

Figure 4-11 Brock Biology of Microorganisms 11e  
© 2006 Pearson Prentice Hall, Inc.

Traditional counting methods: *کیف عمل کاؤنٹنگ*

سلايه (9)

- Agar : Solid nutrient media
- Broth : Liquid nutrient media

\* بنوخه 1ml من العينة الاصلية وبنخلها على 9 ml من broth بصيرى dilution  $\leftarrow 1/10$  بعرك ال tube منح و اخذ منه 1m و بنخله برينو على 9ml broth  
 بصيرى dilution  $\leftarrow 1/100$  وهكذا ، بنسبه (tenfold increments dilution)

\* كل وحدة من جدول ال tubes باخذ 1ml و بزرها على Agar و بعلاها incubation  
 و بب نخله فتره ال incubation باعين بشوف ال Colonies و بعد هم ، بهاد مثال  
 اول تنين كانوا عدد هم كبير [too many Colonies to count]

- بفتار 159 كتر اهدر Colony لانها ضمن range (25 - 250)

$$159 \times 10^3 = 1.59 \times 10^5 \text{ CFU/1mL}$$

$\leftarrow$  اصلنا 1ml من ال sample  
 $\leftarrow$  بعضين قد به عنا Colony in the original sample  
 $\leftarrow$  dilution factor  
 $\leftarrow$  plate count

## Traditional counting methods:

---

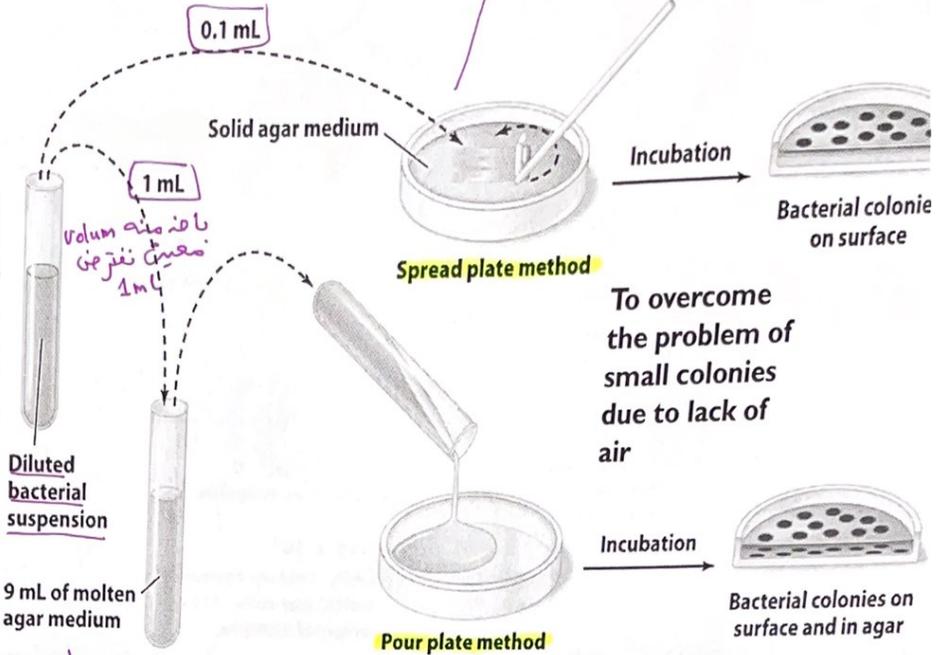
کیف عمل Counting

1. Pour plates (most popular)
2. Spread plates
3. Membrane filter method
4. Most probable number method

هون ار agar بكون solid فانا بعمل للعينه spreading  
 على سطح ار agar ، طبعاً هاد الاختلاف يؤدي  
 اي اختلاف طريقة ظهور ال Colony

Sterile glass or plastic "hockey-stick" spreader

Black, *Microbiology: Principles and Explorations*, copyright 2012, John Wiley & Sons, Inc.  
 This material is reproduced with permission of John Wiley & Sons, Inc.



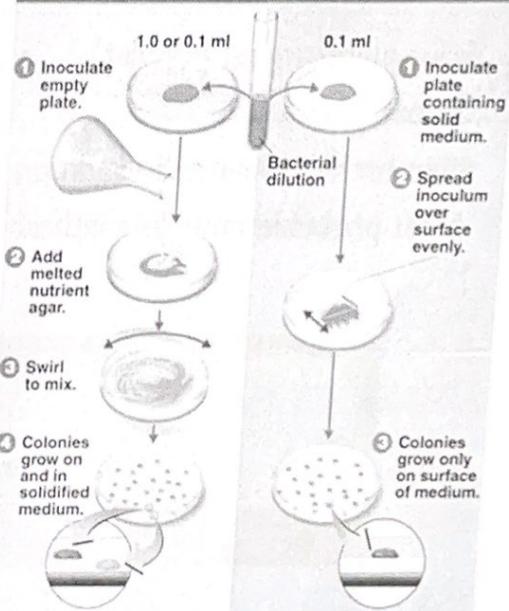
ب. بجهه بار agar قبل plate  
 ما يبر له solidification و  
 هولسا Liquid وبظطهم  
 بعدين بجههم Pouring  
 بار plate بعد ما  
 بعمل incubation وبع تظهن  
 بعد ار Colony [اذأ العينه  
 ما زرعها فوق سطح agar  
 رها خلطتها بار agar]

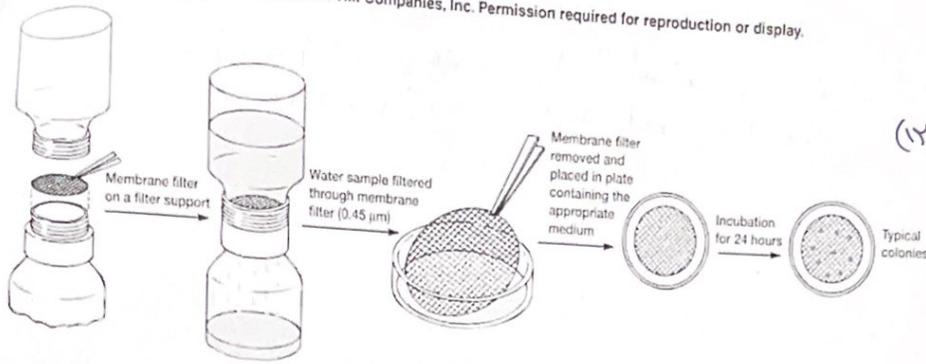
spread = تظهر على السطح  
 pour = جز من ال Colony راج يكون عايتا بصت  
 ما راج اقدر آشوفه  
 [طبعاً كل شئ لازم يكون sterial بالطريقين]

Plating serial dilutions of the specimen

- Pour plate method
- Spread plate method

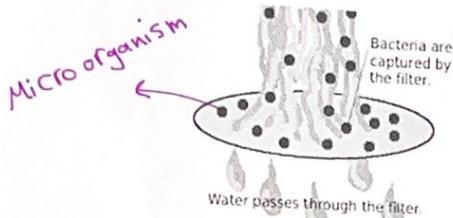
(a) The pour plate method (b) The spread plate method





الدي (١٢)

- The sample (e.g. 100 ml of water) is passed under vacuum through a sterile filter membrane with pore size that is small to retain all contaminating MO on its surface (usually 0.45 µm)



\* Membrane filter method :- يحتاجها ما يكون عندي عينة كبيرة، مثلاً لوبي- استوف بـ 100 ml قديه عينا M.O ما بقدر ازرع 100 ml على سطح agar

\* بصيت العينة بي دننا نفسها مثلاً 100 ml of water على agar filtration under vacuum through a sterile filter membrane

\* شهاد ال membrane size تكون صغيرة 0.45 µm، من لا يسمح للـ M.O انهاء على بس اعمى لازم تغترق حاد الفلتر وبعين على سطحه الـ M.O باخذ هاد الفلتر بالملقط ويزرع على agar plate وبعين incubation وبتوف عدد الـ M.O (هيلع يكون طلعته قديه عندي M.O بعاي العينة الكبيرة بي دننا 100 ml of water)

## Membrane filter method

### Advantages:

- For low bioburden material like Purified water EP → required to have no more than 100 CFU/ml
- Can be used to determine concentration of organisms in oils or ointments (after dispersing it in oil)
- The best method if the sample is likely to contain antimicrobial chemicals (preservatives)

→ European pharmacopia

\* low bioburden : عيبتها الجيوي قليل جداً يعني كمية M.O قليلة بالتالي يحتاج عينة كبيرة ممثلة لـ sample من نقدر نشف الـ M.O

## سلايد (14) (Membrane filter method)

\* كما يمكن استخدامها في حالة (طما) هاد األ عنده قدرة يعمر من خلال (filter) -  
لوعندي مثلًا ointment solid بروج بزوبه بار ايه بعدين بعمله filtration

\* كما بقدر أستفيد منها في حالة sample تا عمري بختوي على antimicrobial  
(preservative) ، في حال كانت عينة بختوي على preservative  
chemicals

خلال فترة incubation راج يكون preservative شغل عم يقبل M.O لانه بالنهاية agar  
طرح يطالع total viable count الكيفي ل M.O ، membrane filter method

تأثير preservative على العينة ، كيف في لانه preservative ذائب في اوس وراج ينزل من خلال  
الفتحات وبين راج يصل على ال membrane filter هو M.O فقط

\* هذا لا يعني اذا استخدمت spread or pour method انوما عندي طريقة انتقاله من تأثير  
اعادة الحافظة ، [inactivation: أثبط عمله من لوجود بالعينة] ، بس بديكون

عارف ستو (preservative) الموجود حتى تقدر تضار inactivator ، المناسب

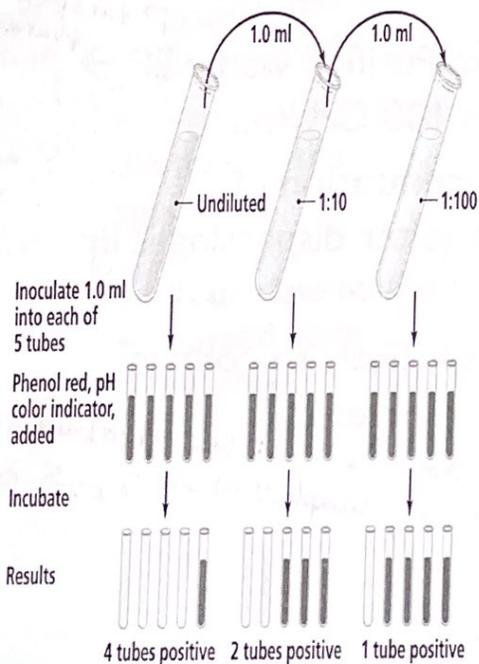
طريقة اخرى لاجالة مفعول "antimicrobial chemical" نعرف نوعه ونفظ عليه inactivator مناسب قبل ال bioburden test حتى يلغى مفعول المادة الحافظة

Antimicrobial agent	inactivator
Quaternary ammonium compounds, parabens and chlorhexidine	Lecithin with or without Polysorbate (Tween) 80
Thimerosal and other mercurials	Sodium thioglycolate
Beta-Lactam antibiotics	Beta-lactamase
Phenols, alcohols and weak acid preservatives	Dilution alone

مفظ

most probable number

MPN is used when the sample contains insoluble material that would interfere with plate counts as in herbal products



Copyright © 2002 Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings.

## INDIRECT MEASUREMENTS: MPN

- Multiple Tube Fermentation Test as measured in MPN or Most probable Number
- Count positive tubes and compare to statistical MPN table.

Combination of Positives	MPN Index/ 100 ml	95% Confidence Limits	
		Lower	Upper
4-2-0	22	9	56
4-2-1	26	12	65
4-3-0	27	12	67
4-3-1	33	15	77
4-4-0	34	16	80
5-0-0	23	9	86
5-0-1	30	10	110
5-0-2	40	20	140
5-1-0	30	10	120
5-1-1	50	20	150
5-1-2	60	30	180
5-2-0	50	20	170
5-2-1	70	30	210
5-2-2	90	40	250
5-3-0	80	30	250
5-3-1	110	40	300
5-3-2	140	60	360

Parungao-Balolong 2011

Thursday, July 12, 2011



سلايد (16)

\* الطريقة الرابعة: (MPN) most probable number  
 متادائماً يستخدمها، يستخدمها في حالات قليلة ما يكون فيها  
 مواد غير ذائبة، مثلاً بودرة نباتية وبننا نحدد <sup>منه عينه</sup> viable count، لما نخطها  
 بالكي مارح تنوب ولما نزرعها على plate برضوا الأجزاء غير الذائبة راح تنقل  
 موجودة وراح تعيق عملية نمو البكتيريا + عملية Counting، بهاي الحالة  
 يستخدم هاي الطريقة، MPN تعتمد على Statistic: هنا جداول  
 إحصائية وهاي الجداول معمولة بأملوب انه لو قلنا experiment بناخد على  
 combination المطلوب ولطعت النتيجة (x) فنشو ممكن يطلع عندي  
 MPN of sample or Colony

\* indirect measurements، الفرق بين قبل بنعتبرهم direct measurement  
 \* الخطوات :-

- باخذ العينات تاتر سوا عملت لهم dilution أو لا، بزرج  
 كل وحدة بـ 5 test tubes، كل tube يصوي على broth + indicator (color) [نضو البكتيريا  
 تغير من ال PH]، وبنعمل incubation ثم بنشوف النتائج

- Combination بين طلع 1-2-4، بزرج على الجبرول وبنشوف  
 4 21 بطلع ← 26  
 MPN  
 100 ml ← انتبه عليها

\* suspension مثلاً ممكن نستخدم هاي الطريقة اذا صبيات suspension بنقل الحاقبة  
 للقرادة

ط  
ن

## Calculation of concentration of MOs in a sample

Table 15.3 Specimen results from a viable count.

بنقل ۲ محاولات (بنقل ۳ مرات)

Dilution	Dilution factor	Colony count 1	Colony count 2	Colony count 3
A	10 <sup>1</sup>	TNTC <sup>d</sup>	TNTC	TNTC
B	10 <sup>2</sup>	TNTC	TNTC	TNTC
C	10 <sup>3</sup>	453	521	419
D	10 <sup>4</sup>	85	79	81
E	10 <sup>5</sup>	7	6	8
F	10 <sup>6</sup>	0	1	0

<sup>d</sup>TNTC = too numerous to count

**Viable count of original sample =**

بنقل ۲ محاولات و بنقل ۳ مرات (۳) مرات و بنقل (۳) مرات و بنقل (۳) مرات و بنقل (۳) مرات

Mean colony count

avg (المتوسط)

Volume of dilution used

× dilution factor

(10<sup>4</sup>)

بنقل ۲ محاولات  
for determination  
لأنها المقبولة

$$\left[ \frac{85 + 79 + 81}{3} \right] \times 1 \text{ mL}$$

USP Rang (25 - 250)

سلايه (18)

الفرق بين قبل كانت لتحديد number وهذا  
بناحدد type

number  
type  
\* يمكننا انه Bioburden

# Detection of objectionable MOs

العدد ١٨

دetection بالعربية  
بالsterial  
لانه من لازم يكون فيه ولا أي نوع م.و

- ▶ Non sterile dosage forms may contain some MOs
- ▶ The quality of non sterile products is controlled by pharmacopeia in two ways:
  1. Limit on total number or concentration of MO that may be present

Salmonella

به ما حجم اكثر لانه عدد ها كثر قليل فيدي sample اكبر

2. Particular objectionable organisms must be absent in a specified weight of material:

مع بحدولك الوزنة يبي لازم توضعها

E. coli

سهل كشفها لانها منتشرة وممكن نلقاها ب 1g

e.g. EP quality gelatin → Salmonella should be absent in a 10g sample and E.coli absent in 1g sample

\* 1 من ديت بجيب quality المطلوبة؟ من pharmacopia بتعطيك  
\* 2 متواللي بحد أنا مت لازم افحص E. coli ولا salmonella

من سوا origin تبع sample، مثلاً gelatin ما يبي من مصدر حيواني ولا غيرهم؟ الفارماكوبيا محددة بتنتقلو لل gelatin، فإنا ما بندرس كل objectionable م.و  
gut of animal أو feces ممكن يكون فيه salmonella/E. coli فهاد راج بتنتقل مع بندرس يبي بتكون محددة بالفارماكوبيا

## Detection of objectionable MOs

---

1. Dissolution or dispersal of the sample in a suitable liquid culture medium and, where necessary, inactivation of any substances that might inhibit the growth of the organism under test
2. Enrichment: increasing the relative concentration of the test organism by growing in a liquid medium that inhibits other contaminants but allows free multiplication of the organism of interest
3. Streaking liquid cultures from step 2 onto selective agar media that usually permit easy recognition of any colonies of the test organism that might arise
4. The use of specific biochemical or immunological confirmatory tests (test kits)

سلايه (١٩)

\* زي م جينا عملية Counting إليها procedures معينة وهون بار detection برينو  
عنا طريقة عامة، dissolution or dispersal: ممكن تذوب أو ما تذوب العينة  
(زي م قلنا أمياتنا العينة يكون فيها preservative لازم نعمله inactivation)

Enrichment: معناها تكثير أو زيادة ك الثقافة media تبعتر لازم نعزيز نمو  
الخلية اللي بيها وتبسط نواي شي آخر ممكن يتأخر M.O (بي بيها اياه)  
من العينة أو يقل فرصة ظهورها ك وما بهمني العدد مثلاً

one salmonella colony  
كأغنية إني أكتشف العينة

سلايد (١٩)

② streaking = selective agar media , يعني مثل اي agar plate , انما selective one  
بتحيش M.O بين بي اياه وبتقل من other M.O وكان بتطلع M.O بين بي  
اياه بلون معين واضح ، احياناً ممكن اشوف Colony واحد شايّة  
بنجلاها specific عشان نتأكد  
test

- الهدف منه اني افضل ال Colony , اول ما اخل streaking يكون كيات  
كبيرة من Colony وبعدين زي كاني بسحب سوي وبعجل streaking زي كاني بخفف  
لأوهل لمرحلة انه عندي single Colony تكون واضحة بعيني شكلها ولونها عشان  
اعرف أهددها

هاد الايسر بيروبي اسوفه ، ظهر آخره بعد م صنفنت

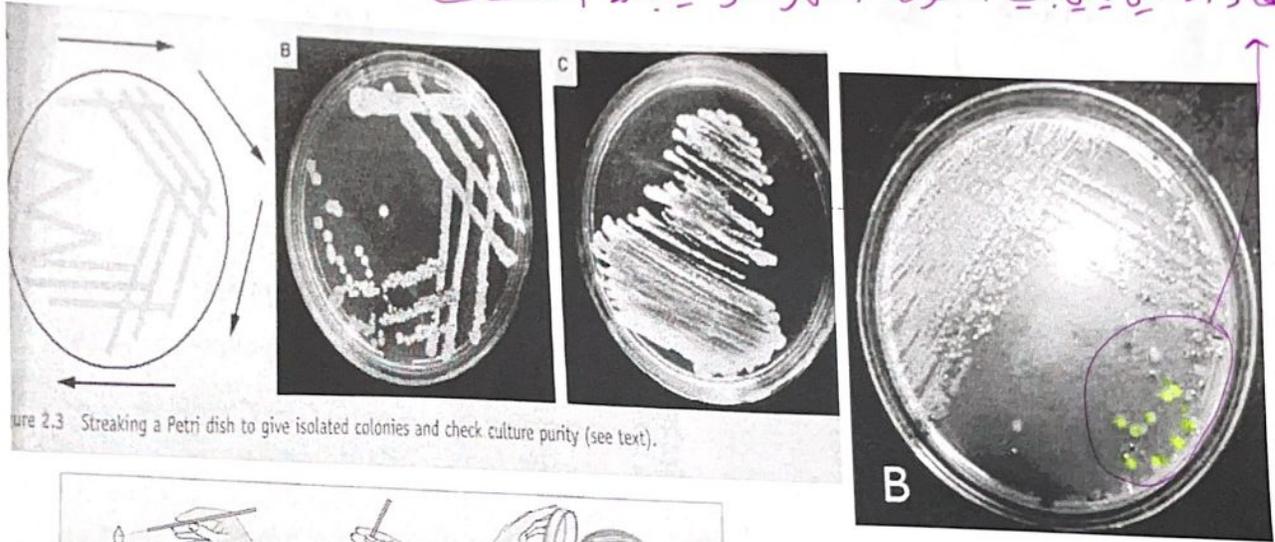
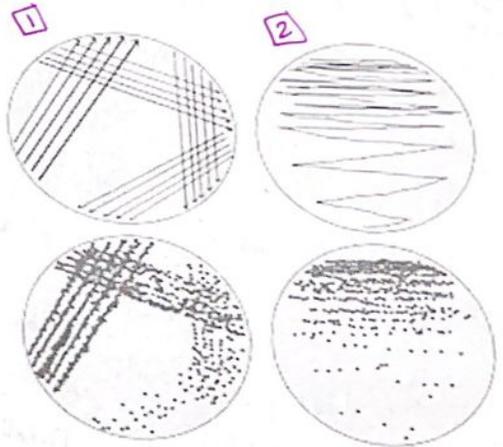
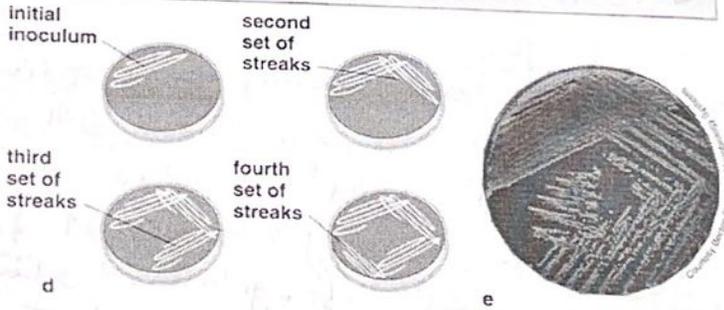
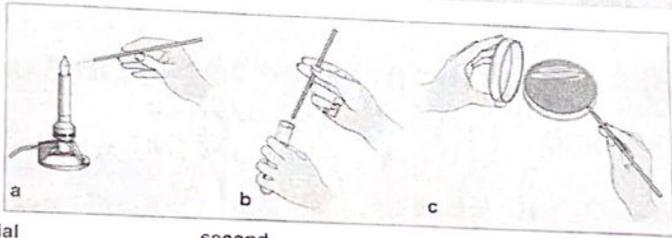


Figure 2.3 Streaking a Petri dish to give isolated colonies and check culture purity (see text).



# Detection of objectionable MOs

▶ Selective agar media recommended in the pharmacopeias:

الانتخاب  
بين  
المتعضيات  
الضارة  
التي  
تتكون  
من  
الطعام  
المتبقى  
او  
الاجزاء  
المتبقية  
من  
الادوية

▶ MacConkey's agar for *E. coli*

▶ XLD agar for *Salmonella* species

▶ Mannitol salt agar for *Staphylococcus aureus*

▶ Cetrimide agar for *Pseudomonas aeruginosa*

Students are required to read about each type of agar mentioned

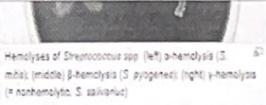
W Agar plate - Wikipedia, the ...

appearance of objectionable microorganism on selective media

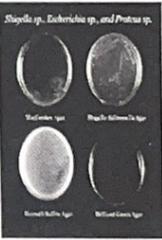
Dr. Hamed

### General bacterial media [edit]

- Bile esculin agar (BEA)**  
BEA is used for the isolation of *Enterococcus*, as well as Group D *Streptococcus* species
- CLED agar**  
Cysteine, lactose, electrolyte-deficient agar (CLED) agar is used to isolate and differentiate urinary tract bacteria, since it inhibits *Proteus* species swarming and can differentiate between lactose fermenters and nonfermenters
- Granada medium**  
Granada medium is used to isolate and differentiate Group B streptococcus (GBS), *Streptococcus agalactiae* from clinical samples. GBS grows in granada medium as red colonies and most of accompanying bacteria are inhibited
- Hektoen enteric agar (HEA)**  
HE agar is designed to isolate and recover fecal bacteria belonging to the Enterobacteriaceae family. It is particularly useful in isolating *Salmonella* and *Shigella*.
- Lysogeny broth (LB)**
- MacConkey agar (MAC)**  
MAC is a selective and differential medium used to differentiate between Gram-negative bacteria while inhibiting the growth of Gram-positive bacteria. The addition of bile salts and crystal violet to the agar inhibits the growth of most Gram-positive bacteria, making MacConkey agar selective. Lactose and neutral red are added to differentiate the lactose fermenters, which form pink colonies, from lactose nonfermenters that form clear colonies. An alternative medium, eosin methylene blue (EMB) serves a similar purpose.
- Mannitol salt agar (MSA)**  
MSA is also a selective and differential medium. The mannitol indicates organisms that ferment mannitol; mannitol fermentation produces lactic acid, lowering the pH and turning the plate yellow. The salt is to select for halophiles; organisms that cannot withstand a high salt content are unable to grow well.
- Mueller-Hinton agar (MHA)**  
MHA contains beef infusion, peptone, and starch, and is used primarily for antibiotic susceptibility testing. It can be in a form of blood agar.
- Nutrient agar**  
Nutrient agar is usually used for growth of nonfastidious organisms and observation of pigment production. It is safe to use in school science laboratories because it does not selectively grow pathogenic bacteria.
- Onoz agar**  
Onoz agar allows more rapid bacteriological diagnosis, as *Salmonella* and *Shigella* colonies can be clearly and reliably differentiated from other Enterobacteriaceae. The yields of *Salmonella* from stool samples obtained, when using this medium, are higher than those obtained with LEIFSON agar or *Salmonella-Shigella* agar (SSA).
- Phenylethyl alcohol agar (PEA)**  
PEA selects for *Staphylococcus* species while inhibiting Gram-negative bacilli (e.g., *Escherichia coli*, *Shigella*, *Proteus*, etc.).

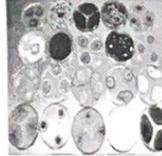


Hemolyses of *Streptococcus* spp. (left)  $\alpha$ -hemolysis (*S. mitis*), (middle)  $\beta$ -hemolysis (*S. pyogenes*), (right)  $\gamma$ -hemolysis (nonhemolytic, *S. salivarius*)



Shigella sp., Escherichia sp., and Proteus sp.  
Shigella agar, E. coli agar, Proteus agar, Salmonella agar

Four types of agar plate demonstrating differential growth depending on bacterial metabolism



Fungi (Ascomycetes) growing in yeast extract agar

## Detection of objectionable MOs

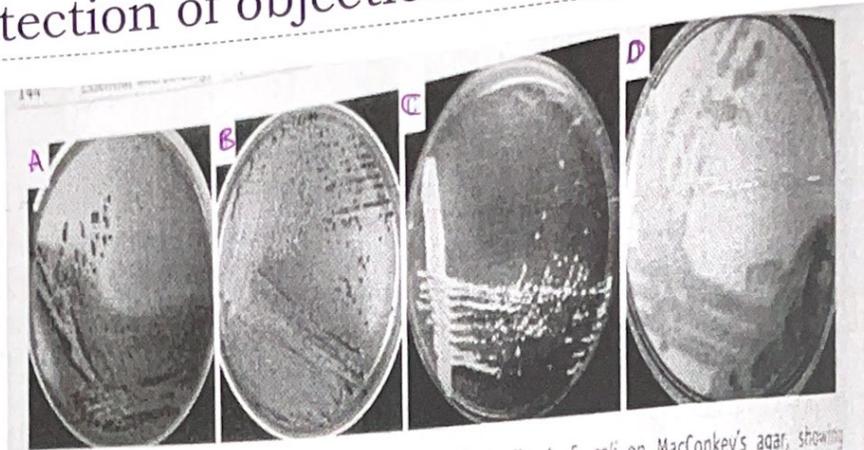


Figure 15.6 The appearance of 'objectionable organisms' on selective media. A. *E. coli* on MacConkey's agar, showing characteristic red colonies and precipitation of bile as a result of acid production; B. *Salmonella* species on XLD agar, showing alkali and hydrogen sulphide production indicated by pink agar and black precipitate in the colonies respectively; C. *Staphylococcus aureus* on mannitol salt agar showing yellow colonies that have produced acid as a result of mannitol fermentation; D. *Pseudomonas aeruginosa* on cetrimide agar, showing the characteristic green pigmentation.

\* الصورة بتوضح كل agar لما بيظهر عليه بكتيريا معينة كيف بطلع اللون

## Automated bioburden determinations

- ▶ Bases of the methods
- ▶ Limited application
- ▶ Look for pg 144

\* ما كان كانت الـ techniques لما بيستخدمها بيوتها حارنا أجهزة ،  
(Automated)

one of the most  
microbiological test

= Bioburden determination

Sample at different production stages  
raw material  
final products

# Bioburden specifications in the pharmacopeias

Table 15.4 Quality criteria for nonsterile medicines.

Route of administration <sup>a</sup>	Maximum total aerobic microbial count CFU/g or ml	Maximum total yeast and mould count CFU/g or ml	Specified microorganisms absent in 1 g or 1 ml
Nonaqueous <u>oral</u> products	10 <sup>3</sup>	10 <sup>2</sup>	Absence of <u>E. coli</u>
Aqueous <u>oral</u> products	10 <sup>2</sup>	10 <sup>1</sup>	Absence of <u>E. coli</u>
Rectal products	10 <sup>3</sup>	10 <sup>2</sup>	Absence of <u>E. coli</u>
Oral mucosal, gingival, cutaneous, nasal and ear products	10 <sup>2</sup>	10 <sup>1</sup>	Absence of <i>Staph. aureus</i> and <i>Ps. aeruginosa</i>
Vaginal products	10 <sup>2</sup>	10 <sup>1</sup>	Absence of <i>Staph. aureus</i> , <i>Ps. aeruginosa</i> and <i>Candida albicans</i>
Inhalation products (excluding nebulized liquids)	10 <sup>2</sup>	10 <sup>1</sup>	Absence of <i>Staph. aureus</i> , <i>Ps. aeruginosa</i> and bile-tolerant Gram <sup>-ve</sup> bacteria

← یعنی ان لا تتجاوزها في الأرقام

← ما يغيره فعل على GI

\* بنسبة عدد 10.0 المسموع توأجرها بال aqueous أقل من ال non aqueous لأن الوسط ال aqueous يسمح بنمو ال 10.0 بصورة أسرع وبالتالي، مع الزمن بشكل أكبر ← يؤدي إلى تلف المنتج ← عشان هيك بنحدد ما جدد أقل

Sara Jammain



**Artery Academy**