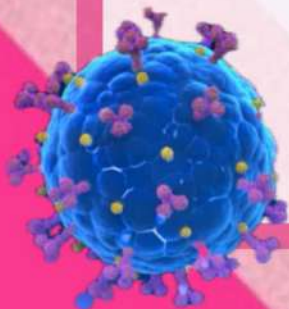




# MICROBIOLOGY LAB

Lecture : 2

Done by : Dana Khalaf





بأي infectious disease اول شي يعملو هو اني اخذ sample لحتى الاقي  
microorganism ولحتى اشخصه لازم اشوفه فلانم اول شي ينمو ويعطيني مستعمرات  
لأشوفو بالعين المجردة.  
لحتى اعمل culture لازم اوفر environment, nutrition مناسبة(حرارة، اكسجين)

## Lab 2 Bacterial culture



### Introduction

Laboratory diagnosis of infectious diseases can be accomplished by a series of procedures which are:

- Specimen collection.
- Microscopic examination.
- **Culture and isolation of the organism in pure form.**
- Biochemical tests.
- Serological tests.
- Molecular identification.
- Antibiotic sensitivity.





## Bacterial culture :

A method that allows the multiplication of bacterial cells in or on a culture medium under controlled laboratory conditions.



## Bacteria are grown in the laboratory for the following reasons:

- To isolate them from pathological specimens for identification and diagnosis "Culture of the microorganism is the **Gold Standard** method of diagnosis". → الهدف الرئيسي
- To study their characteristic features. → حتى اعمل بحث عنه
- To determine their antibiotic sensitivity. → حتى اختار drug صحيح
- To prepare antigens, toxins and vaccines → باخذ منه جزء وبعض منه antigen حتى اعمل اختبار بين antigen و antibody

جسم مضاد لل microorganism  
يتكون داخل الجسم

جزء من microorganism

أو بعض vaccines أو toxins [بزرعه وبتحيره كثير حتى يفرز السموم وأخذها أنا]



## Culture media

The nutrient preparation on which microorganism is grown in the laboratory.

A culture medium is essentially composed of basic elements, to which added different growth factors that will be specific to each bacterium and necessary for their growth.



بعد ما اضيف المكونات الرئيسية ممكن اضيف مكونات خاصة بكل organism حسب ما بحب (blood, eggs, serum, antibiotic)

### Main components of culture media:

- Water
- Peptone
- Meat extract
- Yeast extract
- Mineral salts
- Carbohydrates → energy
- Agar: "Inert polysaccharide from sea weed",



له ولا شئ بالنسبة لـ organism

→ Non-nutritive and not metabolized by microorganism,

It is solidifying agent which dissolves at 90-100°C and solidify at 40°C.

fluid → solid

• مثلا لو بدى اضيف دم بضيفو عند درجة حرارة 50°C لحتى يقدر يتحملها





# Types of Culture Media



## According to physical state:

➤ **Liquid media:** fluid + Agar

Solid

Liquid

Semi - Solid

➤ **Semi-solid media.** بقل Agar

الفرق هو تركيز Agar

➤ **Solid media.** بزود Agar



### A) Liquid media:

➤ **Examples:** Peptone water, <sup>شوربة</sup> Broth, Blood culture bottle.

➤ **Uses:**

- For **biochemical reactions**.
- For **blood culture**.
- To **test large volume of sample** as water. (بالتر)
- As **enrichment media**.
- **Transport media**.



Blood culture bottle



Nutrient broth

بجيب blood و بقطه ع  
fluid media  
organism فيه



بالاول يكون سائل وبعد ما يبرد يتجمد

## B) Solid media:

➤ Contain 1.5-2% agar.

➤ Forms:

▪ Plate "petri dishes".

▪ Slope tubes → مائل

▪ Deep tubes.

➤ Uses:

▪ Isolation of pure colonies. مستعمرات

▪ Description of bacterial colonies:

morphology, pigmentation, hemolysis..

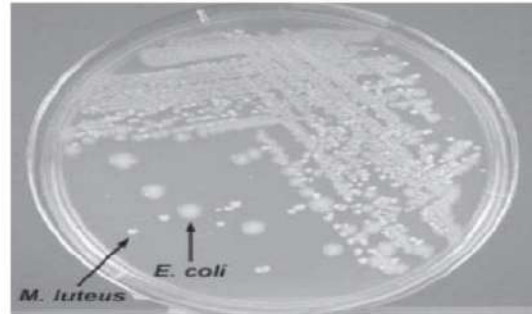
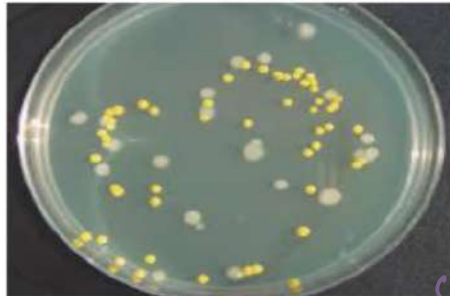
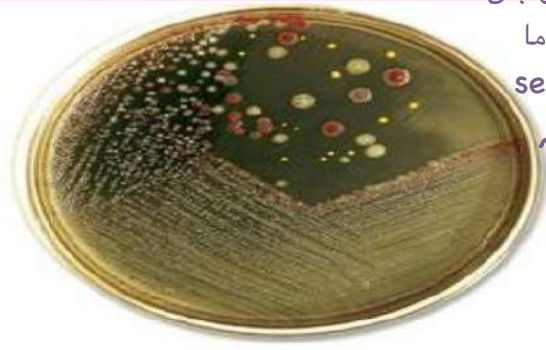


الهدف الاساسي بالتشخيص هو اني افصل pure colonies لانو ممكن تكون العينة بتحتوي على اكثر من نوع organism (حتى اميزهم عن بعض واعرف ادرسههم)

لنوع واحد من Pure colonie  
Organism لانه الهم نفس  
الشكل واللون



هون في ء انواع بس  
بقدر اميز بينهم ما  
دام في separate  
colonie



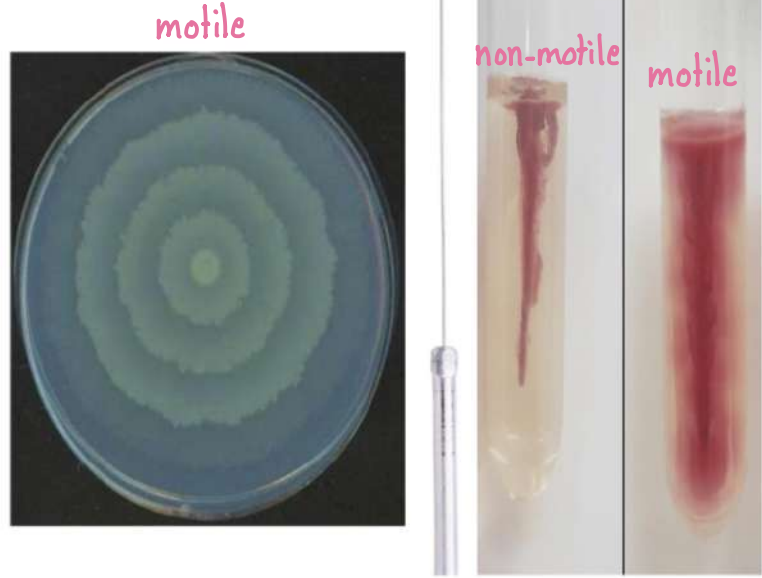
separate colonie هاي برضو

بس فيها نوعين واحد اصفر  
صغير وواحد ابيض كبير



### C) Semi-solid media:

- **Prepared by:** Decreasing agar concentration.
- “Contain 0.5 % agar”
- **Uses:** Motility testing.



ال motility test: بجيب انبوبة فيها semi-solid agar وبعدين باخد جزء من المستعمرة وبزرعها جوا الانبوبة بخط وبطلع.. لو organism: non motile رح يظهر النمو بس ع خط الزرع، اما لو motile رح ينتشر في الانبوبة. ممكن كمان اعمالها على طبق، بزرعها بنص الطبق اللي فيه semi-solid agar، لو non motile بطلع مكان وخلص، اما لو motile ف رح يتحرك بكل الاتجاهات.

#### According to applications: حسب الهدف

- Simple media
- Enriched media
- Selective media
- Differential (Indicator) media
- Enrichment media
- Transport media
- Media for anaerobic cultivation





## Simple Media

➤ **Used for:** بتوفرلي basic nutrients اللي ممكن يحتاجها اي organism بالتالي هي مناسبة لأي organism ما  
إله احتياجات خاصة

▪ Support growth of microorganisms that **do not have special nutritional requirement.**

▪ As a base for other media.

➤ **Examples:**

▪ Peptone water

▪ Nutrient broth

▪ Nutrient agar: broth + agar



**Nutrient agar**

14

## Enriched media

إله احتياجات خاصة : غنية

➤ **Used for:**

Cultivation of fastidious organisms that need **high nutritive** substances for growth e.g. blood, serum or egg.

➤ **Examples:**

▪ Blood agar

▪ Chocolate agar

= (heated blood agar)

▪ Loeffler's serum

▪ Dorset's egg medium



**Blood agar**



**Chocolate agar**

لي سخنت blood 🩸 ؟ في factors ال organism بدو يستفيد منهم (هو ما بدو RBCs  
وبس، لا هو بدو X&B factors جوا RBCs) زي بكتيريا haemophilus





## Selective media

Contain some chemicals, dyes or antibiotic which inhibit the growth of certain organisms & allow the growth of others.

**Examples:** ممكن تكون خاصة بنوع (staph) او بقروب (-gram) حفظ

- Lowenstein-Jensen medium (L.J) (for Mycobacterium tuberculosis).
- Blood tellurite agar (for Diphtheria).
- Thayer-Martin medium (for Neisseria).
- Thiosulphate Citrate Bile Sucrose (TCBS) (for vibrio).
- Mannitol Salt Agar (for staphylococci).
- Salmonella-Shigella Agar.



Lowenstein-Jensen

## Differential or Indicator media

Media that contain certain ingredient or indicator that permit the differentiation between the organisms according to their effects on the media or color change. بتفرق بين أنواع البكتيريا عن طريق 1/2

**Examples:**

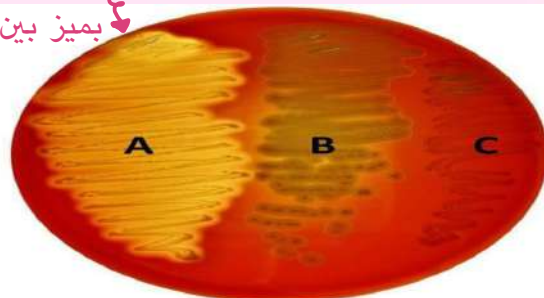
- MacConkey agar
- TCBS agar
- Mannitol salt agar
- Salmonella-Shigella Agar

**Indicator:** مادة كيميائية يتغير لونها مع تغير pH (كاشف)

- Blood agar organisms يس بقدر يميز بين هو مو indicator

بميز بين البكتيريا حسب تأثيرها ع RBCs

- A: complete hemolysis
- B: partial hemolysis (اخضر)
- C: no hemolysis



A:  $\beta$ -hemolysis Streptococcus pyogenes  
B:  $\alpha$ -hemolysis Streptococcus viridans  
C:  $\gamma$  (No) hemolysis Streptococcus faecalis



## امثلة indicator : مهمين

### MacConkey agar

- Contain **lactose & neutral red** indicator.
- Differentiate between **Lactose fermenters (pink colonies)** e.g E.coli, and **Non lactose fermenters (pale yellow colonies)** e.g Salmonella  
↪ Colorless



18

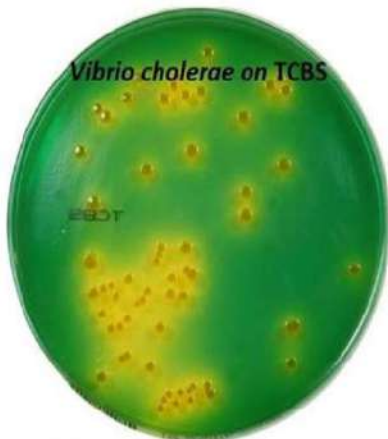


#اي fermentation لأي sugar ينتج عنه acid

### Thiosulphate Citrate Bile Sucrose (TCBS)

→ for Vibrio  
 {المسبب لـ  
 Cholerae

- Contain **sucrose & bromothymol blue** indicator.
- Differentiate between **vibrio cholera (yellow colonies)** and **non-cholera vibrio (green colonies)**.  
↓  
acid





باحتوي على مواد معينة بتحفز النمو كثير وبسرعة كبيرة لبعض microorganism  
فوق مستوى الاخرين، وهاي بتكون خطوة مبدئية قبل ما ازرع على selective media

## Enrichment media

Fluid containing some substances which stimulate the growth of some organisms on expense of the unwanted organisms.

### Examples:

- Selenite broth & Tetrathionate broth (for isolation of Shigella & Salmonella from stool).  
مليان flora ويمكن تغطي ع pathogenic microorganism اللي بدور عليه.
- Alkaline peptone water (for isolation of Vibrio cholera).

## Transport media

Transport media for microorganisms are a non-nutritive, balanced, buffered medium that provides a controlled environment to **preserve the viability** of bacteria during transport **without allowing them to multiply**, when specimens cannot be cultured immediately after collection.

### Examples:

- Amies Transport Medium.
- Stuart's medium.



بدي انقل العينة لأنو ما رح اشتغل فيها هلاً، والهدف منها إنها تحافظ على viability تبعث organism،  
وما بتوفرله الغذاء لانو انا بدي أحافظ ع كمية البكتيريا بلا ما تزيد، لانو ببعض الاحيان (بعينات urine)  
لازم اعد البكتيريا حتى افرق اذا هو pathogenic ولا بس contamination (ال urine اخذ معو flora، عدد مو كبير)



## Anaerobic culture

Anaerobic cultivation is essential for bacteria that cannot grow in the presence of O<sub>2</sub> e.g. Clostridium & Bacteroids.  
كيف بدني اسحب O<sub>2</sub> من الوسط ؟

The following methods are used for anaerobiosis:

➤ Use of media containing [reducing compounds] as:

- **Robertson cooked meat medium.**
- **Thioglycolate broth.**



Robertson cooked meat medium

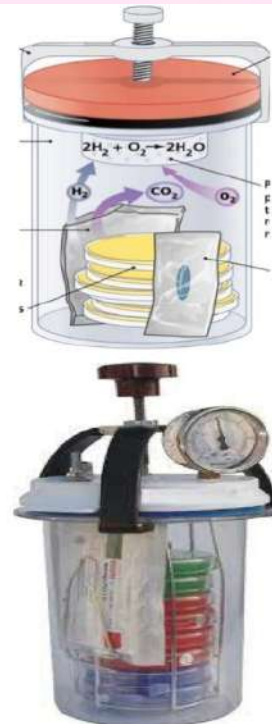
➤ Replacement of oxygen by hydrogen using **Gas-pak jar.**

ممکن لو انا ما عندي امكانيات ازرع الorganism واحطه بشي وأشغل شمعة لحد ما تسحب الاكسجين

### Anaerobic Gas Pak System:

➤ It is Gas Generating Systems in which **hydrogen** is generated inside the jar by placing a special Gas Pak envelope commercially prepared.

➤ The presence of **catalyst** in the jar allows the hydrogen released to combine with oxygen in jar to give strictly anaerobic condition.



مطربان بحط فيه اطباق ال organism اللي بده ازرعه، وبشتري envelope commercially بقصه وبحطه جوا المطربان وبحط شوية مي ف بطلع كمية هيدروجين كتيير بتتحد مع الاكسجين وبتخرج عشكل ماء





## Bacterial culture techniques

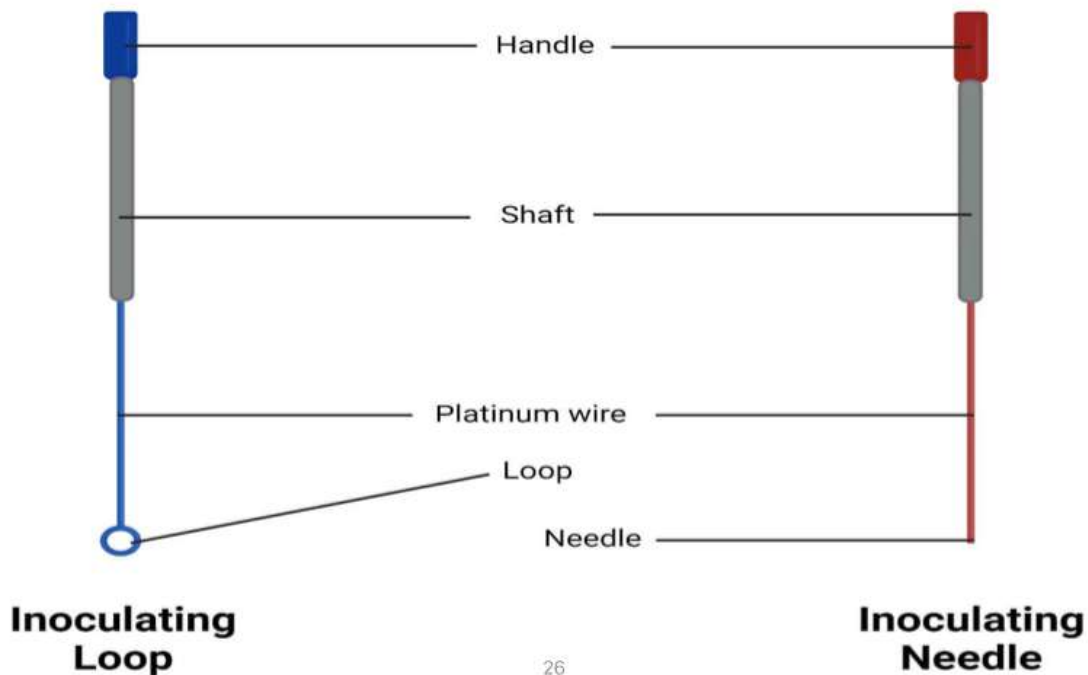
**A) Inoculation:** – introduction of a sample into a culture media (By sterile loop and using aseptic technique).

- **Inoculation of fluid media**
- **Inoculation of solid media:**
  - **Streak culture**
  - **Slant culture**
  - **Stab culture**
  - **Lawn culture**

**B) Incubation:** under conditions that allow growth.  
(i.e. suitable temperature, humidity, CO<sub>2</sub>%,...)

استخدمته بال motality إبرة الزرع

### Parts of Inoculating **Loops** and **Needles**

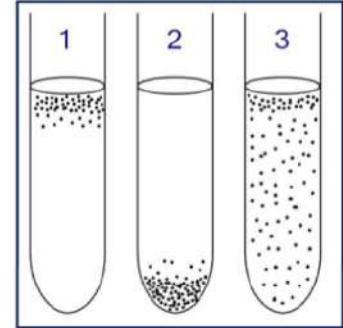


## Inoculation of fluid media:

By adding a portion of the specimen to the medium.

Identification of bacterial growth on fluid media:

1. **General turbidity** if the bacteria are **facultative anaerobes**.  
 باخذ عينة عن طريق ال loop ويحطها ب broth، ويحطها ب الحضانة، طب كيف  
 رح اعرف اذا في organism بالسائل هاد؟ عن طريق التعكر (في organism)
2. **Surface pellicle** if the bacteria are **aerobic**.
3. **Deposits** in the **bottom** of the tube in case of **anaerobes**.



27

## Streak culture: أشهر طريقة بزرع فيها

Aim to obtain pure culture i.e. an isolated growth of a single bacterium. Each bacterium divide repeatedly to give rise to a **separate colony**.  
 الهدف

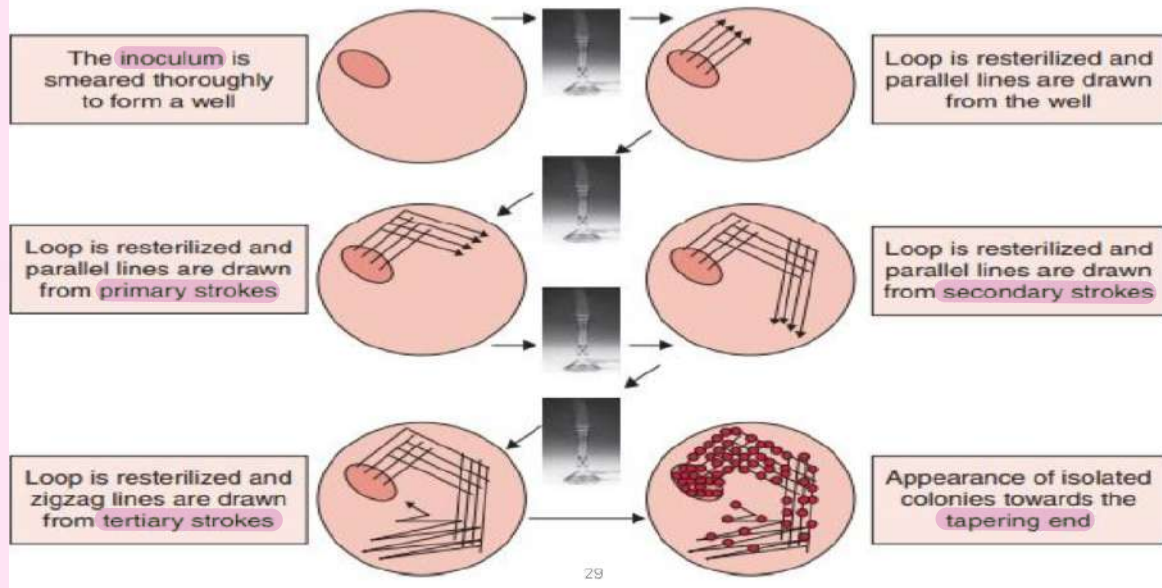


28



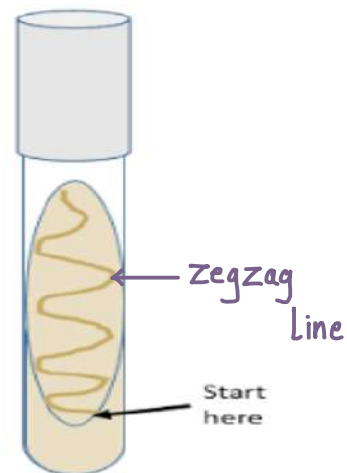


## Streak culture



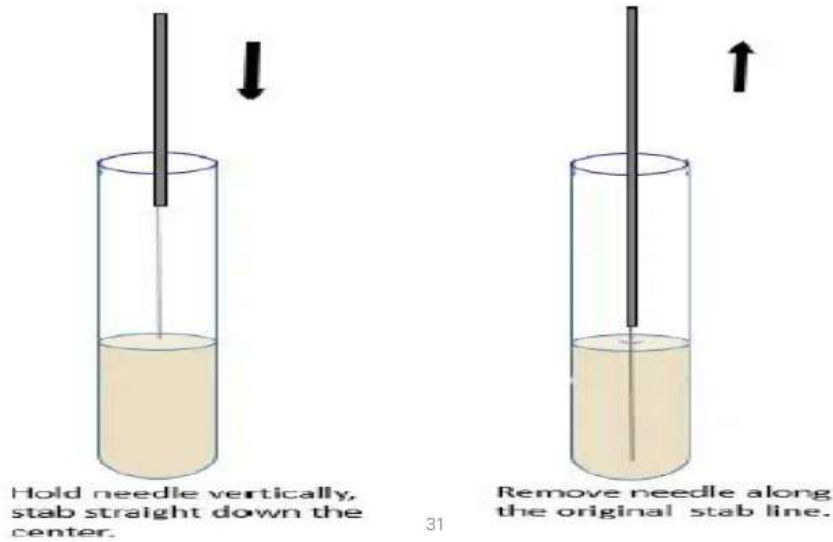
## Slant culture: Slope agar ٤ بزرجها

For performing biochemical tests  
e.g. Triple sugar iron test.



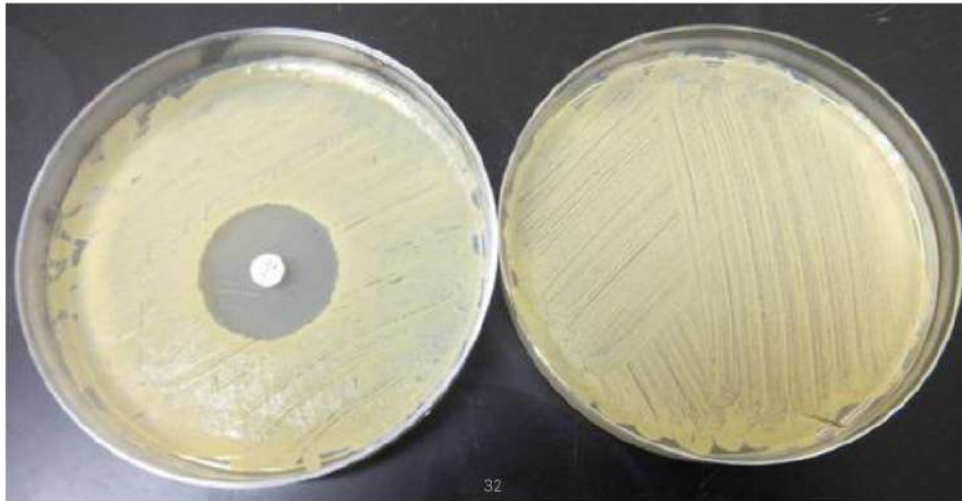
## Stab culture

For motility test



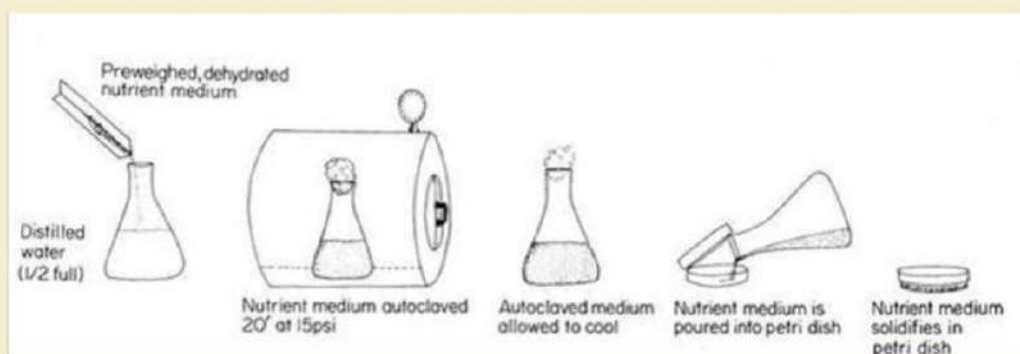
## Lawn culture : بزرها بكل الطبقة

For antibiotic sensitivity (Disc diffusion)



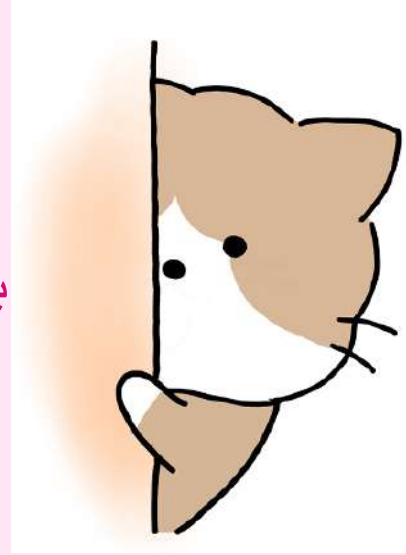
## Preparation of solid nutrient media in plate (Petri dishes)

مطلوب ← طريقة طبخ الـ media





بالتوفيق   
*dana*



هذا التفريغ صدقة عن روح  
"هبة خالد الوريكات"  
وبقية شهداء العلم في حادثة التكنو

اللهم ارحمهم واغفر لهم وتقبلهم من الشهداء  
الصالحين  
نسألكم الدعاء لهم والفاتحة

