- بيئة ماكونكى السائلة.

٨- بيئة النترات السائلة.

٩- بيئة السيانيد .

١٠- بيئة T.S.I. agar .

١١- بيئة اليوريا السائلة .

١٢- بيئة V.P. .

١٣- بيئة *E.coli* antisera.

١٤- بيئة Nutrient السائلة.

www.Oxpdf.com

الطريقة :

١- يوزن ٢٥ جرام بطريقة معقمة وتوضع فى ٢٢٥مل من بيئة ماكونكى السائلة و ٢٢٥مل من المرق المغذى وبمزج بواسطة الخلاط لمدة ٣٠ ثانية.

٢- التخطيط المباشر :

يتم التخطيط من محلول المرق المغذى على بيئة ماكونكى الصلبة وكذلك بيئة E.M.B. وتحضن على ٣٥°م لمدة ٢٤ ساعة.

٣- التنشيط :

تحضن بيئة ماكونكى السائلة على ٣٥°م لمدة ٢٠ ساعة ثم ينقل بواسطة أبرة التلقيح إلى ٣٠مل من بيئة LST السائلة تحضن على ٤٤°م لمدة ٢٠ ساعة وتحضن بيئة المرق الملقحة على ٣٥°م لمدة ٦ ساعات ثم ينقل منها بواسطة أبرة التلقيح إلى ٣٠ مل من بيئة E.E. السائلة وتحضن على درجة حرارة ٤١،٥°م لمدة ١٨ ساعة.

٤- الاختبار السيرولوجى المبدئى:

يتم معادلة بيئة LST وكذلك E.E. بواسطة ١٠% كربونات صوديوم وتوضع قطرة واحدة من كل بيئة على شريحة نظيفة ويضاف إلى كلاهما قطره من السيرا وقطرة من محلول ملحى ٠،٥% وتمزج وتختبر لحدوث agglutination.

٥- الاختبارات الكيماوية :

يتم التخطيط من بيئة LST على بيئة E.M.B. ومن بيئة E.C. على بيئة الماكونكى اجار وكذلك بيئة E.M.B. وتحضن على ٣٥°م لمدة ٢٤ ساعة.

٦- تختار المستعمرات النموذجية ثم تلقح فى البيئات التالية VPTSI- الأندول اليوريز-السيانيد-السترات. هذا بالإضافة إلى التلقيح على سطح الآجار المائل وذلك من نفس المستعمرة وذلك لأجراء الاختبارات السيرولوجية.

www.oxpdf.com

جدول ٩: بعض الصفات البيوكيميائية لميكروب *E.coli*

Character	Reaction
Gram	negative
Cell morphology	non-sporing straight rod, 1.1–1.5 × 2.0–6.0μm
Motility	+ by peritrichous flagellae or non motile
Aerobic growth	+
Anaerobic growth	+
Optimum growth temperature	37 °C
Catalase	+
Oxidase	–
D-Mannitol fermentation	≥90% +
Lactose 37 °C and 44 °C	≥90% +
D-Adonitol	≥90% –
D-glucose	acid produced
Indole 37 °C	≥90% +
Indole 44 °C	≥90% +
Methyl Red reaction	≥90% +
Voges–Proskauer reaction	≥90% –
Growth in Simmons' citrate	≥90% –
Urease, Christensen's	≥90% –
Phenylalanine deamination	≥90% –
Lysine decarboxylase	76–89% strains +
H_2S on TSI (triple sugar iron) medium	≥90% –
Growth in KCN (potassium cyanide) medium	≥90% –
Gelatin liquefaction (at 22 °C)	≥90% –

www.oxbdf.com

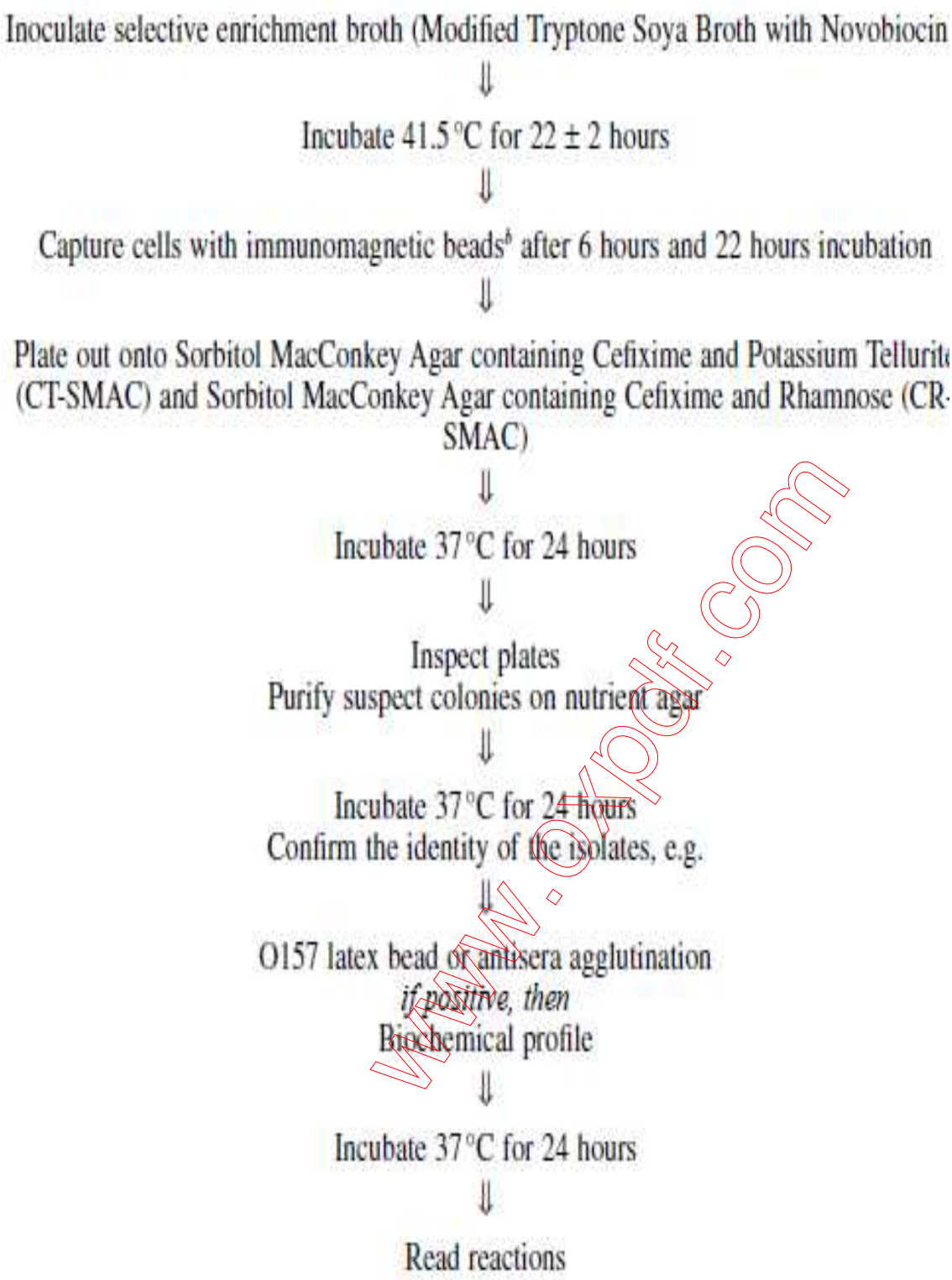
– التفريق السيرولوجى للميكروب *E. coli* Enteropathogenic

أ- تمزج المستعمرات على بيئة الآجار المائل بالمحلول الملحى ثم تفحص وتختار المستعمرات التى أعطت مزيج متجانس.

ب- يختبر المزيج بواسطة السيرم (polyvalent sera) مستخدماً نقطة من المزيج والسيرم.

ج- إذا ظهرت النتيجة سالبة يسخن إلى ١٠٠°م لمدة ١٥ق ثم يعاد الاختبار باستخدام polyvalent sera.

د- إذا ظهرت النتيجة موجبة يفحص باستخدام monovalent sera



شكل ١٠ مخطط لبيان طريقة الكشف عن *E. coli* O157

www.okpdf.com

خامساً : تنمية وعد بكتريا *Staphylococcus aureus*

أساس الطريقة :

هذه الطريقة تعتمد على فرد ٠،٢٥ مل من المادة الغذائية بعد التجنيس والتخفيف المتدرج لأرقام عشرية على سطح بيئة Baird-parker agar وتحتوى هذه البيئة على العديد من المكونات المثبطة والتى لا تتعارض مع نمو *Staph.aureus* على هذه البيئة ويعزى تكوين المستعمرات السوداء المحاطة بهالة رائقة إلى قدرة هذا الميكروب على اختزال أملاح التلوريت وتحليل صفار البيض الموجودين فى هذه البيئة. ويستخدم اختبار تجلط البلازما كأختبار تأكيدى *Staph.aureus* حيث يفرز هذا الميكروب أنزيم Coagulase والذى يجلط بلازما دم الإنسان والحيوان.

وتوجد عوامل عديدة تؤثر على فاعلية هذه الطريقة فى التنمية والكشف عن هذا الميكروب وأهم هذه العوامل الحالة الفسيولوجية للميكروب ، وضع الميكروب والتنافس مع بقية الميكروبات فىالمادة الغذائية وكذلك العوامل المحددة للبيئة المستخدمة فى العزل . ويجب أن يؤخذ فى الاعتبار تغير أو انعكاس الحالة الفسيلوجية لميكروب *Staph. aureus* فعلى سبيل المثال ليس كل سلالات الميكروب محللة لصفار البيض أو منتجة لأنزيم Coagulase وقد ثبت أيضاً أن هناك أختلاف بين السلالات فى مدى تحملها للكيماويات السامة المستخدمة فى بيئات العزل.

الأجهزة والزجاجيات:

أطباق بترى ١٠٠مم – ماصات ١مل –حمام مائى ٤٥°م –عداد مستعمرات – مكان جاف – حضانة كهربائية على ٣٧°م.

Culture media and reagents:

١- Baird Parker agar
٢- Brain heart infusion broth
٣- Buffered peptone water
٤- Rabbit plasma (dehydrated, contaning 0.1% EDTA)

طريقة العمل :

تجنيس المادة الغذائية كما سبق

التخفيف كما سبق

www.oxpdf.com

التلقيح : يوضع ٠،٢٥ مل من المادة الغذائية بعد التجنيس والتخفيف بواسطة ماصة على سطح أطباق بيئة **Barid Parker agar** الجافة ثم يتم فرد ونشر الكمية المضافة بواسطة ساق زجاجى معقم. يجب استخدام طبقين من البيئة لكل تخفيف.

التحضين :

يتم تحضين الأطباق مقلوبة على درجة ٣٧°م لمدة ٢٤ ، ٤٨ ساعة.

عد مستعمرات ***Staph.aureus***

أ- تختار الأطباق (بعد التحضين ٢٤ ساعة) التى تظهر عليها من ٣٠-٣٠٠ مستعمرة سوداء لامعة محاطة بها هالة رائقة على البيئة المعتمة وهذه تكون المستعمرات المحتملة لبكتريا ***Stacph. anreus***.

ب- توضع علامة مكان هذه المستعمرات ثم يعاد التحضين ٢٤ ساعة أخرى.

ج- يختبر العد للمستعمرات بنفس الطريقة السابقة ثم يحدد العدد الاحتمالى طبقاً لاختبار تجلط البلازما .

د- قد تظهر مستعمرات القليل من السلالات عتامة حولها بعد ٢٤ ساعة ولكن أغلب السلالات تظهر مستعمراتها هذه الخاصية بعد ٤٨ ساعة. وعلى الجانب الآخر قد تظهر مستعمرات ***Staph. areus*** السالبة لأنزيم **Coagulase** هالة رائقة بعد ٤٨ ساعة. ولهذا فإن اختبار تجلط البلازما ضرورى للمستعمرات المشتبه بها.

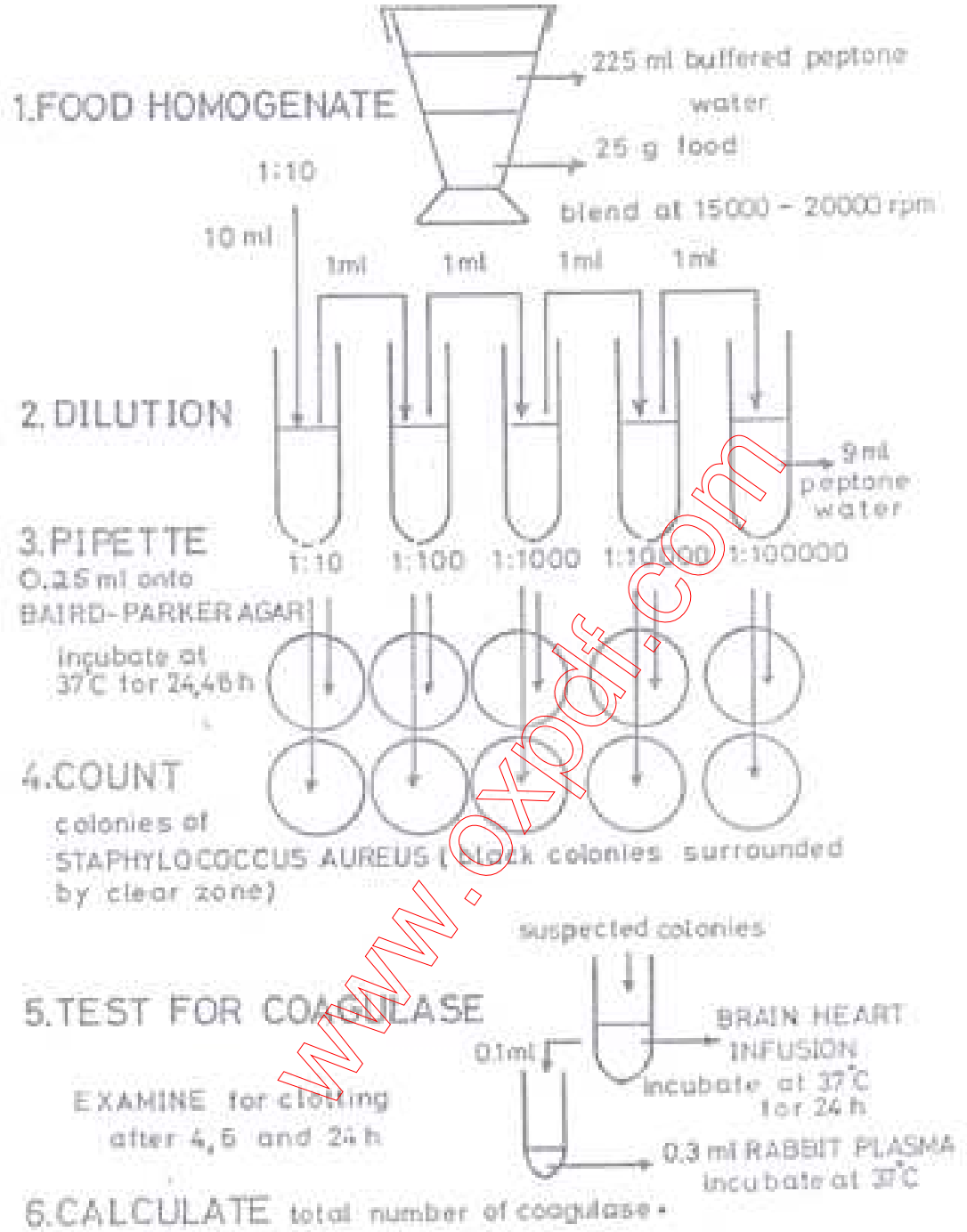
هـ- يتم عد المستعمرات التى تظهر هالة رائقة بعد ٢٤ ساعة وإيجابية لاختبار تجلط البلازما بعد ٤٨ ساعة.

الاختبارات التأكيدية :

اختبار تجلط البلازما :

أ- يتم تلقيح بيئة **Brain heart infusion** السائلة فى أنابيب بالمستعمرات المشتبه فيها وتحضن الأنابيب على درجة ٣٧°م لمدة ٢٠-٢٤ ساعة.

www.oxpdf.com



www.oxpdf.com

شكل ١١ رسم تخطيطى للكشف عن *Staph.aureus*

ب- يضاف ٠،٣ مل من البلازما لكل ٠،١ مل من البيئة الملقحة السابقة فى أنابيب صغيرة وتحضن على ٣٥-٣٧°م.

ج- تختبر الأنابيب للتجلط بعد ٦ ساعات. وتكون جلطة قوية دليل على نشاط أنزيم Coagulase (٣+). أما (٤+) فتكون عند تماسك الجلطة وعدم سقوطها عند قلب الأنبوبة وكلا النتيجتين إيجابية كأختبار تأكيدى لبكتريا ***Staph.aureus***

حساب عدد المستعمرات:

يتم حساب عدد بكتريا ***Staph.aureus*** من النسبة المئوية للمستعمرات المتعرف عليها إلى المجموع الكلى للمستعمرات المشتبه فيها. ثم يضرب الناتج فى ٤ (٠,٢٥ مل تم نشره) ثم يضرب مرة أخرى فى معامل التخفيف.

www.Oxpdf.com

سادسا:عزل وتعريف مجموعة Enterococcii

الأساسيات :

تعتمد هذه الطريقة على تنمية هذا الميكروب (Feacal enterococci) باستخدام Packer's Crystal violet azide blood agar بطريقة الأطباق المصبوبة ويتبع ذلك الاختبارات التأكيدية والتفريق بين المستعمرات المعزولة.

الأجهزة والزجاجيات :

١- أطباق بترى ٢- ماصات

٣- حمام مائى ٤٥°م ، ٦٠°م. ٤- حضانة ٣٥-٣٧°م

٥- عداد لعد البكتريا

البيئات والمحاليل:

١- محلول منظم الببتون

٢- Packer's crystal violet azide blood agar.

٣- Phenol red sorbitol broth .

٤- Thalicus acotate tetrazolum glucose agar

٥- Tryptose broth, pH 9.6 and pH 7.2

٦- Tryptose agar

٧- Tryptose bile broth 1.0%

٨- Tryptose salt broth

٩- Tryptose tellurite agar

١٠- Tryptose T.T.C. agar

١١- Gram stain

الطريقـــة :

١- تحضير العينة الغذائية كما سبق .

٢- عمل التخفيفات كما سبق

٣- التلقيح : يوضع ١ مل من التخفيف فى أطباق بترى معقمة ثم يضاف ١٥ مل من البيئة المستخدمة (Paker's crystal violet azide blood agar) . والتى تكون على درجة حرارة ٤٥°م وتمزج جيداً ثم تترك لتتصلب.

٤- التحضين : تحضن الأطباق مقلوبة على درجة حرارة ٣٥-٣٧°م لمدة ٧٢ ساعة.

www.oxoid.com

٥- عد المستعمرات : يتم عد جميع المستعمرات الصغيرة ذات اللون البنفسجى فى الأطباق المحتوية على الأعداد ما بين ٣٠-٣٠٠ مستعمرة ويعبر هذا العدد عن ميكروبات Feacal enterococciلكل جرام من العينة.

الاختبارات التأكيدية :

أ- يتم إعادة تنمية من ٣-٥ مستعمرات على بيئة
Thalicus acetate tetrazolium glucose agar

ب- يتم التحضين على درجة حرارة ٣٥-٣٧°م لمدة ٤٨ ساعة وتكون المستعمرات ذات الوسط الأحمر ممثلة لميكروب*Entero. feacalis* بينما تمثل المستعمرات البيضاء *Entero. faecium* ويحتمل أن تكون المستعمرات الحمراء*Lactococcus lactis*.

ج- ينقل عدد ٢ من المستعمرات ذات الوسط الأحمر والمستعمرات البيضاء إلى بيئة آجار التربتوز المائلة وتحضن على درجة حرارة ٣٥-٣٧°م لمدة ٢٤ ساعة.

د- تحضر شريحة وتصبغ بصبغة جرام.

و- ومن الآجار المائل (عمر ٢٤ ساعة) تلقح البيئات التالية:

١- آجار التربتوز المائل والتحضين على ٤٥°م لمدة ٤٨ ساعة (النمو يشير إلى أن الاختبار موجب).

٢- أنابيب من تربتوز الصفراء السائل (٤٠% bile) والتحضين على ٣٥-٣٧°م لمدة ٤٨ ساعة. (إذا حدثت عكارة يكون الاختبار موجب).

٣- بيئة أجار التربتوز المائل ثم التحضين ٣٥-٣٧°م لمدة ٤٨ ساعة ثم يتم التنقيط عليه بواسطة فوق أكسيد الأيدروجين. ويشير تكون فقاقيع غاز إلى أن اختيار الكتاليز موجب.

عزل الميكروب وتنقيته:

أ- تلقيح أنبوبتين من البيئات التالية بواسطة مزرعة عمرها ٢٤ ساعة من مزارع Enterococci وتحضن على درجة حرارة ٣٥-٣٧°م لمدة ٤٨ ساعة.

١- بيئة Tryptose broth pH 9.6
٢- بيئة Tryptose salt broth
٣- بيئة Tryptose tellurite agar slants
٤- بيئة Tryptose T.T.C agar slants
٥- بيئة Phenol red sorbitol broth

www.oxpdf.com

ويدل النمو على البيئات الأربعة الأولى السابقة على أن الاختيار موجب وأما فى البيئة الخامسة فإن اللون الأصفر يدل على حدوث التخمر وأن الاختيار موجب .

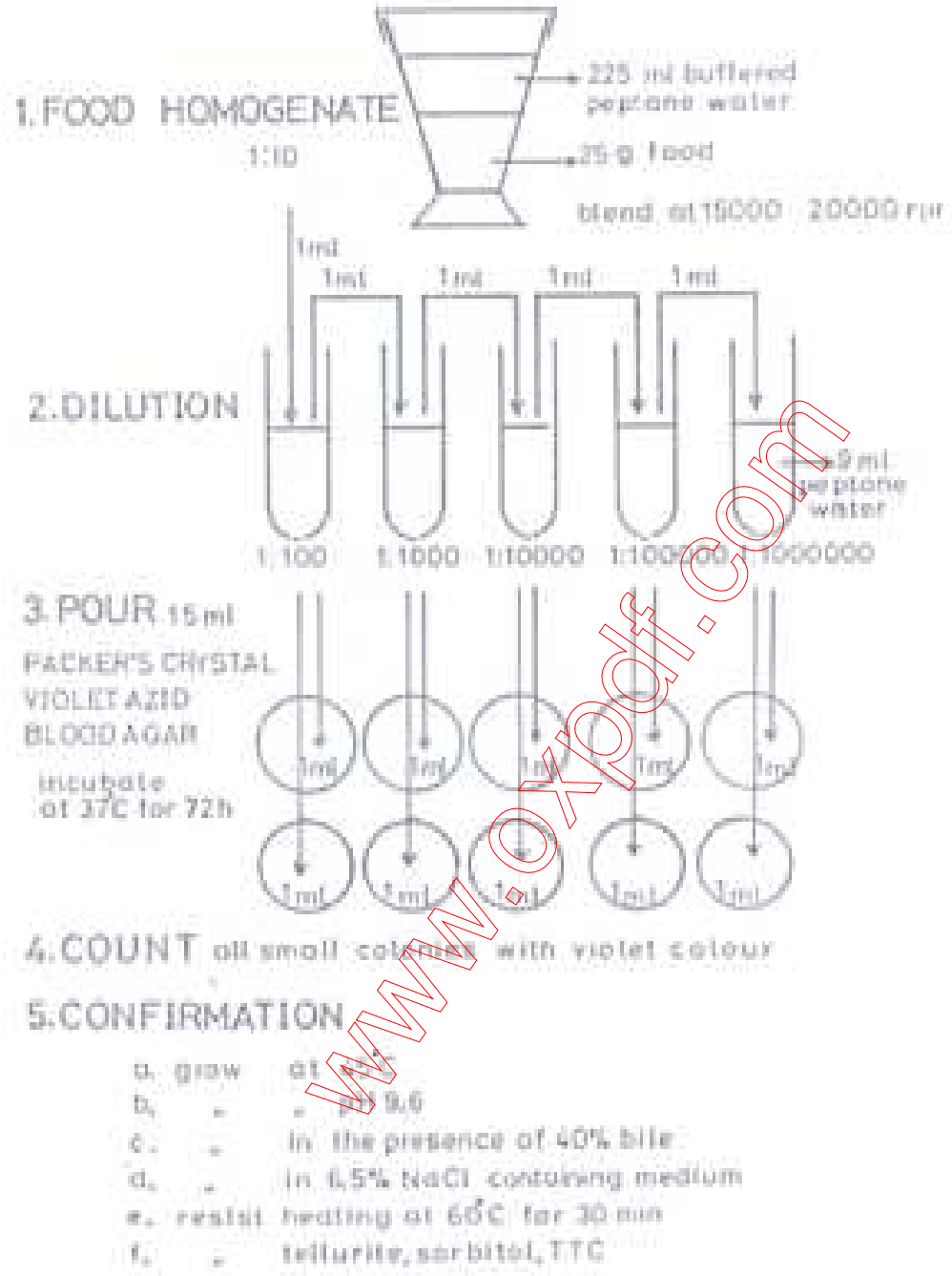
ب- تلقح أنبوبتين من بيئة التربتوز السائلة ذات pH 7.2 ثم تسخن لدرجة حرارة ٦٠°م لمدة ٣٠ دقيقة فى حمام مائى . تبرد ثم تحضن على درجة حرارة ٣٥-٣٧°م لمدة ٤٨ ساعة ويدل حدوث نمو على أن الاختبار موجب.

ج- تتبع الخطوات التالية فى التقسيم.

جدول ١٠: تصنيف مجموعة Enterococci

الإختبار	*Enterococcus faecalis*	*Enterococus faecium*	*Enterococus durans*	*Enterococus bovis*	*Enterococus equinus*
45℃	+	+	+	+	+
40% bile	+	+	+	+	+
Catalase	-	-	-	-	-
pH 9.6	+	+	+	-	-
6.5% Nacl	+	+	+	-	-
60℃ for 30min	+	+	+	-	-
0.05% tellurite	+	-	-	-	-
Sorbitol	+	±	-	-	-
T.T.C. agar	+	-	±	±	-

www.Oxpdf.com



www.oxpdf.com

شكل ١٢ رسم تخطيطى للكشف عن مجموعة Feacal enterococci

سابعا:الكشف عن *Listeria monocytogenes*

تعتمد هذه الطريقة على مواصفة الايزو١١٢٩٠ والخاصة بالكشف عن هذا الميكروب الذى يعد احد المسببات الخطيرة للتسممات الغذائيةوهو يسبب تحلل دم من النوع بيتا حيث يتم التنشيط المبدئى فى احد البيئات المتخصصة مثل UVM1لإحتوائها على الاكريفلافين الذى يثبط معظم البكتريا السالبه لجرام ومنها يتم التخطيط على بيئة اكسفورد المعدلة او PALCAM ثم النقل على التربتيك صويا اجار المحتوية على الدم لإختباؤ تحلل الدم او الخالية من الدم لعمل الاختبارات الفيسيولوجية التأكيدية وبوضح الشكل التالى مخطط عام لعزل هذ الميكروب

www.Oxpdf.com

شكل ١٣ رسم تخطيطى للكشف عن *Listeria monocytogenes* فى عينة غذاء

ثامناً : تنمية بكتريا *Vibrio Parahaemolyticus*

Enumeration of *Vibrio parahaemolyticus*

أساس الطريقة :

تعتمد هذه الطريقة على إضافة ٣% كلوريد الصوديوم لكل البيئات المستخدمة فى عزل وتصنيف *V.parahaemolyticus* .

الأجهزة والزجاجيات :

أنابيب اختبار – مخابير معيارية – ماصات – أطباق بترى – حضانة وحمام مائى.

Culture media and reagents:

١- Alkaline peptone water
٢- Carbohdrate media
٣- Arginine hydralase broth
٤- Lysine decarboxylase broth
٥- Glucose salt Teepol broth (G STB)
٦- Indole medium and regent
٧- Motility test medium
٨- Nutrient gelatine
٩- Salt Trypticase broth
١٠- Sodium chloride 3%
١١- Thiosulfate-citrate-bile slat-sucrose agar (TOBS)
١٢- TSI agar
١٣- Trypticase soy agar with 3%Nacl
١٤- Trypticase soybroth with 3% Nacl
١٥- VPmedium
١٦- Paraffin oil
١٧- Gram stain
١٨- Hugh-liefsen glucose broth (HLGB)

طريقة العمل :

تجنيس المادة الغذائية كما سبق

التخفيف كما سبق

www.Oxpor.com

التلقيح : تنقل ثلاث مجموعات كل منها ١ مل من تخفيف ١/١٠ إلى كل ١٠مل من بيئة GSTB مضاعفة للقوة ثم ينقل ١مل إلى ثلاثة أنابيب وذلك إلى تخفيفات ١/١٠ ، ١/١٠٠ ، ١/ ١٠٠٠من بيئة GSTB أحادية القوة .

التحضين : تحضن الأنابيب على درجة حرارة ٣٥°م إلى اليوم التالى .

الاختبار التأكيدى :

أ- بعد التحضين يتم تخطيط المزارع من أعلى ثلاث تخفيفات لبيئة GSTB يظهر نمو بها على أطباق من بيئة TCBS.

ب- يتم تحضين الأطباق لمدة ١٨ ساعة على درجة ٣٥°م.

ج- تظهر مستعمرات *V. parahaemolyticus* على أطباق TCBS دائرية بقطر ٢-٣مم ذات مراكز خضراء إلى زرقاء.

الاختبارات البيوكيماوية :

أ- بيئة آجار TSI المائل فى أنابيب : يخطط الآجار المائل (الجزء العلوى) ويتم الوخذ فى الجزء القاعدى ثم تحضن الأنابيب لمدة ٢٤ ساعة على ٣٥° تظهر مستعمرات *V.parahaemolyticus* على سطح الآجار المائل قاعدى وقاعدة حمضية مع عدم إنتاج غازات.

ب- بيئة اختبار الحركة : تلقح ٤ أنابيب بالوخز فى القاعدة أنتشار النمو على السطح يظهر بعد ٢٤ ساعة على درجة ٣٥°م.

ج- يجرى عمل شريحة من النموات على TSI وتصبغ بصبغة جرام.

د- خاصية تفضيل نسب الملح العالية: تلقح ٤ أنابيب من بيئة STB تحتوى على تركيزات ملح كلوريد الصوديوم صفر ، ٦ ، ٨ ، ١٠% ثم تحضن الأنابيب حيث ينمو ميكروب *V.parahaemolyticus* على تركيزات ٦ ، ٨% ولا ينمو على تركيزات صفر ، ١٠%.

هـ- اختبار احمر المثيل VP, MR : كما سبق .

و- اختبار الآندول : كما سبق .

ى- تخمر الكربوهيدرات : تلقح أنبوبة من كل من الجلوكوز ، لاكتوز ، السكروز ، المالتوز ، المانيتول .. الخ من نموات على TSI . بعد التحضين اختبر لإنتاج الحامض .

ذ- تخمر الجلوكوز تلقح عدد ٢ أنبوبة من بيئة HLGB ثم تغطى أحداها على السطح بزيت البرافين المعقم ثم تحضن الأنبوبتين لمدة ٤٨ ساعة على درجة ٣٥°م. اصفرار كل من الأنبوبتين دليل على التخمر. أما إذا ظهرت الغير مغطأه بالبرافين فقط صفراء فهو دليل على الأكسدة حيث يقوم هذا الميكروب بتخمير الجلوكوز بدون إنتاج غاز.

www.0zpdf.com

ر- اختبار السيتوكروم اوكسيديز:

يوضع عدد ٢-٣ نقطة من محلول الالفانفثول تنساب على نموات الميكروب على TSI أو على الأطباق ثم أعد مرور كمية مساوية من محلول فينيلين داى أمين على المستعمرات. وبظهور المستعمرات بلون أزرق غامق خلال دقيقتين تعتبر النتيجة إيجابية.

ز- النمو على درجة ٤٢°م تحضن انابيب TSB الملقحة فى حمام مائى علىدرجة ٤٢°م لمدة ٢٤ ساعة.

خواص ميكروب *V.parahaemolyticus* المظهرية:

١- عصويات منحنية سالبة لجرام.

٢- موجبة لاختبار السيتوكروم أوكسيديز.

٣- موجبة لتخمر واكسدة الجلوكوز بدون إنتاج غاز.

٤- تظهر مستعمرات زرقاء إلى خضراء على بيئة TCBS.

٥- التفاعل على TSI يظهر الآجار المائل قلوى ، وقاعدته حامضية دون تكون غاز أوكبريتور الأيدروجين.

٦- تنمو على درجة ٤٢°م.

٧- تنمو على تركيز ملحى ٨% ولا تنمو على تركيز ١٠%.

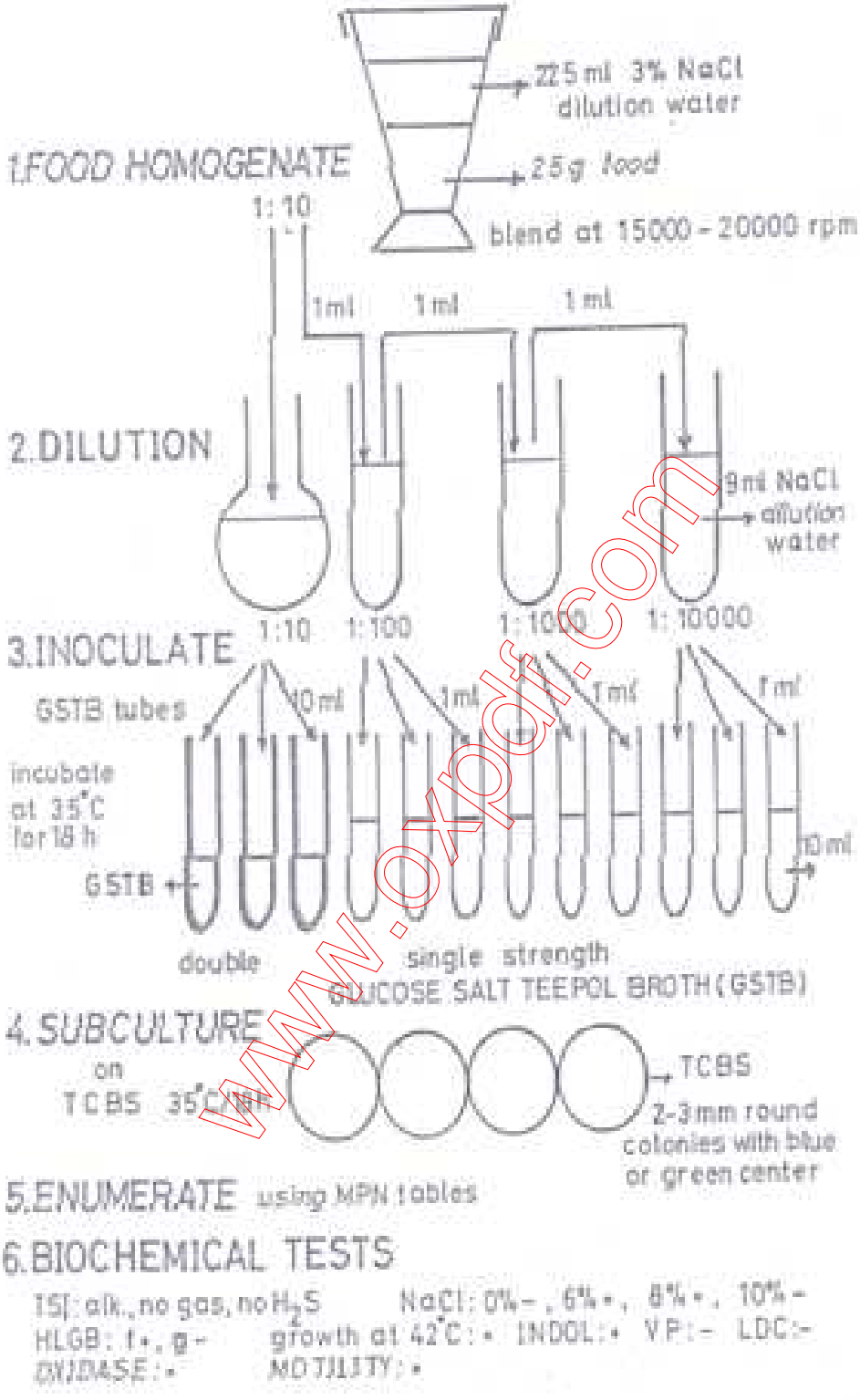
٨- سالبة لاختبار V.P.

٩- سالبة لتخمير السكروز.

حساب عدد المستعمرات :

بعد تمييز المستعمرات الزرقاء المخضرة على بيئة TCBS بيوكيماوياً لبكتريا *V.parahaemolyticus* نعود إلى التخفيف الذى عزل هذه المستعمرات منه (فى بيئة GSTB). وتستخدم الثلاث أنابيب لكل تخفيف فى إيجاد أفضل رقم احتمالى MPN من الجدول لتحديد العدد النهائى للميكروب.

www.Oxpdf.com



شكل ١٤ مخطط لطريقة الكشف عن *Vibrio parahaemolyticus*

www.Oxpdf.com

تاسعاً : تنمية وعد بكتريا *Bacillus cereus*

أساس الطريقة :

تعتمد هذه الطريقة على العد السطحى بالأطباق باستخدام بيئة تحتوى على صفار البيض حيث تظهر مستعمرات *B.cereus* محاطة بها له معكرة.

الأجهزة والزجاجيات :

أطباق بترى – ماصات ١مل ، حضانات على درجة ٢٠ ، ٣٠ ، ٣٥°م.

Culture media and reagents:

١- **Buffered peptone water.**
٢- **KG agar.**
٣- **Nitrate broth.**
٤- **Nutrient broth.**
٥- **Nutrient agar.**
٦- **V.P. mem.**
٧- **Gram stain.**

طريقة العمل :

تحضير وتجنيس المادة الغذائية : كما سبق

التخفيف : كما سبق

التلقيح : ضع بماصة ٠،٢٥ مل من المادة الغذائية بعد التجنيس والتخفيف المناسب على سطح أطباق من بيئة KG بعد التجفيف ثم يفرد هذه الكمية باستخدام ساق زجاجية معقمة.

التحضين :

حضن الأطباق على درجة ٣٠°م لمدة ٢٠-٢٤ ساعة .

عد المستعمرات الاحتمالية لبكتريا *B.cereus* :

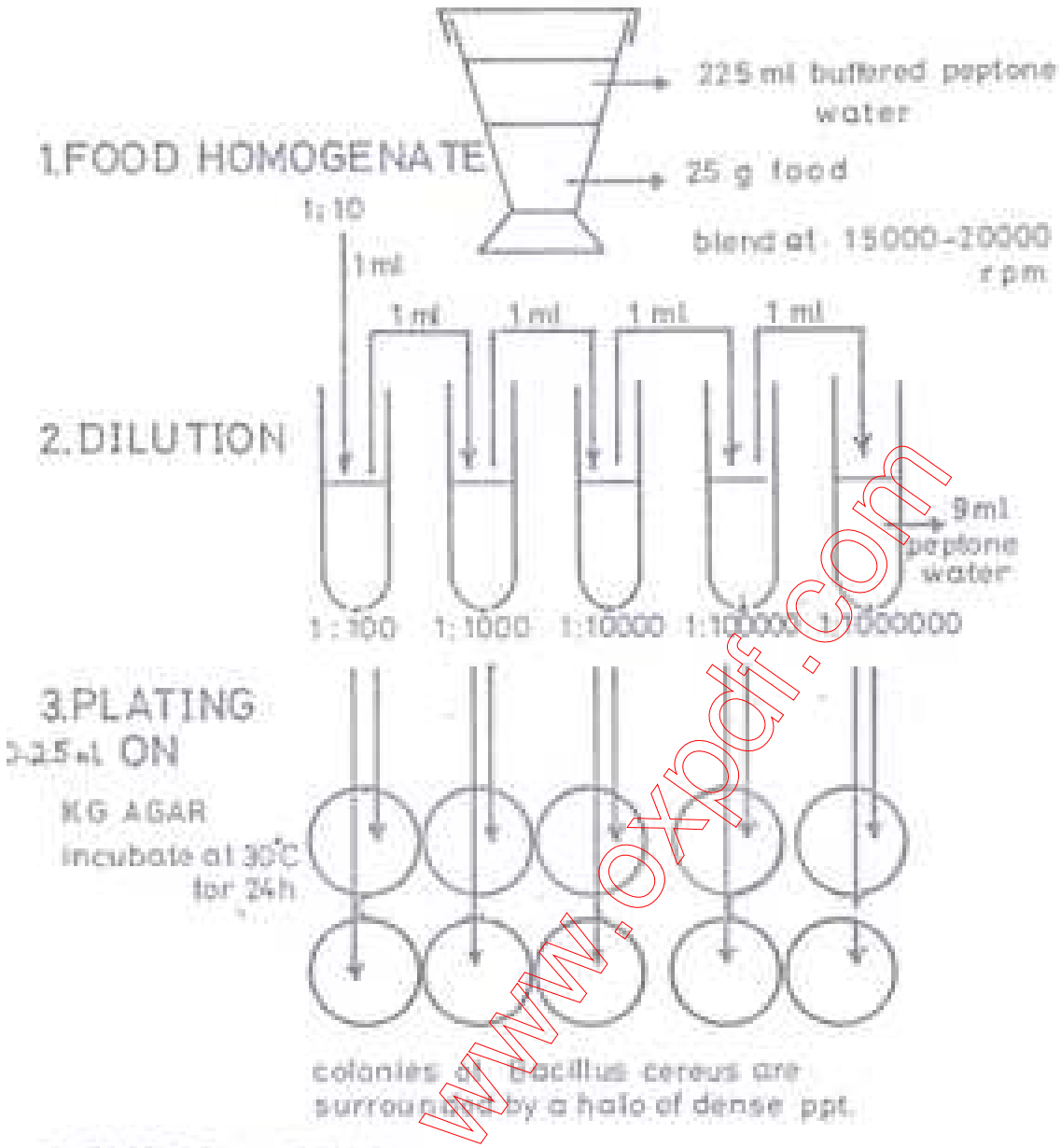
عد المستعمرات المحاطة بها له معكرة (تبعاً لنشاط أنزيم الليثيسينيز) ثم أحسب العدد الكلى للجرام من العينة مضروباً فى ٤ ثم فى معامل التخفيف .

الاختبارات التأكيدية :

أ- يجرى عمل شريحة من المستعمرات المميزة وتصبغ بصبغة جرام وتفحص المستعمرات ميكروسكوبيا.

ب-فى نفس الوقت يتم تلقيح المستعمرات المميزة فى أنابيب آجار مائل من بيئة الآجار المغذى وتحضن على درجة ٣٠°م لمدة ٢٤ ساعة.

www.Oxpdf.com



4. SMEAR & STAIN WITH GRAM (Gram +)

5. BIOCHEMICAL TESTS

a. nitrate red.	+	e. acid from mannitol	+
b. starch hyd.	±	f. litmus milk pept., coag.	
c. gelatine liq.	+	g. motility	±
d. V P	+		

شكل ١٥ رسم تخطيطى لطريقة الكشف عن بكتريا *Bacillus cereus*

www.oxpdf.com

ومن النموات الناتجة يتم تلقيح الأنابيب الأتية :

١- أنبوبة جيلاتين : وتختبر لاسالة وتحليل الجيلاتين بعد ٢٤ ساعة من التحضين على ٢٠°م.

٢- أنبوبة مرق النيترات : وتحضن على درجة ٣٥°م لمدة ٢٤ ساعة ثم توضع نقطتين من دليل الالفانفثول. وتكون لون برتقالى يدل على اختزال النترات إلى نيتريت.

٣- بيئة V.P.

جـــ- خواص ميكروب *B.cereus*

تحلل الجيلاتين	
النترات	**+**
صفار البيض	**+**
V.P.	**-**
جرام	**+**

حساب عدد المستعمرات :

يجرى الحساب والعد للمستعمرات التى تكون هاله والمميزة ميكروسكوبيا وبيوكيماوياً كعدد لبكتريا *B.cereus* .

www.Oxpdf.com

عاشرا : تنمية وعد بكتريا *Clostridium perfringens*

Enumeration of *Clostridium Perfringens*

تعتمد هذه الطريقة فى عد *Cl.perfringens* على استخدام طريقة صب الأطباق باستخدام بيئة متخصصة تحتوى على Sulphite polymyxin sulphadiazine (SPS) حيث يختزل ميكروب *C.perfringens* السلفيت إلى سلفيد والذى يتفاعل بدورة مع الحديد المضاف للبيئة ليكون فى النهاية راسب أسود للحديد والذى يعطى مستعمرات هذه البكتريا المظهر الأسود. وهذه المستعمرات يتم التأكد منها باستخدام اختبارات أخرى . تقوم المضادات الحيوية بتثبيط اللاهوائيات وكذلك اللاهوائيات اختيارياً.

الزجاجيات والأجهزة :

أطباق بترى ، ماصات ، أوعية لاهوائية ، حضان ٣٥°م ، حمام مائى ٤٥°م عداد مستعمرات.

Culture media and reagents:

١- Cooked meat enrichment medium.
٢- Fluid thioglycolate medium.
٣- Motility nitrate medium.
٤- Peptone water.
٥- Sporulation broth.
٦- Sulphite polymyxin sulphadiazin agar (sps).
٧- Gram stain.

طريقة العمل :

تحضير وتجنيس المادة الغذائية : كما سبق

التخفيف : كما سبق

التلقيح :

أ- يوضع ١مل من كل تخفيف من المادة الغذائية بعد التجنيس فى طبق بترى معقم (مع مراعاة أن يجرى العد لكل تخفيف فى طبقين).

ب-تصب البيئة SPS على الأطباق بمعدل ١٥-٢٠مل للطبق ثم تحرك الأطباق دائرية لخلط المادة الغذائية بالآجار . تترك الأطباق حتى يتجمد الاجار.

التحضين :

www.Oxoid.com

أ- تقلب الأطباق وتوضع فى وعاء لا هوائى.

ب- تحضن الأوعية اللاهوائية على درجة ٣٥-٣٧°م لمدة ٢٤ ساعة.

ج- تختبر كل مزرعة بصبغة جرام وتفحص لنقاوتها (عصويات غليظة قصيرة موجبة لجرام) .

د- إذا كانت المزارع نقية يجرى التلقيح فى أنابيب منفصلة من بيئة motility-nitrate, Cooked meat medium, Sporalation broth وتحضن البيئات على درجة ٣٥°م لمدة ٢٤ ساعة.

هـ- تختبر الأنابيب التى تحتوى على motility-nitrate لحركة الميكروب ، (نوع النمو على طول الأنبوبة) حيث أن الميكروب *Cl.perfringens* غير متحرك كذلك تختبر لاختزال النترات بإضافة ٠،٥ إلى ١مل من محلول الفانفثول أمين مع كمية مساوية من حمض السلفانيلك (يختزل الميكروب النترات ويظهر اللون البرتقالى خلال ١٥ دقيقة).

و- يختبر لوجود الجراثيم من بيئة مرق التجرثم Sporulation يجرى عمل شريحة من الراسب حيث يجفف هوائياً ويثبت حرارياً ثم يجرى الصبغ بصبغة أخضر المالاكيت لمدة ١٠ دقائق. أغسل بالماء ثم إعادة الصبغ بمحلول الصفرانين لمدة ١٥ ثانية . يغسل بالماء ويجفف ميكروسكوبيا تأخذ الجراثيم الصبغة الخضراء والخلايا الخضرية تأخذ الصبغة الحمراء.

حساب وعد المستعمرات :

يحسب عدد بكتريا *Cl.perfringens* فى العينة على أساس النسبة المئوية للمستعمرات المختبرة والتى تم تصنيفها إلى هذا الميكروب .

مثـــال :

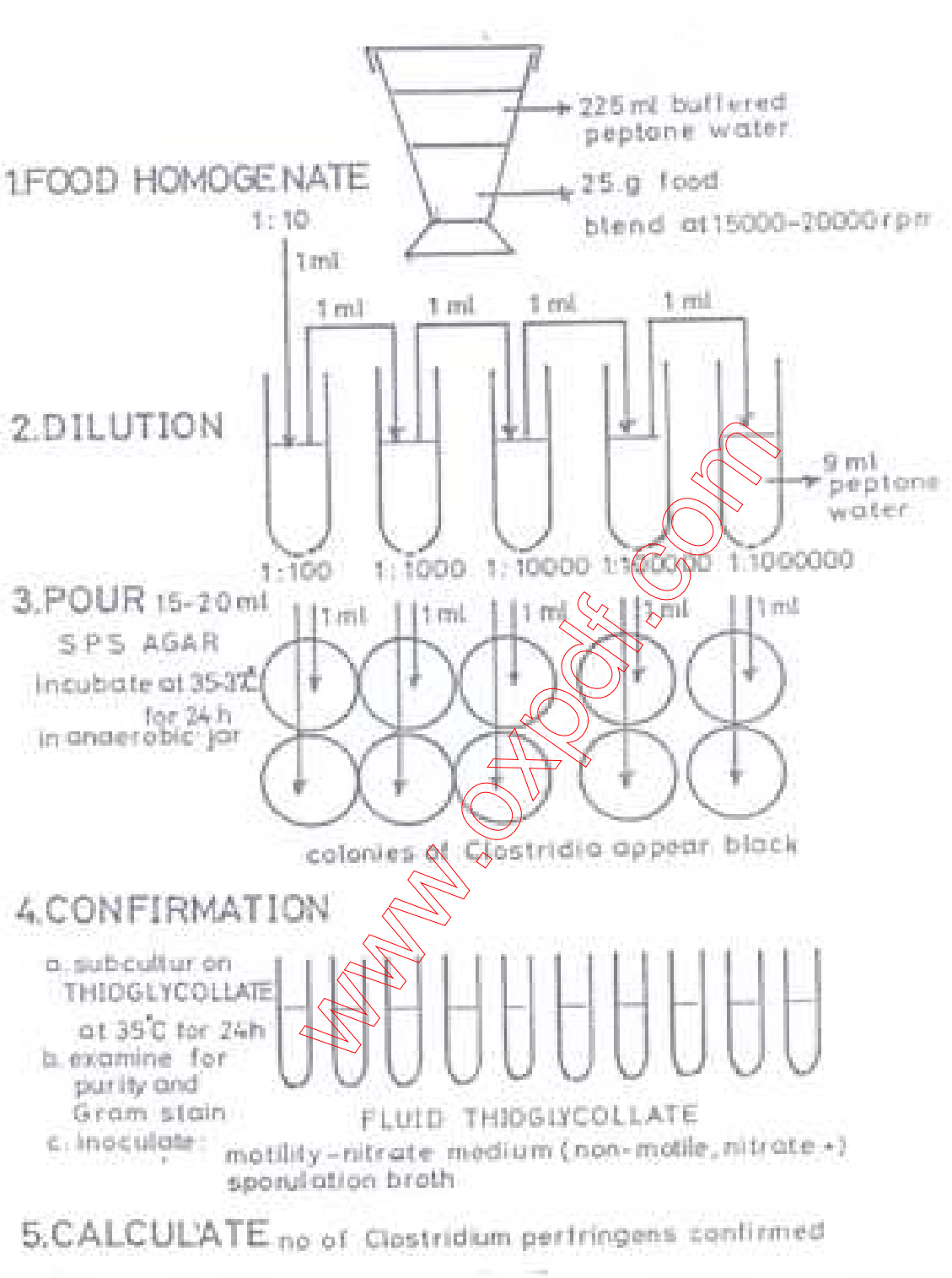
عدد المستعمرات السوداء $١٠^{-٤}$ = ٨٥

وتم تمييز ٨ مستعمرات للميكروب من ١٠ مستعمرات مختبرة.

∴ يكون عدد بكتريا *Cl. perfringens* فى الجرام من المادة الغذائية

= ١٠،٠٠٠ × ٠،٨ × ٨٥ = ٦٨٠،٠٠٠

www.oxpgt.com



شكل ١٦ يوضح مخطط لطريقة الكشف عن *Clostridium perfringens*

www.oxpdf.com

احدى عشر : التعرف على البكتريا الحيةمن النوع *Clostridium botulinum* وسموم البوتشولين

أساس الطريقة :

تعتمد هذه الطريقة على الكشف عن العصويات الموجبة لجرام ذات الجراثيم المنتفخة قرب طرفها **Subterminal oval spore** والتى تنمو على بيئة اللحم المطبوخ **Cooked meat** مكونة عكارة وغاز والتى تحلل جزيئات اللحم. ونظراً لأن هذا الميكروب يشابه أنواع **Clostridium** الأخرى غير السامة فإن الكشف عن السموم الخاصة بها بالطرق المناعية **Immunological detection** تعتبر من الأهمية بمكان وتميز هذه السموم فى راشح المزرعة أو فى المادة الغذائية يعتمد على حقن مستخلص المادة الغذائية أو محلول المزرعة بعد الطرد المركزى فى عضلات فئران لها مناعة مكتسبة نتيجة حقنها مسبقاً بمضادات سموم البوتشوليزم.

www.pdf.com

الأجهزة والزجاجيات :

ماصات – حقن (**hypodermic**) لحقن الفئران – أنابيب طرد مركزى مناسبة – خلاط ميكانيكى سعته مناسبة لتجنيس كمية بسيطة من عينات المواد الغذائية – جهاز طرد مركزى – حضانة ٣٠°م – حمام مائى ٥٠°م ، ٨٠°م.

Culture media and reagents:

١- **Cooked meat medium.**
٢- **Sterile saline solitin.**
٣- **poly and mono valent antitoxins**

طريقة العمل :

التعرف على وتمييز خلايا *Cl.botulinum*

أ- التلقيـــح : يوضع حوالى ٥جرام من المادة الغذائية بعد التجنيس فى كل من ٣ أنابيب تحتوى على **Cokked meat medium** حديث الغليان والتبريد . سخن أحد الأنابيب بعد الزرع إلى ٦٠°م لمدة ١٥ دقيقة وأخرى إلى ٨٠°م لمدة ٣٠ دقيقة .

ب- التحضين : حضن الثلاث أنابيب على درجة ٣٠°م لمدة من ٥ إلى ١٥ يوماً ثم تفحص لتكون عكارة بها وكذلك لتكون غاز وهضم جزيئات اللحم.

جـ- الفحص :

١- بعد ٥ أيام أفحص المزارع لتكون العكارة وإنتاج الغاز وهضم جزيئات اللحم والرائحة . أيضاً تعمل شرائح من المزرعة وتصبغ بصبغة جرام وتفحص ميكروسكوبيا. أفحص الشكل المورفولوجى للميكروب ولاحظ وجود خلايا الكلوستريديا المميزة وكذلك وجود الجراثيم بالخلية وشكلها وموقعها.

٢- إذا لم يلاحظ نمو بعد ٥ أيام تحضن الأنابيب وتفحص بعد ١٠ أيام.

التعرف على سموم البوتشوليزم فى الأغذية:

أ- تجنيس المادة الغذائية مع كمية مساوية من المحلول الفسيولوجى باستخدام خلاط مناسب.

ب-تطرد المادة الغذائية بعد التجنيس طرداً مركزياً عالياً لمدة ساعة ويفضل أن يكون الطرد تحت تبريد.

ج- يسخن ٢ مل من المحلول الناتج من الطرد المركزى إلى درجة الغليان ويترك يغلى لمدة ١٠ دقائق.

د- يحقن عدد ٢ فأر بكمية ٠،٥ مل من المحلول السابق بعد التسخين . وهذا اختبار مقارنة لسموم البوتشوليزم الغير مقاومة للحرارة حيث لا تموت هذه الفئران بنتيجة سموم البوتشوليزم والتى يفترض أنها كانت متواجدة فى المحلول قبل التسخين.

هـ- يتم تخفيف محلول الطرد المركزى الغير مسخن باستخدام محلول فسيولوجى لتخفيفات

و- يتم حقن زوج من الفئران بكمية ٠،٥ مل من محلول الطرد المركزى المخفف والغير مخفف.

ى- تلاحظ الفئران لمدة ٧٢ ساعة. وتبدأ عادة ظهور أعراض التسمم البوتشولين بعد ٢٤ ساعة وتبدأ بسقوط شعر الفرو وتتبعها صعوبة فى تنفس الحيوان وضعف فى حركة الأطراف ثم شلل كامل ثم الموت.

www.Oxpdf.com

تمييز نوع سم البوتشوليزم:

أ- تخفف مضادات سم البوتشوليزم الأحادية التكوين السيرولوجى من الأنواع F,E,B,A باستخدام محلول فسيولوجى حتى تركيز وحدة دولية /٠،٥مل. من الأنواع.

ب-تجرى تخفيفات لمحلول الطرد المركزى إلى ١٠ ، ١٠٠ ، ١٠٠٠ من الجرعة المميتة.

ج-تحقن مجاميع من الفئران فى أغشيتها البريتونية بمضادات سموم البوتشوليزم المخففة (٠،٥ مل لكل فأر).

د- يعاد حقن الفئران السابقة (التى بها مناعة) بعد ٣٠-٦٠ دقيقة بالتخفيفات المختلفة لمحلول الطرد المركزى . أيضاً يتم حقن زوج من الفئران (ليست بها مناعة لهذه السموم) بتخفيفين من محلول الطرد المركزى لفئران مقارنة.

هـ- لاحظ الفئران لمدة ٧٢ ساعة لظهور أعراض التسمم البوتشولين.

و- بموت جميع الفئران عدا واحداً يعنى أن له مناعة متخصصة لنوع السم البوتشولين الذى بالمادة الغذائية. بذلك يمكن التعرف على نوع السم.

تمييز والتعرف على سموم البوتشوليزم فى راشح المزرعة : كما سبق فى المادة الغذائية

www.Oxpdf.com

الكشف عن الفيروسات فى عينات الغذاء

وجد ان الفيرس احد مسببات الامراض فى الغذاء عام ١٩١٤ عندما حدث وباء لشلل الاطفال نتيجة استهلاك لبن خام يحتوى هذا الفيرس وقد حدثت عدة اوبئة بعد ذلك من استهلاك الالبان الملوثة الا انه لم يحدث اصابة بهذا الفيرس منذ بداية خمسينات القرن الماضى وحتى الآن فى اية دولة من الدول المتقدمة نتيجة انتشار التطعيم ضد هذا المرض.

الا انه منذ بداية خمسينات القرن الماضى بدء ظهور تسممات غذائية بسبب الفيرس مثل الالتهاب الكبدى الوبائى من النوع ا نتيجة استهلاك منتجات اسماك فى الولايات المتحدة الامريكية والسويد وبعد ذلك ظهرت حالات تسمم من فيروسات معوية خاصة نتيجة استهلاك منتجات الأسماك او حمى الفم والقدم من منجات اللحوم والالبان.

ومنذ ١٩٩٠ ونتيجة للتطور فى طرق الكشف فى البيولوجيا الجزيئية فقد بدء التطور الحقيقى للكشف عن الفيروسات كمسبب للمشاكل فى الغذاء سواء بالنسبة للفيروسات صعبة التنمية او تلك التى لابمكنها النمو. ويعتقد حاليا ان اية فيرس يوجد فى القناة الهضمية يمكن ان ينتقل الى الأنسان من خلال الغذاء ، مما يجعل البعض ان امراض الجهاز الهضمى الفيروسية فى ازدياد نتيجة لتعرض بعض الفئات الخاصة مثل الأطفال حديثى الولادة ، الحوامل ، المسنين ، بعض المرضى ذوى المناعة المنخفضة مثل مرضى السرطان والمنقول لهم اعضاء . ايضا العاملين بالتمريض يزداد احتمال تعرضهم لأمراض الغذاء الفيروسية بنسبة ١٠٠% . الى جانب أن استهلاك الأغذية الخام اى غير المعاملة خاصة المنتجة تحت ظروف غير صحية واغذية الشوارع والتجارة الدولية من العوامل التى ساعدت على زيادة المخاطر من هذه النوعية من الامراض فى السنوات الأخيرة.

من اكثر انواع الأغذيةالتى تسببت فى حدوث اوبئة فيروسية غذائية : المحاريات والقشريات ، الأغذية المبردة ، الفواكه والخضروات الطازجة ، المياه الملوثة

كان يعتقد لفترة قريبة ان انتقال انتقال الفيروسات الغذائية يكون من خلال الإنسان وتلامسه الا انه ثبت انها يمكن ان تنتقل من التلوث العارض او من الماء الملوث او من الحيوان ومن اكثر هذه الفيروسات فيروسات القناه الهضمية من النوع الطبقى caliciviruses والالتهاب الكبدى من النوع hepatitis E . لذلك نجد ان حالات التسمم الغذائى التى نسبت الى الفيروسات اقل من الحقيقة لعدم سهولة الكشف عن الفيروسات.

والمشكلات الأساسية فى الكشف عن الفيروسات فى الغذاء تشمل:

www.oxford.com

- وجودها بكميات ضئيلة حيث يكفى وجود جزىء واحد فى الغذاء يكفى لإحداث الإصابة بعكس معظم أنواع البكتريا.

- يجب استخلاص الفيرس من الغذاء قبل زيادة عدده فى مزارع الأنسجة او الطرق الجزيئية للتخلص من بعض المكونات التى قد تؤثر على طريقة التقدير .

- كثير من الفيروسات لايمكن او يصعب اكثاره فى مزارع انسجة مثل فيروسات الالتهاب الكبدى ا.

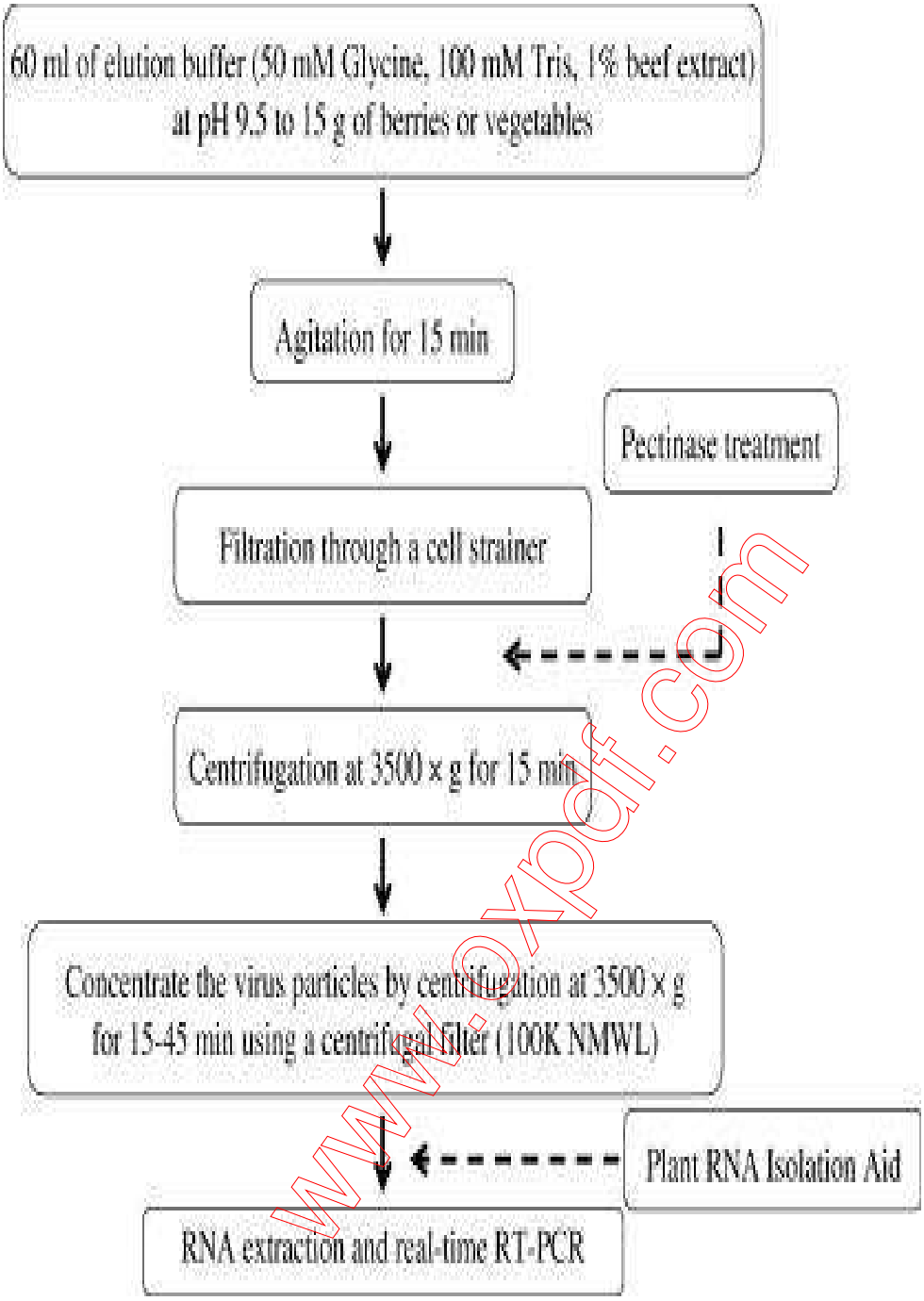
- لايوجد طريقة معتمدة للآن للكشف عن الفيروسات فى الغذاء وكل الطرق المعروفة محدودة الإستخدام.

- اختلاف طرق فصل وتركيز الفيرس من مجموعة غذائية لأخرى (انظر شكل ٥ و ٦) نتيجة التداخل بين بعض مكونات الغذاء مع مكونات الفيرس

هذا مما يقلل الحساسية لتقدير الفيروسات فى الغذاء ومن حسن الحظ ان التطور الذى حدث فى طريقة التقدير بإستخدام تفاعلات البلمرة المتسلسلة (PCR) خاصة RT-PCR(Real Time Polymerase Chain Reaction) قد ساعد الى حد ما فى تطور طرق الكشف الوصفية والكمية و لكن مازال امامنا الكثير للوصول على حساسية عالية فى التقدير.

وتعتمد هذه الطريقة على استخلاص الحمض النووى الفيرسى RNA او DNA فى محلول منظم قلوى ثم يتم تركيز الحمض النووى من خلال الترسيب بالحامض او بإستخدم البولى ايثلين جليكول او بالمذيبات العضوية الأخرى. تؤدى عملية التركيز الى تقليل حجم العينة مما يساعد على تقدير الحمض الفيرسى بالطرق المختلفة والموضح امثلة لها بجدول٢.

www.Oxpdf.com



شكل ١٧ طريقة استخلاص وتقدير الفيرس الممرض للإنسان من بعض الفواكه والخضروات

www.oxpdf.com

50-g FOOD SAMPLE

350 ml 0.05M Glycine/0.14N Saline, pH 9.0

Homogenize (350-400 ml)

↓

FILTER

Cheesecloth

↓

SOLVENT EXTRACT

(as needed)

↓

1º PEG PRECIPITATION and ELUTION

6% PEG, 4ºC, 2 h

Centrifuge 5000 x g/15 min

Resuspend in 50mM Tris, 0.2% Tween 20, pH 9.0

(30-35 ml)

↓

2º PEG PRECIPITATION and RESUSPENSION

12% PEG, 4ºC, 2 h

Resuspend in 50mM Tris, 0.2% Tween 20, pH 8.0

(3-5 ml)

↓

RNA EXTRACTION and RT-PCR

(25-40 µl)

شكل١٨: طريقة استخلاص وتركيز والكشف عن الفيروسات فى الغذاء

PEG: Polyethylene Glycol

www.0xqf.com

جدول١١ : طرق تقدير بعض الفيروسات المعزولة من بعض الأغذية

Agent	Food	Samples Tested	Methods	Conclusions
HAV	Strawberries	Outbreak samples (clinical only)	RT-PCR (Single and nested) Sequencing	Identical nucleotide sequences of amplicons from patients in MI, WI, LA, AZ, and TN
NLV (G I / G II)	Oysters	Outbreak samples (clinical only)	EM RT-PCR Sequencing EIA	12/12 samples positive by EM and/or RT-PCR Identical nucleotide sequences of amplicons from 7/7 stool samples tested 11/14 serum pairs had a • 4-fold increase in NV Antibody
NLV	Shellfish	Outbreak samples (food only)	RT-PCR (Single and nested) Sequencing	4/4 outbreak samples Positive
NLV	Oysters	Outbreak samples (clinical and food)	RT-PCR (nested) Sequencing	Co-existence of 2 different NLV genogroups in single oyster specimen by RT-PCR and sequencing
NLV (G II)	Oysters	Outbreak samples (food only)	RT-PCR Sequencing	2/3 recalled outbreak oysters samples positive
NLV (G II)	Deli meats	Outbreak samples (clinical and food)	RT-PCR (nested) Sequencing	Identical nucleotide sequences of amplicons from food and clinical Samples
NLV	Raspberries	Outbreak samples (clinical and food)	RT-PCR Southern Hyb. Sequencing	Identical nucleotide sequences of amplicons from food and clinical Samples
NLV (G II)	Salad	Outbreak samples (clinical only)	EM RT-PCR	6/6 clinical samples Positive Evidence of transmission by an asymptomatic food handler
NLV (G II)	Sandwiches	Outbreak samples (clinical only)	EM RT-PCR Sequencing	9/20 positive samples by EM 7/20 positive samples by RT-PCR Identical nucleotide sequences of amplicons from asymptomatic food handler and infected company employees
NLV (G I)	Box lunches	Outbreak samples (clinical and food)	EM RT-PCR Sequencing	4/4 positive samples by EM 5/6 positive samples by RT-PCR No virus detected in food samples from box lunches

Real time polymerase chain reaction (RT-PCR) , Electron microscope (EM) , Multiplex RT-PCR (mRT-PCR) , Nucleic acid sequence-based amplification (NASBA) , immunomagnetic beads-PCR (IM-PCR),

www.Oxpdf.com

ملاحق

www.oxpdf.com

ملحق ١

الحدود الميكروبيولوجية لبعض الكائنات فى بعض الأغذية والمواصفة المرجعية الخاصة بها والمرحلة التى يطبق فيها الحد طبقا لقواعد المفوضية الأوروبية رقم ١٤٤١/٢٠٠٧ والصادرة فى ٥ دبسمبر ٢٠٠٧

أ- اختبارات سلامة الغذاء

المنتج الغذائى	الكائن الملوث	عدد العينات المسحوبة		الحدود		رقم المواصفة المرجعية	المرحلة التى يطبق فيها الحدود
		ن *n	س**C	م*** m	ق **** M		
الأغذية الجاهزة المحضرة للأطفال او للأغراض الطبية	*Listeria monocytogenes*	١٠	صفر	لاتوجد فى ٢٥ جرام(وجود الميكروب فى اى وحدة من العينة تصبح مرفوضة)		EN/ISO11290-1	المنتج الموضوع على الرف اثناء فترة الصلاحية
الأغذية الجاهزة المحضرة والتى لاتستهلك بواسطة الفئات السابقة وبمكن للميكروب ان ينمو بها	*Listeria monocytognes*	٥	صفر	لاتوجد فى ٢٥ جرام		EN/ISO11290-1	المتج قبل خروجه من المصنع
الأغذية الجاهزة المحضرة والتى لاتستهلك بواسطة الفئات السابقة ولابمكن للميكروب ان ينمو بها	*L. monocytogenes*	٥	صفر	١٠٠ وحدة مكونة للمستعمرات /جم		EN/ISO11290-2	المنتج الموضوع على الرف اثناء فترة الصلاحية
اللحوم المفرومة ومنتجاتها التى تؤكل نيئة	*Salmonella*	٥	صفر	لاتوجد فى ٢٥ جرام(وجود الميكروب فى اى وحدة من العينة تصبح مرفوضة)		EN/ISO 6579	المنتج الموضوع على الرف اثناء فترة الصلاحية
لحوم الدجاج المفرومة ومنتجاتها التى تؤكل مطبوخة	*Salmonella*	٥	صفر	لاتوجد فى ٢٥ جرام(وجود الميكروب فى اى وحدة من العينة تصبح مرفوضة)		EN/ISO 6579	المنتج الموضوع على الرف اثناء فترة الصلاحية
لحوم المفرومة ومنتجاتها مصنعة من سلالات بخلاف الطيورو تؤكل مطبوخة	*Salmonella*	٥	صفر	لاتوجد فى ١٠ جرام(وجود الميكروب فى اى وحدة من العينة تصبح مرفوضة)		EN/ISO 6579	المنتج الموضوع على الرف اثناء فترة الصلاحية
لحوم متحصل عليها ميكانيكيا	*Salmonella*	٥	صفر	لاتوجد فى ١٠ جرام(وجود الميكروب فى اى وحدة من العينة تصبح مرفوضة)		EN/ISO 6579	المنتج الموضوع على الرف اثناء فترة الصلاحية

www.oxpdf.com

المنتج الغذائى	الكائن الملوث	عدد العينات المسحوبة		الحدود		رقم المواصفة المرجعية	المرحلة التى يطبق فيها الحدود
		ن *n	س**C	م*** m	ق **** M		
منتجات لحوم تؤكل خام مع استبعاد المنتجات التى يتم التخلص من مخاطر السالمونيلا اثناء التصنيع	*Salmonella*	٥	صفر	لاتوجد فى ٢٥ جرام(وجود الميكروب فى اى وحدة من العينة تصبح مرفوضة)		EN/ISO 6579	المنتج الموضوع على الرف اثناء فترة الصلاحية
منتجات لحوم مصنعة من لحم دواجن وتؤكل مطبوخة	*Salmonella*	٥	صفر	لاتوجد فى ٢٥ جرام(وجود الميكروب فى اى وحدة من العينة تصبح مرفوضة)		EN/ISO 6579	المنتج الموضوع على الرف اثناء فترة الصلاحية
الجيلاتين والكولاجين	*Salmonella*	٥	صفر	لاتوجد فى ٢٥ جرام(وجود الميكروب فى اى وحدة من العينة تصبح مرفوضة)		EN/ISO 6579	المنتج الموضوع على الرف اثناء فترة الصلاحية
الجبن والزبد والقشدة المصنعة من لبن خام او البان معاملة حراريا بدرجة اقل من البسترة	*Salmonella*	٥	صفر	لاتوجد فى ٢٥ جرام(وجود الميكروب فى اى وحدة من العينة تصبح مرفوضة)		EN/ISO 6579	المنتج الموضوع على الرف اثناء فترة الصلاحية
اللبن والشرش المجفف	*Salmonella*	٥	صفر	لاتوجد فى ٢٥ جرام(وجود الميكروب فى اى وحدة من العينة تصبح مرفوضة)		EN/ISO 6579	المنتج الموضوع على الرف اثناء فترة الصلاحية
المثلوجات القشدية التى يدخل فى مكوناتها لبن ويستبعد المثلوجات التى يراعى اثناء التصنيع استبعاد السالمونيلا كمصدر للخطر	*Salmonella*	٥	صفر	لاتوجد فى ٢٥ جرام(وجود الميكروب فى اى وحدة من العينة تصبح مرفوضة)		EN/ISO 6579	المنتج الموضوع على الرف اثناء فترة الصلاحية
منتجات البيض ويستبعد المنتجات التى يراعى اثناء التصنيع او المكونات استبعاد السالمونيلا كمصدر للخطر	*Salmonella*	٥	صفر	لاتوجد فى ٢٥ جرام(وجود الميكروب فى اى وحدة من العينة تصبح مرفوضة)		EN/ISO 6579	المنتج الموضوع على الرف اثناء فترة الصلاحية
الأغذية الجاهزة التى تحتوى على بيض خام ويستبعد المنتجات التى يراعى اثناء التصنيع او المكونات استبعاد السالمونيلا كمصدر للخطر	*Salmonella*	٥	صفر	لاتوجد فى ٢٥ جرام(وجود الميكروب فى اى وحدة من العينة تصبح مرفوضة)		EN/ISO 6579	المنتج الموضوع على الرف اثناء فترة الصلاحية
القشريات والمحاريات المطبوخة	*Salmonella*	٥	صفر	لاتوجد فى ٢٥ جرام(وجود الميكروب فى اى وحدة من العينة تصبح مرفوضة)		EN/ISO 6579	المنتج الموضوع على الرف اثناء فترة الصلاحية
المحاريات الحية	*Salmonella*	٥	صفر	لاتوجد فى ٢٥ جرام(وجود الميكروب فى اى وحدة من العينة تصبح مرفوضة)		EN/ISO 6579	المنتج الموضوع على الرف اثناء فترة الصلاحية
الحبوب المنبته التى تؤكل طازجة	*Salmonella*	٥	صفر	لاتوجد فى ٢٥ جرام(وجود الميكروب فى اى وحدة من العينة تصبح مرفوضة)		EN/ISO 6579	المنتج الموضوع على الرف اثناء فترة الصلاحية

www.oxoid.com

المنتج الغذائى	الكائن الملوث	عدد العينات المسحوبة		الحدود		رقم المواصفة المرجعية	المرحلة التى يطبق فيها الحدود
		ن *n	سC**	م m***	ق M ****		الصلاحية
الخضروات والفواكه الطازجة التى تؤكل طازجة	*Salmonella*	٥	صفر	لاتوجد فى ٢٥ جرام(وجود الميكروب فى اى وحدة من العينة تصبح مرفوضة)		EN/ISO 6579	المنتج الموضوع على الرف اثناء فترة الصلاحية
عصائر الخضروات والفواكه الطازجة غير المبسترة الجاهزة للتقديم	*Salmonella*	٥	صفر	لاتوجد فى ٢٥ جرام(وجود الميكروب فى اى وحدة من العينة تصبح مرفوضة)		EN/ISO 6579	المنتج الموضوع على الرف اثناء فترة الصلاحية
الجبن واللبن المجفف والشرش المجفف التى يحتمل ان تحتوى على coagulase-positive staphylococci	Staphylococcal enterotoxins	٥	صفر	غير موجودة فى ٢٥ جرام(وجود السموم فى اى وحدة من العينة تصبح مرفوضة)		European screening method of the CRL for coagulase positive staphylococci	المنتج الموضوع على الرف اثناء فترة الصلاحية
اغذية الأطفال الجافةاو المكملات الغذائية المعدة لهدف طبى وتقدم للأطفال الأقل من ٦ شهور	*Salmonella*	٣٠	صفر	غير موجودة فى ٢٥ جرام(وجود الميكروب فى اى وحدة من العينة تصبح مرفوضة)		EN/ISO 6579	المنتج الموضوع على الرف اثناء فترة الصلاحية
اغذية لاطفال الجافة	*Salmonella*	٣٠	صفر	غير موجودة فى ٢٥ جرام(وجود الميكروب فى اى وحدة من العينة تصبح مرفوضة)		EN/ISO 6579	المنتج الموضوع على الرف اثناء فترة الصلاحية
اغذية الأطفال الجافةاو المكملات الغذائية المعدة لهدف طبى وتقدم للأطفال الأقل من ٦ شهور(يجب تقدير الENTEROBACTERIACEAE فى العينات وفى حالة ظهوره فى احد العينات يتم اعادة اختبار جميع العينات لـ*Enterobacter sakazaki*	*Enterobacter sakazakii*	٣٠	صفر	غير موجودة فى ١٠ جرام(وجود الميكروب فى اى وحدة من العينة تصبح مرفوضة)		ISO/TS22964 EC 365/2010	المنتج الموضوع على الرف اثناء فترة الصلاحية
المحاريات والقشريات الحية	*E. coli* تستخدم كدليل على التلوث البرازى	(عينة مركبة تتكون من ١٠ حيوانات على الأقل)	صفر	٢٣٠ عد احتمالى /١٠٠ جرام من اللحم او المحتوى الداخلى للحيوان		ISO TS 16649-3	المنتج الموضوع على الرف اثناء فترة الصلاحية

n*

www.oxoid.com

ن عدد وحدات العينة
**C س عدد وحدات العينة التى تعطى نتائج موجبة بينm و m
*** M م تعبر عن مستوى الحد الميكروبى المطلوب تحقيقه فى المنتج الغذائى
****M ق تعبر عن قيمة او مستوى الحد الميكروبى الذى يجب الا يصل اليه او يزيد فى اية وحدة من وحدات العينة

www.oxpdf.com

ب- محددات الشئون الصحية للتصنيع

المنتج الغذائى	الكائن الملوث	عدد العينات المسحوبة		الحدود		رقم المواصفة المرجعية	المرحلة التى يطبق فيها الحدود
		ن *n	س**C	م*** m	ق **** M		
اللحوم ومنتجاتها							
ذبيحة البقر والغنم والماعز والحصان (يراعى ان النتائج تكون مقبولة فى حالة اذا كان متوسط لوغاريتم عدد المستعمرات بين M و m ا ما اذا كان متوسط عدد المستعمرات اعلى منM تصبح العينات غير مقبولة)	Aerobic colony count			المتوسط اليومى ٣،٥ لوغاريتم عدد الوحدات المكونة للمستمرات/سم٢	المتوسط اليومى ٥،٠ لوغاريتم عدد الوحدات المكونة للمستمرات /سم٢	ISO 4833	الذبيحة بعد الذبح وقبل التبريد
	Enterobacteriaceae			المتوسط اليومى١،٥ لوغاريتم عدد الوحدات المكونة للمستمرات/سم٢	المتوسط اليومى ٢،٥ لوغاريتم عدد الوحدات المكونة للمستمرات /سم٢	ISO 21528-2	الذبيحة بعد الذبح وقبل التبريد
ذبيحة الخنزير	Aerobic colony count			المتوسط اليومى ٤،٠لوغاريتم عدد الوحدات المكونة للمستمرات/سم٢	المتوسط اليومى ٥،٠ لوغاريتم عدد الوحدات المكونة للمستمرات /سم٢	ISO 4833	الذبيحة بعد الذبح وقبل التبريد
	Enterobacteriaceae			المتوسط اليومى٢،٠ لوغاريتم عدد الوحدات المكونة للمستمرات/سم٢	المتوسط اليومى ٣،٠ لوغاريتم عدد الوحدات المكونة للمستمرات /سم٢	ISO 21528-2	الذبيحة بعد الذبح وقبل التبريد
ذبيحة البقر والغنم والماعز والحصان	*Salmonella*	٥٠	٢	خالى فى المساحة المختبرة فى الذبيحة		EN/ISO 6579	الذبيحة بعد الذبح وقبل التبريد
ذبيحة الخنزير	*Salmonella*	٥٠	٥	خالى فى المساحة المختبرة فى الذبيحة		EN/ISO 6579	الذبيحة بعد الذبح وقبل التبريد
ذبيحة الدواجن والرومى	*Salmonella*	٥٠	٧	خالى فى٢٥ جرام من عينة مركبة من جلد الرقبة		EN/ISO 6579	الذبيحة بعد التبريد
اللحم المفروم يراعى ان النتائج تكون مقبولة فى حالة اذا كان متوسط لوغاريتم عدد المستعمرات ≤ m اماذا كان متوسط عدد المستعمرات بينM و m تصبح العينات غير مقبولة)	Aerobic colony count	٥	٢	5×10^3 وحدة مكونة للمستعمرة/ جرام	5×10^6 cfu/	ISO 4833	بعد نهاية التصنيع وهذا الحد لاينطبق على اللحم المفروم فى المحلات حيث ان فترة صلاحيته ٢٤ ساعة فقط
	E. coli	٥	٢	50وحدة مكونة	500وحدة مكونة	ISO 16649-1	بعد نهاية التصنيع

www.xpdf.com

المنتج الغذائى	الكائن الملوث	عدد العينات المسحوبة		الحدود		رقم المواصفة المرجعية	المرحلة التى يطبق فيها الحدود
		ن *n	س**C	م*** m	ق **** M		
				للمستعمرة/جرام	للمستعمرة/جرام		وهذا الحد لاينطبق على اللحم المفروم فى المحلات حيث ان فترة صلاحيته ٢٤ ساعة فقط
اللحوم المفصولة ميكانيكيا	Aerobic colony count	٥	٢	5 × 105وحدة مكونة للمستعمرة/جرام	5×10^6 cfu/	ISO 4833	بعد نهاية التصنيع
	E. coli	٥	٢	50وحدة مكونة للمستعمرة/جرام	500وحدة مكونة للمستعمرة/جرام	ISO16649-1 or 2	بعد نهاية التصنيع
مصنعات اللحوم	*E. coli*	٥	٢	500وحدة مكونة للمستعمرة/جرام	5000وحدة مكونة للمستعمرة/جرام	ISO 16649-1 or 2	بعد نهاية التصنيع وهذا الحد لاينطبق على اللحم المفروم فى المحلات حيث ان فترة صلاحيته ٢٤ ساعة فقط
الالبان ومنتجاتها							
اللبن المبستر ومنتجات الالبان السائلة	Enterobacteriaceae	٥	٢	< 1/ml	5/ml	ISO 21528-1	بعد نهاية التصنيع
الجبن المصنعة من لبن او شرش معامل حراريا	*E. coli*	٥	٢	100وحدة مكونة للمستعمرة /جرام	1 000وحدة مكونة للمستعمرة/جرام	ISO16649-1 or 2	بعد نهاية التصنيع
جبن مصنع من لبن خام	positive Coagulase staphylococci	٥	٢	10^4وحدة مكونة للمستعمرة/جرام	10^5وحدة مكونة للمستعمرة/جرام	EN/ISO 6888-2	عند الخطوة التصنيعية التى يتوقع فيها الى تركيز من الخلايا

www.Oxpdf.com

المنتج الغذائى	الكائن الملوث	عدد العينات المسحوبة		الحدود		رقم المواصفة المرجعية	المرحلة التى يطبق فيها الحدود
		ن n*	س C**	م*** m	ق **** M		
							العنقودية
جبن مصنعة من لبن معامل حراريا بدرجة اقل من البستروجبن مسواة مصنعة من لبن اوشرش معامل معملة حرارية اقل من البسترة	positive Coagulase staphylococci	٥	٢	100وحدة مكونة للمستعمرة/ جرام	1 000وحدة مكونة للمستعمرة/جرام	EN/ISO 6888-1 or 2	
جبن طرى غير مسوى مصنع من شرش اولبن معامل حراري بالبسترة او مايعادلها	positive Coagulase staphylococci	٥	٢	10وحدة مكونة للمستعمرة/ جرام	100 cfu/ g	EN/ISO 6888-1 or 2	بعد نهاية التصنيع
زبد او قشدة مصنعة من لبن خام او لم يعامل معاملة حرارية تعادل البسترة	*E. coli*	٥	٢	10وحدة مكونة للمستعمرة/ جرام	100وحدة مكونة للمستعمرة/جرام	ISO16649-1 or 2	بعد نهاية التصنيع
اللبن او الشر ش الجاف	Enterobacteriaceae	٥	صفر	10وحدة مكونة للمستعمرة/جرام		ISO 21528-2	بعد نهاية التصنيع
	positive Coagulase staphylococci	٥	٢	10وحدة مكونة للمستعمرة/ جرام	100وحدة مكونة للمستعمرة/جرام	EN/ISO 6888-1or 2	بعد نهاية التصنيع
المثلوجات القشدية ومنتجات الحلوى اللبنية	Enterobacteriaceae	٥	٢	10وحدة مكونة للمستعمرة/ جرام	100وحدة مكونة للمستعمرة/جرام	ISO 21528-2	بعد نهاية التصنيع
اغذية الأطفال الجافةاو المكملات الغذائية المعدة لهدف طبى وتقدم للأطفال الأقل من ٦ شهور(يجب تقدير الENTEROBACTERIACEAE فـــى العينـــات وفى حالة ظهوره فى احد العينات يتم اعادة اختبار جميع العينات ل*Enterobacter sakazaki*	Enterobacteriaceae	١٠	صفر	لاتوجد فى ١٠ جرام		ISO 21528-1	بعد نهاية التصنيع
	Presumptive *Bacillus cereus* يلقح ١ مل فى طبق قطر ١٤٠ ملليمتر او ٣ اطباق قطر ٩٠ ملليمتر	٥	١	50وحدة مكونة للمستعمرة/ جرام	500وحدة مكونة للمستعمرة/جرام	EN/ISO 7932	بعد نهاية التصنيع
اغذية لاطفال الجافة	Enterobacteriaceae	٥	صفر	لاتوجد فى ١٠ جرام		ISO 21528-1	بعد نهاية التصنيع
منتجات البيض							

www.oxpdf.com

المنتج الغذائى	الكائن الملوث	عدد العينات المسحوبة		الحدود		رقم المواصفة المرجعية	المرحلة التى يطبق فيها الحدود
		ن *n	سC**	م m***	ق M ****		
منتجات البيض	Enterobacteriaceae	٥	٢	١٠وحدة مكونةللمستعمرة/جرام او الميللتر	١٠٠وحدة مكونة للمستعمرة/جرا م او الميللتر	ISO 21528-2	بعد نهاية التصنيع
منتجات الاسماك							
المحاربات والقشريات المطبوخة منزوعة القشر او الصدف	*E. coli*	٥	٢	1 وحدة مكونة للمستعمرة/ جرام	10 وحدة مكونة للمستعمرة/جرا م	ISO TS16649-3	بعد نهاية التصنيع
	positive Coagulase staphylococci	٥	٢	100 وحدة مكونة للمستعمرة/ جرام	1000 وحدة مكونة للمستعمرة/جرا م	EN/ISO 6888-1 or 2	بعد نهاية التصنيع
الفواكه والخضروات ومنتجاتها							
الفواكه والخضروات الطازجة المجهزة للأكل	*E. col*	٥	٢	100 وحدة مكونة للمستعمرة/ جرام	1000وحدة مكونة للمستعمرة/جرا م	ISO16649-1 or 2	بعد نهاية عمليات التعبئة
عصير فواكه او خضروات غير مبستر وجاهز للتقديم	*E. coli*	٥	٢	100 وحدة مكونة للمستعمرة/ جرام	1000وحدة مكونة للمستعمرة/جرا م	ISO 16649-1 or 2	بعد نهاية عمليات التعبئة

* ن n عدد وحدات العينة

**C س عدد وحدات العينة التى تعطى نتائج موجبة بينm و m

*** M م تعبر عن مستوى الحد الميكروبى المطلوب تحقيقه فى المنتج الغذائى

****M ق تعبر عن قيمة او مستوى الحد الميكروبى الذى يجب الا يصل اليه او يزيد فى اية وحدة من وحدات العينة

www.oxpdf.com

ملحق ٢
Culture media البيئات الميكروبية

Many of the media formulations presented in this section are available commerically, either dehydrate or ready-to-use form. It is important that the manufactuer's instructions for prepared in the laboratory the instructions mentioned in this section should be followed. For adjusting the pH of the media use NaOH, HCl, lactic acid or tartaric acid.

Alkaline peptone water

Peptone	**10.0g**
Sodium chloride	**10.0g**
Dist. Water	**1000.0ml**

Adjust pH to 8.4-8.6, dispense 7ml portions into tubes. Sterilize for 10min at 121°C.

1.1. Azide dextross broth

Beef extract	**4.5g**
Tryptone	**15.0g**
Glucose	**7.5g**
Sodium chloride	**7.5g**
Sodium azide	**0.5g**
Dist. Water	**1000.0ml**

Adjust pH to 7.2, dispense 7ml portions into tubes. Sterilize for 15min at 121°C.

1.2. Baird-Parker agar

a) Basal medium

Tryptone	**10.0g**
Beef extract	**10.0g**
Yeast extract	**1.0g**
Lithium chloride	**5.0g**
Agar	**20.0g**
Sodium sulfamethazine	**0.055g**
Dist. Water	**1000.0ml**

Heat with agitation to obtain compets solution, adjust pH to 6.8, disense in 90ml portions into bottles. Sterilize for 15min at 121°C.

b) Preparation of complete medium

To melted and tempered (45-50°C) ml portions of basal medium add the following prs-warmed (45-50°C) solutions sterilized by filtration:

20% solution of glycine 6.3ml

www.Oxpdf.com

1% solution of potassium tellurite	**1.0ml**
20% solution of sodium pyruvate	**5.0ml**
Oxoid egg-yolk emulsion	**5.0ml**

Mix well and pour immedia-tely in portions into petri-dishes.

1.3. Bismuth sulphite agar (Wilson and Blair)

Beef extract	**5.0g**
Peptone	**10.0g**
Glucose	**5.0g**
Disodium hydrogen phosphate	**4.0g**
Ferrous sulphate	**0.3g**
Bismuth sulphite	**8.0g**
Brilliant-green	**0.025g**
Agar	**20.0g**
Dist.water	**1000.0**

Dissolve in boilling water by agitation, cool to 40-45°C, final pH should be 7.7, pour in 15ml portions in petridishes. Store in a refrigerator and do not use before 24h after 5 days.

1.5 Brain-Heart infusion agar

Brain-heart infusion agar contains the same ingredients as brain-heart infusion broth except that 15.0g agar are added. The pH should be 7.4 after sterilization. Dispense in tubes for slants.

1.6 Brain-heart infusion broth

Calf brains, infusion from	**200.0g**
Beef heart, infusion from	**250.0g**
Peptone	**10.0g**
Sodium chloride	**5.0g**
Disodium hyrogen phos-phte	**2.5g**
Glucose	**2.0g**
Dist. Water	**1000.0ml**

Adjust pH to 7.4, dispense 7ml portions into tubes. Sterilize for 15min at 121°C.

1.7*Brilliant-green lactose bile broth 2%*

Peptone	**10.0g**
Lactose	**10.0g**
Ox bile	**20.0g**
Brilliant-green	**0.0133g**

www.oxpdf.com

Dist. Water **1000.0ml**

Dissolve the peptone and lactose in 500ml of distilled water, add the ox bile dissolved in 200ml of water, mix and make up 950ml, adjust pH to 7.4 add 13.3ml of 0.1% aquous solution of Brilliant-Green. Add distilled water to bring the total volume to 1 litre. Dispense in 10ml portions in tubes containing Durham tubes. Sterilize for 15min at 121°C.

1.8 *Brilliant-green/phenol red agar*

a-Meat extract	**4.0g**
Peptone	**10.0g**
Sodium chloride	**3.0g**
Disodium hydrogen ph-osphate	**0.8g**
Sodium dihydrogen phosphate	**0.6g**
Agar	**12.0g**
Dist.water	**900.0ml**

Adjust pH to 7.0, dispense in bottles of 500ml capacity. Sterilize for 15min at 121°C.

b) Lactose	**10.0g**
Sucrose	**10.0g**
Phenol red	**0.09g**
Dist. Water	**1000.0ml**

Heat in a water bath for 20min. At 70°C, cool to 55°C and use immediately.

c) Brilliant-green	**0.5g**
Dist. Water	**100.0g**

Store at least for one day in dark.

Complete medium **add 900ml of a), 100ml of b), and 1ml of c) pour 15-ml portions in petridishes. Immediately before use dry the plates carefully for 30min at 50°C**

1.9 *Buffered peptone water*

Peptone	**10.0g**
Sodium chloride	**5.0g**
Disodium hydrogen pho-sphate	**9.0**
Potassium dihydrogen Phosphate	**1.5g**
Dist. Water	**1000.0ml**

Adjust pH to 7.0, dispense in portions of 225ml into bottles of 500ml capacity and of 9ml in tubes. Sterilize for 20 min at 121°C.

1.10 *Carbohydrate fermentation medium*

www.Oxpdf.com

Peptone	**10.0g**
Meat extract	**3.0g**
Sodium chloride	**5.0g**
Andrade's indicator	**10.0ml**
Dist. Water	**1000.0ml**

Adjust pH to 7.1-7.2 dispense in tubes with inverted Durham tubes. Sterilize for 15 min at 121°C.

Glucose, lactose, sucrose etc. In a final concentration of 1%are employed. Sugars may be added to the basal medium prior to sterilization except the disaccharides should be sterilized by fitration or at 121°C for 10 10min and added to already sterilized basal medium.

1.11 *Carbohydrate media, 3% salt*

Proteose peptone	**3.0g**
Beef extract	**1.0g**
Sodium chloride	**30.0g**
Bromcreasol purple	**0.04g**
Dist. Water	**1000.0ml**

Prepare as in 1.10.

1.12 *Cooked meat enrichment medium*

Beef heart	**454.0g**
peptone	**20.0g**
Glucose	**2.0g**
Sodium chloride	**5.0g**
Dist.water	**1000.0ml**

Adjust pH to 7.2, dispense 10ml portions in screw-capped bottles. Sterilize for 15min at 121°C

1.13 Cooked meat medium

a) Beef heart	**454.0g**
peptone	**20.0g**
Glucose	**2.0g**
Sodium chloride	**5.0g**
b) Trypticase	**10.0g**
Sodiumthioglycollate	**1.0g**
Soluble starch	**1.0g**
Glucose	**2.0g**
Neutral red (1% aquous)	**5.0g**
Dist. Water	**1000.0ml**

Adjust pH to 6.8. Add 1g of a) and 15 ml of b) to tubes. Allow meat particles to become throughly wetted; Then sterilize for 15min at 121°C.

1.14 *Decarboxylase medium, 3% salt*

Peptone	**5.0g**

www.oxpdf.com

Yeast extract	3.0g
Sodium chloride	30.0g
Glucose	1.0g
Bromcresol purple (1.6%)	1.0
Dist water	1000.0ml

Adjust pH to 6.7-6.8, divide the basal broth into 3 portions. Add 0.5% L-arginine to the first portion, add0.5% L-lysine to the second portion; The third portion serves as control. Dispense 3ml portions into screw-capped tubes. Sterilize for 20min at 121°C.

1.15 *BC Broth*

Trypticase or tryptone	20.0g
Bile salt No. 3	1.5g
Lactose	5.0g
Dipotassium hydrogen pho-sphate	4.0g
Potassium dihydrogen pho-sphate	1.5g
Sodium chloride	5.0g
Dsit. Water	1000.0ml

Adjust pH to 6.9, dispense in 15ml portions in test tubes Sterilize for 15min at 121°C.

1.16 *Egg-yolk emulsion*

Use fresh hens' eggs and separate the yolks from the whites. Mix the yolks throroughly with four times their volume of water. Heat the mixture in water bath at 46°C for 2h and allow a precipitate to form during 18-24h at 0.5°C. Decant off the supernatent liquid and sterilize this by filtration. Store the emulsion at 0-5°C for not longer than 72h before use.

1.17 *Endo agar*

Adjust pH to 7.4, sterilize for 15min at 121°C, pour in petri dishes in 15ml portions.

1.18 *L-EMB agar*

a) Peptone	10.0g
Lactose	10.0g
Dipotassium hydrog-en phosphate	2.0g
Agar	15.0g
Dist. Water	1000.0ml
b) Eosin Y	0.4g
Methylene blue	0.065g

Make a solution of a), adjust pH to 7.1-7.2. Dispense in 100 ml portions. Sterilize for 15min at 121°C. Before use melt, and to each 100ml portion add 2.0ml of aqueus 2% eosin Y solution and 4.3ml of 0.15% aqueous methylene blue solution.

1.19 *Enteric enrichment (EE) broth*

www.oxpdf.com

Peptone	**10.0g**
Glucose	**5.0g**
Disodium hydrogen phos-phate	**8.0g**
Potassium dihydrogen ph-osphate	**2.0g**
Ox bile	**20.0g**
Brilliant-green	**0.015g**
Dist. Water	**1000.0ml**

Adjust pH to 7.2, dispense in 30ml portions in flasks. Sterilize for 5 at 121°C.

1.20 *Ethyl violet azide broth*

Tryptone	**20.0g**
Glucose	**5.0g**
Sodium chloride	**5.0g**
Dipotassium hydrogen phosphate	**2.7g**
Potassium dihydrogen phosphate	**2.7g**
Sodium azide	**0.4g**
Ethyl violet	**0.00083g**
Dist. Water	**1000.0ml**

Adjust pH to 7.0 Sterilize for 1min at 121°C.

1.21 *Fluid thioglycollate medium*

Trpticase or casitone	**15.0g**
L-oystine	**0.5g**
Glucose	**5.0g**
Yeast extract	**5.0g**
Sodium chloride	**2.0g**
Sodium thioglycollate	**0.5g**
Resazurin	**0.001g**
Agar	**0.7g**
Dist. Water	**1000.0ml**

Heat to boiling to obtain complet solution. Cool, adjust pH to 7.1, dispense in 10ml portions in screwcaptubes. Sterilize for 15min at 121°Cimmediately before use, heat tubes it flowing steam for 10min to drive of dissolved oxygen and cool rapidly it tap water.

1.22 *β-Galactosidase reageat*

a)Sodium dihydrogen phos-phate	**6.0g**
Sodium hydroxide solu-tion, approx. 0.1N (4g/L)	**3.0g**
Dist. Water to make up to	**50.0ml**

Dissolve the sodium dihyd-rogen phosphate in 45ml water. Adjust the pH 7.0±0.1 by adding enough of the sodium hydroxide solution. Add water to 50ml. Store under refrigerator.

www.Oxpdf.com

b) O-nitrophenyl β-D-gala-ctopyran oside **6.0g**

Dist.water **1000.0ml**

Disslove at 50°C, cool, add 50.0 ml a)and store at 4°C but not longer one month.

1.23 Glucose salt teepol broth

Beef extract	**3.0g**
Peptone	**1.0g**
Sodium chloride	**3.0g**
Glucose	**1.0g**
Methyl violet Teepol	**0.5g**
Dist. Water	**1000.0ml**

Adjust pH to 7.4, dispense in 10ml portions in tubes. Sterilize for 15min at 121°C.

1.24 *Hugh-Lifeson glucose broth*

Peptone	**2.0g**
Yeast extract	**0.5g**
Sodium chloride	**30.0g**
Glucose	**10.0g**
Bromcresol purple	**0.015g**
Agar	**3.0g**
Dist.water	**1000.0ml**

Adjust pH to 7.4, dispense in 10ml portions in tube. Sterilize for 15min at 121°C.

1.25 *Indole medium*

Tryptone	**10.0g**
Sodium chloride	**5.0g**
DL-tryptophan	**1.0g**
Dist.water	**1000.0ml**

Adjust pH to 7.0, dispense in 5ml portions in 16mm diameter tubes. Sterilize for 15min at 121°C.

1.26 *Indole raagent*

p-Dimethylaminobenza-ldehyde **5.0g**

Hydrochloric acid, con-centrated. **25.0g**

Tertamyl alcohol **75.0ml**

1.27. Kf Streptococcus agar

Proteose peptone No. 3 or polypeptone **10.0g**

Yeast extract	**10.0g**
Sodium chloride	**5.0g**
Sodium glycerophosphate	**10.0g**
Maltose	**20.0g**
Lactose	**1.0g**

www.oxpdf.com

Sodium azide	**0.4g**
Bromcresol purple	**0.015g**
Agar	**20.0g**
Dist. Water	**1000.0ml**

Mix 7.64g of dehydrated medium with 100ml of sterile distilled water in a sterile flask. Heat in a boiling water bath to disslove the agar. After solution is complete heat for an additional5min. Cool to 50-60°C and add 1ml sterile aqueous 1% solution of 2,3,5- triphenyltetra-zolium chloride per 100ml. Adjust pH to 7.2 with 10% sodium carbo-nate solution if necessary. The medium may be held at 45-50°C for up to 4h before pouring plate.

1.28 *KG agar medium*

Peptone	**1.0g**
Yeast extract	**0.5g**
Phenol red	**0.025g**
Agar	**18.0g**
Dist. Water	**900.0ml**

Adjust pH to 6.8, sterilize for 20min at 121°C, cool to 50°C. Add 100ml of sterile concentrated egg yolk emulsion (Oxoid) and polymyxin B sulphate to give a final concentrtrion of 10µg/ml. Mix and pour into potri-dishes.

1.29 *Koser's citrate broth*

Sodium ammonium hyd-rogen phosphate	**1.5g**
Dipotassium hydrogen phosphate	**1.0g**
Magnesium sulphate	**0.2g**
Sodium citrate	**3.g**
Dist. Water	**1000.0ml**

Adjust pH to 6.8, dispense in 10mlportions in test tubes. Sterilize for 15min at 121°C.

1.30 *Lactose broth*

Beef extract	**3.0g**
peptone	**5.0g**
Lactose	**5.0g**
Dist. Water	**1000.0ml**

Adjust pH to 6.8,dispense into fermentation tubes. Sterilize for 15min at 121°C.

1.31 *Lauryl sulphate tryptose broth*

Tryptose, tryptone or trypticase	**20.0g**
Lactose	**5.0g**
Dipotassium monohydro-gen phosphate	**2.75g**
Potassium dihydrogen ph-osphate	**2.75g**
Sodium chloride	**5.0g**
Sodium lauryl sulphate	**0.1g**
Dist. Water	**1000.0ml**

www.oxpdf.com

Adjust pH to 6.8, dispense in 10ml portions in tubes with inverted Durham tubes. Sterilize for 10min at 121°C.

1.32 *Litmus-Milk*

Skim-milk powder	**100.0g**
Litmus	**5.0g**
Dist.water	**1000.0ml**

Adjust pH to 6.8, dispense in 10ml portions. Sterilize for 5min at 121°C.

1.33 *lysine decarboxylation medium*

L-lysine monohydrochl-oride	**5.0g**
Yeast extract	**3.0g**
Glucose	**1.0g**
Bromcresol purple	**0.015g**
Dist. Water	**1000.0ml**

Adjust pH to 6.8, dispense in 5ml portions in narrow tubes (18 × 160mm).Starilize for 20min at 121°C.

1.34 *MacConkey agar*

Peptone	**20.0g**
Lactose	**10.0g**
Bile salts	**1.5g**
Sodium chloride	**5.0g**
Agar	**15.0g**
Neutral red	**0.03g**
Crystal violet	**0.001g**
Dist. Water	**1000.0ml**

Adjust pH to 7.1, sterilize for 15min at 121°C. Pour in petri-dishes.

1.35 *MacConkey broth*

Peptone	**20.0g**
Lactose	**10.0g**
Ox gall	**5.0g**
Bromcresol purple	**0.01g**
Dist.water	**1000.0ml**

Adjust pH to 7.3, dispense in 225ml porions in flasks. Sterilize for 15min at 121°C.

1.36 *Malt agae (with antibiotic)*

a) *Malt agar*

Malt extract	**30.0g**
Agar	**15.0g**
Dist. Water	**1000.0ml**

a) Antibiotic solution

Add 500 mg each of chloro-tetracycline HCl and chloram-phenicol to 100ml sterile phosphate buffered distilled water and mix.

Two ml of this solution is added per 100ml of tempered malt agar or mycophil agar giving a final concentration in the mediua of the antibiotics.

www.Oxpdf.com

1.37 *M-FC broth*

Tryptose	**10.0g**
Proteose peptone No. 3 or polypeptone	**5.0g**
Yeast extract	**3.0g**
Sodium chloride	**5.0g**
Lactose	**12.5g**
Bile salts No. 3 or bile salt mixtures	**1.5g**
Aniline blue	**0.1g**
Dist. Water	**1000.0ml**

Rehydrate in the distilled water containing 10ml of 1% rosolic acid in 0.2N NaOH. Heat the medium to boilting point, promptly remov from heat and cool to below 45°C. Do not sterilize by autiilaving. Final pH should be 7.0 the finished media should be stored at 2-10°C and any unused medium discarded after 96h.

1.38 *M Enterococcus agar*

Tryptose	**20.0g**
Yeast extraot	**5.0g**
Glucose	**2.0g**
Dipotassium hydrogen phosphate	**4.0g**
Agar	**10.0g**
2,3,5-triphenyltetra-zoli-um chloride	**0.1g**
Dist.water	**1000.0ml**

After rehydrating in the distilled water, sterilize by bringing, the pH should be 7.2 after heating poured plates may be stored up to 30 days when hold at 2-10°C.

1.39 *Motility nitrate medium*

Beef extract	**3.0g**
Peptone	**5.0g**
Potassium nitrate	**1.0g**
Agar	**3.0g**
Dist.water	**1000.0ml**

Adjust pH to 7.0, dispense in 10ml portions into screw-capped tubes. Sterilize for 15min at 121°C.

1.40 *Motility test medoum, 3% salt*

Beef extract	**3.0g**
Peptone	**10.0g**
Sodium chloride	**30.0g**
Agar	**4.0g**
Dist.water	**1000.0ml**

Adjust pH to 7.4, dispense in 8ml portion in tubes. Sterilize for 15ml at 121°C.

1.41 *MR-VP broth, 3% salt*

Peptone	**7.0g**
Glucose	**5.0g**
Sodium chloride	**30.0g**

www.oxpdf.com

Dipotassium hydrogen phosphate **5.0g**
Dist.water **1000.0ml**
Adjust pH to 6.9, dispense in 10ml portions in tubes. Sterilize for 15min at 121°C.

1.42 *Mycological (mycophil)*
phytone **10.0g**
Dextrose **10.0g**
Agar **18.0g**
Dist.water **1000.0ml**
Sterilize for 15min at 118°C cool to 45°C, adjust pH to 4.0 by 10% lactic acid prior to plating or tubing. If antibiotics are added, there is no need to adjust the pH.

1.43 *Nitrate broth*
Meat extract **3.0g**
Peptone **5.0g**
Potassium nitrate **1.0g**
Dist.water **1000.0ml**
Adjust pH to 7.0, dispense in tubes. Sterilize for 15min at 121°C.

1.44 *Nutrient agar*
Beef extract **3.0g**
Peptone **5.0g**
Agar **15.0g**
Dist.water **1000.0ml**
Adjust pH to 7.0, sterilize for 20min at 121°C.

1.45 *Nutrient broth*
Beef extract **3.0g**
Peptone **5.0g**
Dist.water **1000.0ml**
Adjust pH to 7.0 Sterilize for 15 min at 121°C.

1.46 *Nutrient gelatine, 3% salt*
Beef extract **3.0g**
Peptone **5.0g**
Gelatine **120.0g**
Sodium chloride **30.0g**
Dist. Water **1000.0**
Adjust pH to 7.0, Sterilize for 12min at 121°C.

1.47 *Packer's crystal-violet azide blood agar*
Tryptose **15.0g**
Beef extract **3.0g**
Sodium chloride **5.0g**
Agar **30.0g**
Dist. Water **1000.0g**
Adjust pH to 7.2, dispense in flasks in 100ml portions. Sterilize for 15min at 121°C. Cool to 50°C and add to each 100ml 5ml of defibri-nated sheep blood, 0.4ml of a

www.OXpdf.com

sterile 0.05% aqueus solution of crystal violet (autoclaved)and 1ml of a sterile 5% aqueous solution of sodium azide (Seitz-filtered). Mix well and pour.

1.48 *Peptone water diluent*

Peptone	**1.0g**
Dist. Water	**1000.0ml**

Sterilize for 15min at 121°C.

1.49 *Phenol red sorbitol broth*

Peptone	**10.0g**
Sodium chloride	**5.0ml**
Phenol red	**0.025g**
Dist. Water	**900.0ml**

Adjust pH to 7.0, dispense in 4.5ml portions into tubes containing inverted Durham tubes. Sterilize for 15min at 121°C. Cool and add 0.5ml of a seitzfiltered 5% aqueous solution of sorbitol.

1.50 *Plate count agar (PCA)*

Dehydrated yeast extract	**2.5g**
Pancreactic digest of casein	**5.0g**
Glucose	**1.0g**
Agar	**15-18g**
Dist. Water	**1000.0ml**

Adjust pH to 7.0, dispense in 15ml portions in tubes. Sterilize for 20min at 121°C. Before use, melt the medium completely in boiling water and keep the tubes in water bath at 45-48°C.

1.51 *Potato dexrose agar*

Infusion from white potatoes	**200.0g**
Dextrose	**20.0g**
Agar	**15.0g**
Dist. Water	**1000.0ml**

Sterilize for 15min at121°C. Before use, melt the medium in boiling water, cool to 50°C and adjust pH to 3.5 with sterile 10% tartaric acid. Mix and pour in plates or tubes.

1.52 *Potassium cyanide broth* (KCN)

Proteose peptone	**3.0g**
Sodium chloride	**5.0g**
Potassium dihydrogen pho-sphate	**0.225g**
Dist. Water	**1000.0ml**

Adjust pH to 7.6. Sterilize for 15min at 121°C, cool and refrigerate at 5-8°C. Aseptically and cautiously add 15ml of cold (5-8°C) 0.5% potassium cyanide, mix gently and dispensee in1ml portions into tubes, stopper by corks impregnated with paraffin and store at 5-6°C.

www.oxoid.com

1.53 *Rope spore medium*

peptone	**10.0g**
Beef extract	**5.4g**
Sodium chloride	**9.0 g**
Dist. Water	**1000.0ml**

Adjust pH to 7.2, dispense in 5ml portions into tubes. Sterilize for 15min at 121°C.

1.54 *Saline solution*

Sodium chloride	**8.5g**
Dist. Water	**1000.0ml**

Adjust pH to 7.0 Sterilize for 20min at 121°C.

1.55 *Salt trypticase broth* (STB)

Tryptocase	**10.0g**
Yeast extract	**3.0g**
Dist. Water	**1000.0ml**

Add 0, 60, 80 and 100g of NaCl per litre to make 0,6,8 and 10% NaCl broth. Sterilize for 15min at 121°C.

1.56 *Selenite cystine broth*

a) Tryptocase	**5.0g**
Lactose	**4.0g**
Disodium hydrogenph-osphate	**10.0g**
Sodium acid selenite	**4.0g**
Dist.water	**1000.0ml**
Dissolve by boiling 5min.	
b) L-cystin	**0.1g**
N-sodium hydroxide	**15.0ml**

Dilute to 100ml with distilled water add b) to a) at the rate of 0.1 to 10ml. Adjust pH to 7.0, dispense in 100ml portions in flasks. Use the medium on the day of preparation.

1.57 *Semi-solid nutrient agar*

Meat extract	**3.0g**
peptone	**5.0g**
Agar	**8.0 g**
Dist. Water	**1000.0ml**

Adjust pH to 7.0 Sterilize for 20min at 121°C.

1.58 *Sodium chloride 3%*

Sodium chloride	**30.0g**
Dist. Water	**1000.0ml**

Sterilize for 15min at 121°C.

1.59*Sporulation broth*

Tryptocase	**20.0g**
Vitamine-free casamino acid	**20.0g**
Sodium thioglycollate	**1.0g**

www.Oxpdf.com

Dist. Water **1000.0ml**

Dispense in 10ml portions into screw-capped tubes. Sterilize for 15minat 121°C. Immediately before use, add to each tube of medium 1ml of filtersterilized aqueous stock solution of thiamine hydrochloride (10µg/ml).

1.60 *Starch agar*

Beef extract	**3.0g**
Peptone	**5.0g**
Starch (soluble)	**2.0g**
Agar	**15.0g**
Dist. Water	**1000.0ml**

Add all ingredients except starch heat to boiling, then add starch slowly boil 3-4min. Cool to 50°C and adjust pH to 7.2 sterilize for 15min at 121°C.

1.61 *Sulphite polymyxin sulphsadi-azin agar*

Tryptone	**15.0g**
Yeast extract	**10.0g**
Ferrio citrate	**0.5g**
Agar	**15.0g**
Dist. Water	**1000.0ml**

Adjust pH to 7.0 sterilize for 15min at 121°C, then add the following Seitz-filtered solutions; 5ml of freshly prepared 10% aqueous solution of sodium sulphite, 10ml of 0.1% aqueus solution of polymyxin B sulphate and 10ml of 1.2% aqueous solution of sodium sulphadiazine. Mix well and pour in petri-dishes.

1.62 *Tetrathionate medium (Muller-Kauffmann)*

a) Meat extract	**5.0g**
Peptone	**10.0g**
Sodium chloride	**3.0g**
Calcium carbonate	**45.0g**
Dist. Water	**1000.0ml**

Adjust pH to 7.0. Sterilize for 20min at 121°C.

b) Sodium thiosulphate	**50.0g**
Dist. Water	**1000.0ml**

Sterilize for 20min at 121°C.

c)Iodine	**20.0g**
Potassium iodide	**25.0g**
Dist. Water	**100.0ml**

Store in the dark

d) Brilliant-green	**0.5g**
Dist. Water	**100.0ml**

Store in the dark

e) Ox bile	**10.0g**
water	**100.0ml**

Sterilize for 20 min. At 121° C.

1.63 *Thallous acetate tetrazolium glucose agar*

www.oxoid.com

Peptone	**10.0g**
Yeast extract	**10.0g**
Agar	**4.0g**
Dist. Water	**1000.0ml**

Adjust pH to 6.0, dispense in 95ml portions. Sterilize for 20 min. At 121°C immediately. Before use add to each 95ml of melted, tempered (45-50°C) agar base 1mlof 1% aqueous solution of 2,3,5-triphenyltetra-zolium chloride (Seitz-filtered), 5ml of 20%aqueous solution of glucose (Seitz-filtered) and 2ml of 5%aqueous thallous acetate solution. Mix, pour in petri-dishes.

1.64 *Thiosulphate citrate bile salts sucrose agar* (TCBS)

Yeast extract	**5.0g**
Peptone	**10.0g**
Sucrose	**20.0g**
Sodium thiosulphate	**10.0g**
Sodium citrate	**10.0g**
Sodium cholate	**3.0g**
Ox gall	**5.0g**
Sodium chloride	**10.0g**
Ferric citrate	**1.0g**
Bromthymol blue	**0.04g**
Thymol blue	**0.04g**
Agar	**15.0g**
Dist. Water	**1000.0ml**

Adjust pH to 8.6, boil for 1-2min.pour in Petri-dishes.

1.65 *Triple sugar/iron agar* (TSI)

Meat extract	**3.0g**
Yeast extract	**3.0g**
Peptone	**20.0g**
Sodium chloride	**5.0g**
Lactose	**10.0g**
Sucrose	**10.0g**
Glucose	**1.0g**
Ferric citrate	**0.3g**
Sodium thiosulphate	**0.3g**
Phenol red	**0.024g**
Agar	**12.0g**
Dist. Water	**1000.0ml**

Adjust pH to 7.4, dispense in 10ml portions into tubes. Sterilize for 10min at 121°C. Allow to set in a sloping position to give a butt of 2.5cm.

1.66 *Trypticase soy agar, 3% salt* (TSA)

Trypticase peptone	**15.0g**
Phytone peptone	**5.0g**
Sodium chloride	**30.0g**
Agar	**15.0g**
Dist. Water	**1000.0ml**

Adjust pH to 7.3, dispense in tubes. Serilize for 15min at 121°C.

www.Oxpdf.com

1.67 *Trypticase soy broth (TSB)3% salt*

Trypticase peptone	**17.0g**
Phytone peptone	**3.0g**
Sodium chloride	**30.0g**
Dipotassium hydrogen phosphate	**2.5g**
Glucose	**2.5g**
Dist. Water	**1000.0ml**

Adjust pH to 3.7, dispense into tubes. Sterilize for 15min at 121°C.

1.68 *Tryptone broth,3 % salt*

Tryptone	**10.0g**
Sodium chloride	**30.0g**
Dist. Water	**1000.0ml**

Dispense in 5ml portions into tubes. Sterilize for 15min at 121°C.

1.69 *Tryptose agar*

As tryptose broth (1.71) except that it contains 15.0g agar per litre, pH 6.9-7.0.

1.70 *Tryptose bile broth 40%*

As tryptose broth (1.71) except that it contains 40.0g ox gall per litre, pH 6.9-7.0.

1.71 *Tryptose broth*

Tryptose	**10.0g**
Glucose	**1.0g**
Sodium chlorise	**5.0g**
Thiamine hydrochloride	**0.005g**
Dist. Water	**1000.0ml**

Adjust pH to 7.2, dispense in 5ml portions. Sterilize for 15min at 121°C.

1.72 *Tryptose salt broth*

As tryptose broth except that it contains 65.0g sodium chloride, pH 6.9-7.0.

1.73 *Tryptose tellurite broth*

As tryptose broth except that it contains 5.0g potassium tellurite and 15.0g agar per litre, pH 6.9-7.0.

1.74 *Tryptose* TTC agar

As tryptose broth except that it contains 0.1g triphenyl tetrazolium chloride and 15.0g agar, pH 6.9-7.0.

1.75 *Urea agar*

a) peptone	**1.0g**
Glucose	**1.0g**
Sodium chloride	**5.0g**
Potassium dihydrogen phosphate	**2.0g**
Phenol red	**0.012g**
Agar	**15.0g**

www.oxpdf.com

Dist. Water	**1000.0ml**

Sterilize for 20min at 121°C

b) Urea	**400.0g**
Dist. Wtaer to make	**1000.0ml**

Sterilize by filtration, Add 50ml of b) to 950ml of a) under aseptic condition, adjust pH to 6.8, dispense in 10ml portions into tubes and allow to set in a slope position.

1.76 *Violet red bile agar*

Yeast extract	**3.0g**
Peptone	**7.0g**
Sodium chloride	**5.0g**
Bile salts	**1.5g**
Lactose	**10.0g**
Neutral red	**0.03**
Crystal violet	**0.002**
Agar	**15.0g**
Dist. Water	**1000.0ml**

Adjust pH to 7.0-7.4. Heat with agitation and boil for 2min. Dos not sterilize.

1.77 *Voges-Proskauer medium*

Peptone	**7.0g**
Glucose	**5.0g**
Dipotassium hydrogen phosphats	**5.0g**
Dist. Water	**1000.0ml**

Adjust pH to 6.9 and filter. Sterilize for 20min at 115°C.

1.78 *Xylose lysine desoxycholate agar (XLD)*

Xylose	**3.75g**
L-lysine HCl	**5.0g**
Lactose	**7.5g**
Sucrose	**7.5g**
Sodium chloride	**5.0g**
Yeast extract	**3.0g**
Phenol red	**0.08g**
Agar	**15.0g**
Dist. Water	**1000.0ml**

Sterilize for 15min at 121°C, cool to 50°C and add; 20ml of thiosulphatecitrate solution (34.0g sodium thiosulphats + 4.0g ferric ammonium citrate + 100ml water, sterilize by filtration) and 25ml of 10% aqueous solution of sodium desoxycholate (sterilize by filtration.

www.oxpdf.com

REAGENTS, INDICATORS AND STAINS.

2.1 *Andrade's indicator*

Acid fuchsin **0.5g**
Sodium hydroxide (IN) **16.0ml**
Dist. Water **100.0ml**
The fuchsin is dissolved in distilled water and sodium hydroxide is added. It should be decolourized after several hours, otherwise further drops of the alkali are added.

2.2 *Bromcresol purple indicator*
Carefully weigh 0.1g of bromcresol purple indicator and suspend in 20ml of 0.05N sodium hydroxide. Heat gently with constant stirring. Add 5ml of 0.05m sodium hydroxide (stock solution). To make the indicator solution dilute 1ml of the stock solution with 9ml of distilled water.

2.3.*Buffered phosphate dilution water*
Potassium dihydrogen phosphate **34.0g**

Dist. Water **500.0ml**
Adjust pH to 7.2 with 1N sodium hydroxide solution and make up to one litre and store (stock solution). Add 1.25ml of the stock solution to one litre distilled water. Sterilize at 121°C for 15min.

2.4 *Cytochrome oxidase reagents*
N,N,N'-tetramethyl-p-phenylenediamine **5.0g**

Dist. Water **1000.0ml**
Store in dark glass bottle at 5-10°C. Storage life is 15days.

2.5 *Kovacs' (indol) regent*
See F.1.26.
2.6 *Methyl red indicator*
Methyl red **0.10g**
95% ethanol **300.0ml**
Dissolve the methyl red in ethanol and make up to 500ml with distilled water.

2.7. *Oxidase reagent*
Para-amino dimethylphen-ylenedimine monohydro-chloride **1.0g**

Dist. Water **100.0ml**
Dissolve, it should always be prepared fresh.

2.8*Phosphate buffered saline* (PBS), pH 7.6 *Stock solution*
Disodium hydrogen phosp-hate anhydrous **12.35g**

Sodium dihydogen posphate **1.80g**
Sodium ehlorid **85.0g**
Dist. Water **1000.0ml**
Working solution
Concentrated stock solution **100.0ml**
Dist. Water to make **1000.0ml**

www.Oxpdf.com

2.9 *Voges-Proskauer (V-P) test reagents*

Solution A

Alpha naphthol **5.0ml**

Absolute ethanol **100.0ml**

Solution B

Potassium hydroxide **40.0g**

Sodium bicarbonate solution, 5% **8.0ml**

a) Aqueous methyl violet, 1% **30.0ml**

Dist. Water **100.0ml**

2.10 Gram's stain

a) Aqueous methyl violet, 1% **30.0ml**

Sodium bicarbonate solution, 5% **8.0ml**

b) Iodine **1.0mg**

Potassium iodide **2.0g**

Sodium bicarbonate solution 5% **60.0ml**

Dist. Water **240.0ml**

c) *Counter stain*

Safranin (saturated alcohol solution) **10.0ml**

Dist. Water **90.0ml**

Or

Basic fuchsin **0.05g**

Dist. Water **100.0ml**

2.11 Spore stain

Solution A

Malachite green **10.0g**

Dist. Water **100.0ml**

Filter to remove undissolved dye.

Solution B

Safranin 0 **0.25g**

Dist. Water **100.0ml**

www.Oxpdf.com

ملحق ٣

بعض الاجهزة المقترحة لمعمل ميكروبيولوجى اغذية

مسلسل	الاجهزة	الكمية
١	ELECTRONIC BALANCE, CAPACITY 400G, TOP LOADING READABILITY 0.1G, 230V, 50-60HZ. CALIBRATION CERTIFICATE, 2-YEAR WARRANTY	١
٢	SLIDING TRIPLE BEAM BALANCE, SINGLE PAN, CAPACITY 2 KG, READABILITY 1G	١
٣	ELECTRONIC BALANCE, SEMI-MICRO ANALYTICAL 100G, READABILITY 0.001 G, 230V, 50-60HZ. CALIBRATION CERTIFICATE, 2 YEAR WARRANTY	١
٤	AUTOCLAVE CAPACITY 60-80 LITRES, HIGH PRECISION, FRONT LOADING MODEL, WITH DIGITAL DISPLAY, MICROPROCESSOR CONTROLLED, TOGETHER WITH BASKETS /SHELVES, 230V, 50-60HZ.	١
٥	STERILIZATION INDICATOR TAPES 3 ROLLS CALIBRATION CERTIFICATE, 2 YEAR WARRANTY,	٥
٦	LAMINAR HOOD, WIDTH 1 METRE, WITH HEPA FILTER SYSTEM 230V, 50-60HZ 2 YEAR WARRANTY	١
٧	WARING BLENDER TWO SPEED COMPLETE UNIT MAX 12000 RPM, CALIBRATION CERTIFICATE, 2 YEAR WARRANTY- 1 LITER AUTOCLAVABLE JARS	١
٨	STOMACHER BLENDER, SAMPLE CAPACITY 400 – 500 ML, VARIABLE SPEED AND TIME, 230V, 50-60HZ. CALIBRATION CERTIFICATE, 2 YEAR WARRANTY	١
٩	BAGS FOR THE STOMACHER	٥ اكياس

www.oxpdf.com

١	COLIFORM WATER BATH, HIGH PRECISION, CAPACITY 10-12 LITER, MICROPROCESSOR CONTROLLED, WITH LID 230V, 50-60HZ. CALIBRATION CERTIFICATE, 2 YEAR WARRANTY, USER MANUAL, INSTALLATION INSTRUCTION MANUAL – RUBBER COATED TEST TUBE RACKS FOR ABOVE (10 X 4 HOLES)	١٠
٢	WATER BATH CAPACITY 8-10 LITER, WITH LID, 230V, 50-60HZ. 2 YEAR WARRANTY,	١١
٣	INCUBATORS AMBIENT TO 70 ^{O}C, MICROPROCESSOR CONTROLLED, CAPACITY 200 LITER, 230V, 50-60HZ. CALIBRATION CERTIFICATE, 2 YEAR WARRANTY	١٢
١	COOLING INCUBATORS 5 TO 30 ^{O}C, MICROPROCESSOR CONTROLLED, CAPACITY 400 LITER, 230V, 50-60HZ. CALIBRATION CERTIFICATE, 2 YEAR WAR	١٣
١	STERILIZING OVEN WITH FAN CIRCULATED, TEMP. UP TO 250 ^{O}C, CAPACITY 300 LITER, 230V, 50-60HZ.	١٤
١	GLASSWARE DRYING CABINET MAX 120 ^{O}C, CAPACITY 300 LITER, 230V, 50-60HZ. 2 YEAR WARRANTY	١٥
١	MANESTY TYPE WATER DISTILLATION UNIT, 230V, 50-60HZ.	١٦
٢	VORTEX MIXER, 230V, 50-60HZ. 2 YEAR WARRANTY, USER MANUAL, INSTALLATION INSTRUCTION MANUAL	١٧
٣	REFRIGERATORS CAPACITY 400 LITER, 230V, 50-60HZ. 2 YEAR WARRANTY, USER MANUAL, INSTALLATION INSTRUCTION MANUAL	١٨

www.oxoid.com

٣	FREEZER CAPACITY 300 LITER. MINIMUM TEMPERATURE – 25 ^{O}C, 230V, 50-60HZ. 2 YEAR WARRANTY	١٩
١	COLONY COUNTER WITH BULB AND MAGNIFIER LENS, 230V, 50-60HZ. USER MANUAL, INSTALLATION INSTRUCTION MANUAL	٢٠
١	BINOCULAR MICROSCOPE, EYE PIECE LENSES X10 OR X15, OBJECTIVES X4, X10,X40, X100, OPERATED WITH TRANSMITTED LIGHT FROM A BULB,INCLUDING CONDENSER INCLUDE TWO EXTRA BULBS, GRATICULE TO BE FIXED ON EYE PIECE, STAGE MICROMETER 230 V 50 – 60 HZ., USER MANUAL, INSTALLATION INSTRUCTIONS, TWO YEAR WARRANTY	٢١
١	PLASTIC PIPETTE BATH EXTERNAL SIPHON INNER BASKETS	٢٢
١	PIPETTE JARS TO BE USED FOR CHROMIC ACID	٢٣
١	GLASS FULLY AUTOMATIC WATER STILL, OUTPUT 4 LITER / HR, ELECTRICAL HEATING WITH OVERHEAT CUT OUT. POWER SUPPLY 230 V 50 – 60 HZ.- - ADDITIONAL HEATING ELEMENT AND GASKET ADDITIONAL HEATING VESSEL	٢٤
١	PH METER WORKING RANGE 0-14 WITH TEMPERATURE CONTROL AND ELECTRODES, 230V, 50-60HZ., USER MANUAL, INSTALLATION INSTRUCTION MANUAL 2 YEAR WARRANTY	٢٥
	EXTRA PH ELECTRODE	٢٦
علبه من كل نوع	BUFFER SACHETS PH 4, 7 AND 9	٢٧

www.oxpdf.com

١	MANIFOLD FILTER HOLDERS TO HOLD MEMBRANES OF SIZE 47 MM, THREE HOLDER UNIT FOR FILTRATION UNDER SUCTION WITH CONTROL VALUES TO USE EACH PORT INDEPENDENTLY. SULPHONATED NALGENE OR SIMILAR MATERIAL, AUTOCLAVABLE AT 15 PSI FOR 30 MINUTES.	٢٨
٤ عبوات بكل واحدة ٤ وحدات	POLYSULPHONE FILTER FUNNELS (AUTOCLAVABLE) WITH CLAMPS INCLUDING CAP, SILICONE GASKET, NO.8 RUBBER STOPPER AND ALUMINIUM CLAMPS TO HOLD 47 MM MEMBRANE WITH UPPER RESERVOIR CAPACITY OF 250 ML	٢٩
١	MEMBRANE FILTERS FOR THE FILTER FLASKS 45 NM, USER MANUAL, INSTALLATION INSTRUCTION MANUAL 2 YEAR WARRANTY	٣٠
١	CALIBRATION THERMOMETERS 0-50 ^{O}C, WITH CALIBRATION CERTIFICATE	٣١
١	CALIBRATION THERMOMETERS 100 – 150 ^{O}C, WITH CALIBRATION CERTIFICATE	٣٢
١	EPPENDORF TYPE PIPETTOR ADJUSTABLE MAXIMUM CAPACITY 1000 ML, USER MANUAL, 2 YEAR WARRANTY	٣٣
5 boxes	AUTOCLAVABLE PIPETTE TIPS FOR 1000 ML PIPETTOR	٣٤
١	EPPENDORF TYPE PIPETTOR ADJUSTABLE MAXIMUM CAPACITY 10 ML, USER MANUAL, 2 YEAR WARRANTY	٣٥
2 boxes	AUTOCLAVABLE PIPETTE TIPS FOR THE 10 ML EPPENDORF TYPE PIPETTOR	٣٦
١	MEDIA DISPENSER / SYRINGE TO DELIVER 1ML TO 10 ML VOLUMES, WITH	٣٧

www.okpdf.com

	AUTOCLAVABLE DELIVERY TUBES, MANUAL	
٢	WET AND DRY BULB HYGROMETERS	٣٨
١	MAXIMA-MINIMA THERMOMETER	٣٩
١٠	DESICCATORS 250 MM INTERNAL DIAMETER, PLASTIC 3 300 36. [10 NO]	٤٠
٣	ANAEROBIC JARS	٤١
١٠	WIRE BASKETS, AUTOCLAVABLE, 25 CM X 25 CM	٤٢
٢	PLASTIC PIPETTE PUMPS (PI-PUMPS), 2 ML	٤٣
٢	PLASTIC PIPETTE PUMPS (PI-PUMPS), 10 ML	٤٤
٣	TRIPOD STANDS	٤٥
٣	BURNERS TO BE USED WITH LIQUID PETROLEUM GAS	٤٦
١٠	WIRE GAUZE WITH ASBESTOS SHEET FOR TRIPOD STANDS	٤٧
١	GLOVES (HEAT RESISTANT), FOR USE WITH AUTOCLAVE	٤٨
٣	THERMOMETERS 0 TO 100 ^{O}C, DIVISIONS 0.1^{O}C	٤٩
٦	THERMOMETERS 0 TO 100 °C, DIVISIONS 1°C	٥٠
٣	THERMOMETERS 100 – 300 OC	٥١
١٠	STAINLESS STEEL SPATULA, FLAT ENDS 200 MM	٥٢
١٠	STAINLESS STEEL SCISSORS, 300 MM	٥٣
١٠	STAINLESS STEEL FORCEPS, 200 MM	٥٤
٥	TEST TUBE RACKS STAINLESS STEEL FOR 16 MM X 1/50 TUBES (10 X 4 HOLES)	٥٥
١٠	PETRIDISH STERILIZING CANS, ALUMINIUM (102 OUTER DIAMETER)	٥٦
١٠	PIPETTE STERILIZING CANS, ALUMINIUM	٥٧
١٠	TEST TUBE RACKS STAINLESS STEEL FOR 16 MM	٥٨

www.oxoid.com

	X 1/50 TUBES (12 X 10 HOLES)	
١	HAND LENS 100 MM DIAMETER (MAGNIFYING GLASS)	٥٩
٣	HANDLES FOR INOCULATING LOOPS FOR MICROBIOLOGICAL USE, METAL	٦٠
١	NICKEL CHROMIUM WIRE TO MAKE INOCULATING LOOPS 1 METRE LENGTH	٦١
٢	PLASTIC CORROSION-RESISTANT FILTER PUMP TO CREATE VACUUM USING WATER TAP CONNECTION (WATER JET PUMP), CONNECTION SUITABLE 7 MM INTERNAL DIAMETER TUBING AND WATER INLET CONNECTION 10 MM BORE PLASTIC CORROSION-RESISTANT FILTER PUMP TO CREATE VACUUM USING WATER TAP CONNECTION (WATER JET PUMP), CONNECTION SUITABLE 7 MM INTERNAL DIAMETER TUBING AND WATER INLET CONNECTION 10 MM BORE.	٦٢
٣	SAFETY GOGGLES, CLEAR PLASTIC	٦٣
٢	HAEMOCYTOMETER	٦٤
١	TABLE LAMP (ANGLE POISE)	٦٥
٥	ENAMEL TRAYS 200 MM X 300 MM	٦٦
١	TIMER WITH ALARM	٦٧
١	DISSECTING SET	٦٨

www.oxpal.com

ملحق٤

بعض الادوات المقترحه لمعمل ميكروبيولوجى الأغذية

مسلسل	الأدوات	الكمية
١	Test tubes without rim borosilicate, 20 X 150 mm	٥٠٠
٢	Autoclavable caps for above test tubes	٥٠٠
٣	Test tubes without rim borosilicate, 16 X 150 mm	٥٠٠
٤	Autoclavable caps for above test tubes	٥٠٠
٥	Test tubes without rim borosilicate, 12 X 150 mm	٥٠٠
٦	Autoclavable caps for above test tubes	٥٠٠
٧	Burette borosilicate 50 ml	٢
٨	Burette stands	٢
٩	Measuring cylinders graduated, 10 ml	١٠
١٠	Measuring cylinders graduated, 100ml	١٠
١١	Measuring cylinders graduated, 500 ml	٥
١٢	Measuring cylinders graduated, 1000 ml	٥
١٣	Petridishes, 15 X 90 mm borosilicate	١٠٠٠
١٤	McCartney bottles, 28 ml 16.	٢٠٠
١٥	Universal bottles, 28 ml	٢٠٠
١٦	Funnels glass, diameter 100 mm, stem 50 mm	٤

www.oxpdf.com

٤	Buchner flasks, 1 liter	١٧
٣	Beakers, borosilicate / Pyrex, 1000 ml	١٨١٩
١٠	Beakers, borosilicate / Pyrex, 500 ml	٢٠
١٠	Beakers, borosilicate / Pyrex, 250 ml	٢١
٤	Beakers, borosilicate / Pyrex, 2000 ml	٢٢
١٠	Conical flasks (Erlenmeyer), Pyrex 100 ml	٢٣
١٠	Conical flasks (Erlenmeyer), Pyrex 500 ml	٢٤
٥	Conical flasks (Erlenmeyer), Pyrex 1000 ml	٢٥
٥	Conical flasks (Erlenmeyer), Pyrex 2000 ml	٢٦
١٠	Volumetric flasks, Grade A, 100 ml	٢٧
٥	Volumetric flasks, Grade A, 250 ml	٢٨
٥	Volumetric flasks, Grade A, 500 ml	٢٩
١٠٠	Pipettes, 1ml with 0.1 ml graduations – Grade A	٣٠
٥٠	Pipettes, 2 ml with 0.1 ml graduations – Grade A	٣١
٢٠	Pipettes, 5 ml with 0.5 graduations – Grade A	٣٢
٢٠	Pipettes, 10 ml with 1 ml graduations – Grade A	٣٣
٢٠	Glass bottles with polypropylene (autoclavable) screw caps, 500 ml	٣٤
٣٠	Glass bottles with polypropylene (autoclavable) screw caps, 1000 ml	٣٥
١٠	Glass bottles with polypropylene (autoclavable) screw caps, 2000 ml	٣٦

www.0zpdf.com

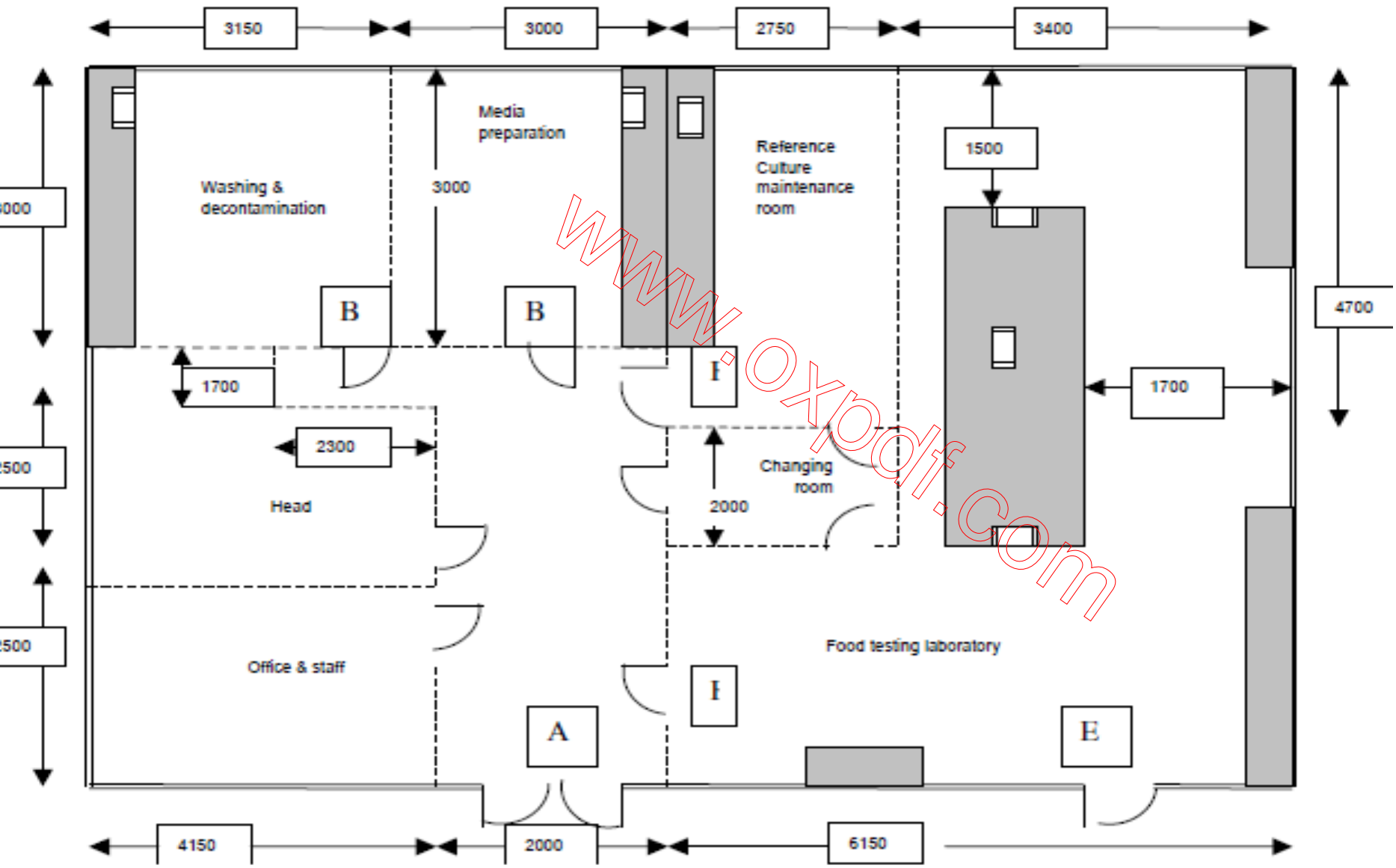
٥٠٠	Durham tubes 50 X 7.5 mm 500	٣٧
50	DRIGALISKY SPATULA GLASS	٣٨
٢ كيلوجرام	Cotton wool – non absorbent	٣٩
٥ علب	Weighing boats, plastic 1 ¾	٤٠
٥ علب	Weighing boats, plastic 3 5/16	٤١
١٠	Brushes for bottle washing 40 cm	٤٢

www.oxpdf.com

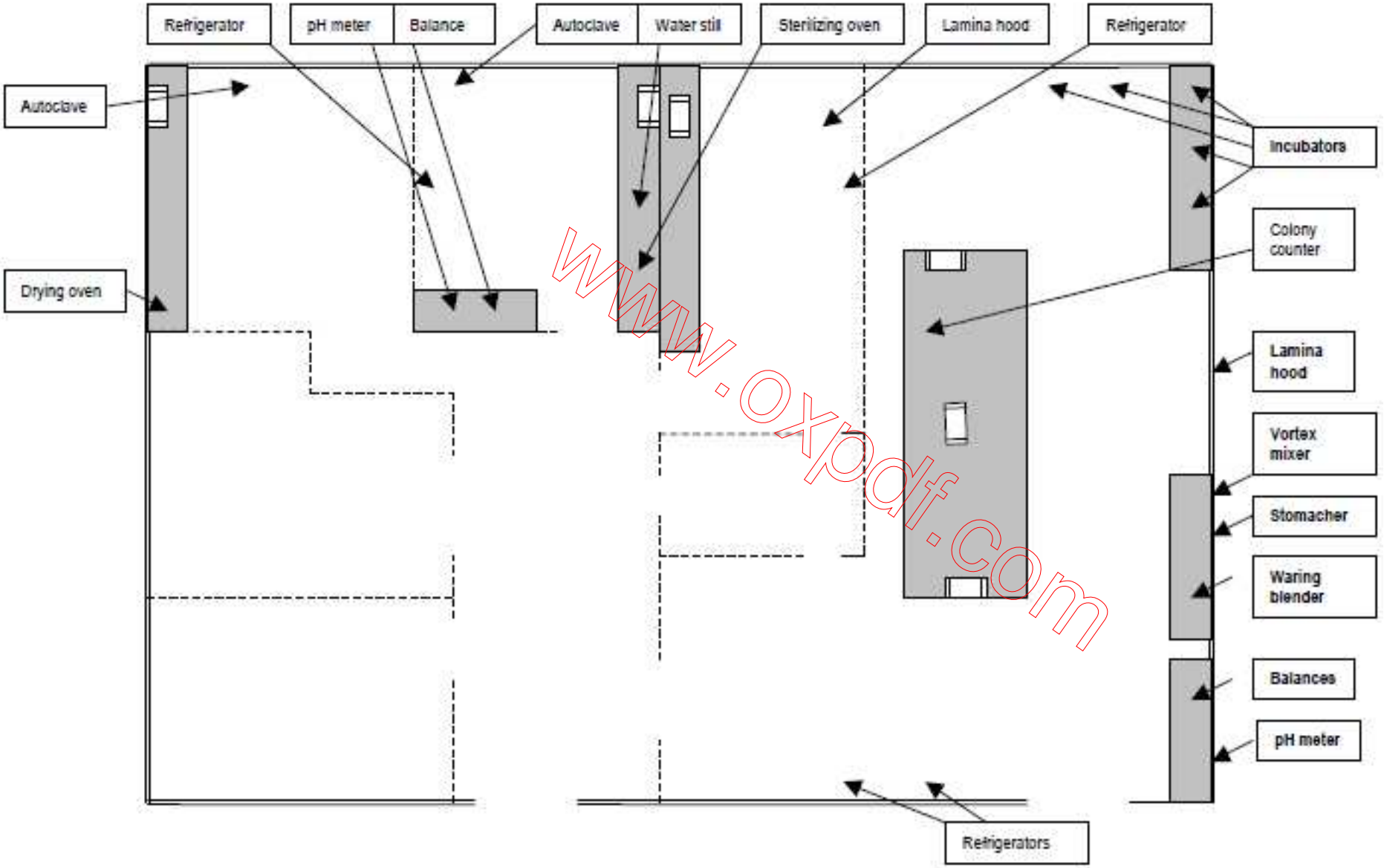
ملحق ٥

شكل تخطيطى لمقترح لترتيب معمل صغير للتحليل الميكروبيولوجى للأغذية وتوزيع الأجهزة به

www.OXpdf.com



www.oxpdf.com



www.oxpdf.com

مراجع مختارة

Adams M.R. and M.O. Moss (2010) Food Microbiology , Second Edition. The Royal Society of Chemistry, Thomas Graham House, Science Park, Milton Road, Cambridge CB4 OWF, UK

Blackburn, Clive de W. and Peter J. McClure(2002) Foodborne pathogens Hazards, risk analysis and control. CRC Press LLC Boca Raton , USA

Bosch , Albert ; Gloria Sánchez, Morteza Abbaszadegan, Annalaura Carducci, Susana Guix, Françoise S. Le Guyader, Rembuluwani Netshikweta, Rosa M. Pintó, Wim H. M. van der Poel, Saskia Rutjes, Daisuke Sano, Maureen B. Taylor, Walda B. van Zyl, David Rodríguez-Lázaro, Katarina Kovač and Jane Sellwood. Analytical Methods for Virus Detection in Water and Food * Food Analytical Methods 4: 4-12

Butot , S., T. Putallaz, and G. Sa´nchez (2007)Procedure for Rapid Concentration and Detection of Enteric Viruses from Berries and Vegetables. Appl. Eviron. Microbiol. 73:186–192

Dijksterhuis, Jan and Robert A. Samson (2007)Food Mycology : A Multifaceted Approach to Fungi and Food. CRC Press , Taylor & Francis Group , Boca Raton, Forida, USA.

Emons Hendrik, Andrea Held, and Franz Ulberth(2006) Reference materials as crucial tools for quality assurance and control in food analysis Pure Appl. Chem., 78:135–143

Goyal , Sagar M. (2006) VIRUSES IN FOODS. Springer ,New York.

ICMSF (2005) Microbiology of Foods 6: Microbial Ecology of Food Commodities second edition Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York.

Levin R. E (2010) Rapid Detection and Characterization of Foodborne Pathogens by Molecular Techniques CRC Press , Taylor & Francis Group , Boca Raton, Forida, USA.

Lightfoot , N.F. and E.A. Maier (1998) Microbiological Analysis of Food and Water: Guidelines for Quality Assurance . ELSEVIER , London , New York.

Nollet , Leo M.L. and Fidel Toldra (2010) Handbook of dairy food analysis. CRC Press , Taylor & Francis Group , Boca Raton, Forida, USA.

Riemann, Hans P. and Dean O. Cliver (2006) Foodborne Infections and Intoxications Third Edition. Academic Press, London , New York ,USA

The Health and Consumers Directorate-General of the European Commission manages the Rapid(2010) Alert System for food and Feed (RASFF).The Rapid Alert System for Food and Feed (RASFF) Annual Report2009 . http://ec.europa.eu/RASFF

World Health Organization.(WHO) (2004) Laboratory biosafety manual. – 3rd ed.

www.oxpdf.com