الفصل الرابع

الاختبارات البكتريولوجية

1 – التمديد العشري .
2 – التعداد الميكروبي المباشر وفق طريقة بريد Breed .
3 – ترشيح الحليب .
4 – تعداد الأحياء الدقيقة .
5 – الكشف عن التهاب الضرع .
6 – التحليل الميكروبيولوجي للحليب الخام لدفع ثمن الحليب .
7 – التحليل البكتريولوجي للحليب الخام الموجه لتحضير الحليب المبستر .
8 – تحليل الحليب الخام بكتريولوجياً الموجه لتحضير الحليب المبستر عالي الجودة .
9 – مراقبة ثباتية الحليب المركز غير المحلى .
10 – التحليل الميكروبيولوجي للحليب المركز المحلى .
11 – مراقبة ثباتية الحليب المعقم .
12- التحليل الميكروبيولجي في الحليب المجفف .
13 – التحليل البكتريولوجي لمنتجات الألبان المتنوعة – اللبن الخاثر .
14 – التحليل البكتريولوجي للأجبان الطرية والمطبوخة والأجبان المصهورة

الفصل الرابع
الاختبارات البكتريولوجية

(1) – التمديد العشري : Dilution dϑcimeale

1 – تقنية التمديد :

1-1 الأدوات اللازمة :

للحصول على تمديد 10.000/1 تستخدم الأدوات والمواد اللازمة :

- محلول ممدد إما محلول رانجر الممدد إلى الربع (R8)
  أو محلول تريبتون – الملح (R7)

وتوزع المحاليل ضمن الدورق بمعدل 90-100 مل وتعقم على درجة حرارة 121 ± 1°م خلال مدة 15دقيقة .

- أربعة أنابيب اختبار معقمة 220×20 مم .
- 5 ماصات معقمة 1 ± 0.02 مل .
- ماصة معقمة 10 ± 0.2 مل .

1-2- طريقة العمل :

يجب أن تطبق كل المعاملات ضمن الحد الأقصى من الدقة وبشكل معقم .

1-2-1 توزيع السائل الممدد :

باستخدام الماصة 10مل خذ 9مل من المحلول وضعها في كل من الأنابيب الأربعة 200×20مم .

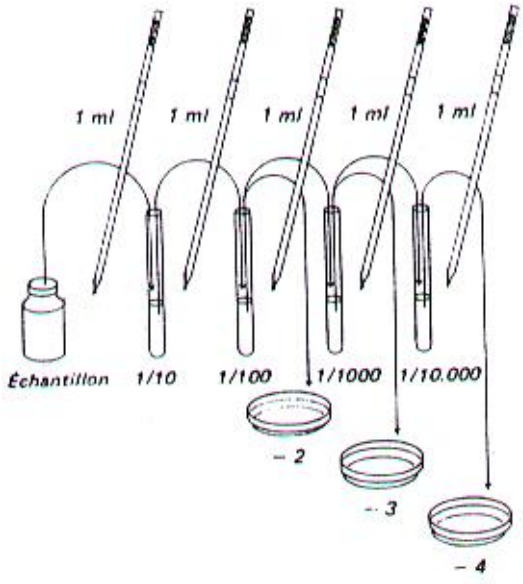
2-2-1 تمديد المادة المراد فحصها :

- جانس وبشكل مناسب يدوياً أو آلياً المادة المراد فحصها أو المعلق المحضر ثم خذ بالماصة المعقمة 1مل من المنتج أو المعلق وأدخل الحجم المأخوذ ضمن الأنبوب المحتوي على 9مل من الممدد للحصول على تمديد $\frac{1}{10}$ أو -1 .

- يحرك الأنبوب يدوياً أو آلياً لجعله متجانساً وتستبعد الماصة ضمن وعاء يحتوي على ماء جافيل .

- استخدم ماصة معقمة جديدة لأخذ 1مل من التمديد $\frac{1}{10}$ وأدخلها ضمن أنبوب يحتوي على 9 مل من المحلول الممدد للحصول على تمديد $\frac{1}{100}$ أو -2 .

- استبعد الماصة وحضر بالطريقة نفسها للحصول على تمديد $\frac{1}{1000}$ أو-3 و $\frac{1}{10.000}$ أو -4 . الشكل 4-1 .



الشكل (4-1) : تقنية التمديد العشري

2 - تقدير أعداد الأحياء الدقيقة :

يعبر عن عدد الأحياء الدقيقة الموجودة ضمن منتج وفق طريقتين :

- إذا كان النوع الميكروبي المطلوب موجوداً بعدد قليل أو غير موجود فيتم فحص واختبار كمية يختلف مقدارها ويكون الحجم بشكل عام أعلى من 1مل ويعبر عن النتائج بوجود أو عدم وجود النوع ضمن الحجم أو الكمية الخاضعة إلى الفحص .
- إذا كان عدد الأحياء الدقيقة المطلوب مرتفعاً فيطبق نظام التمديد العشري لزرع الوسط المستنبت ويعبر عن النتائج وفقاً للوسط المستخدم على الحالة السائلة أو الحالة الصلبة وفقاً لتعابير معينة .

1-2 الوسط السائل :

1-1-2 التقدير في الحالة الإيجابية :

يترجم نمو الأحياء الدقيقة في الوسط السائل بوجود نوعين من الملاحظات .

- **النمو :** ويترجم بوجود الراسب أو العكارة .
- **التفاعلات الحيوية :** والتي يمكن توضيحها بمظاهر متنوعة مثل إنتاج الغاز والتخثر والهضم وتغير لون دليل معين والكشف عن بعض الفعاليات الأنزيمية .

مهما تكن الملاحظة تؤخذ فقط النتائج الإيجابية ضمن سلسلة التمديدات والتي ستخضع إلى ترقيم عددي

2-1-2 العدد التقريبي :

تطبق هذه الطريقة في حالة زرع واحدة لكل تمديد ويعبر عن النتائج كما يلي :

1مل أو +1 إذا كانت النتيجة سلبية يعني غياب أو وجود أقل من 1من الأحياء الدقيقة في مل .

أما إذا كانت النتيجة إيجابية يتراوح العدد بين 1-10/مل من الأحياء الدقيقة .

$\frac{1}{10}$ مل أو-1 في حالة النتيجة الإيجابية يتراوح العدد بين 1-10/مل من الأحياء الدقيقة بين 10و100/مل ، $\frac{1}{100}$ مل أو-2 في حالة القيمة الإيجابية يتراوح عدد الأحياء الدقيقة بين 100-1000/مل ، $\frac{1}{1000}$ مل أو -3 في حالة القيمة الإيجابية يتراوح عدد الأحياء الدقيقة بين 1000-10000 /مل .

طريقة العد الاحتمالي :

تطبق هذه الطريقة فقط عندما تكون عملية الزرع تشمل على ثلاث تمديدات متتالية على الأقل .

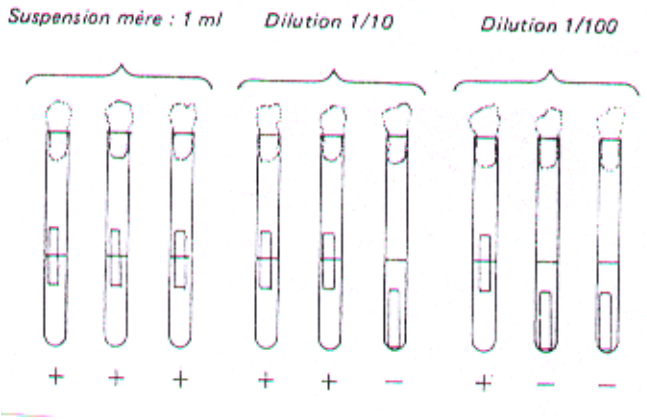
تسجل الأرقام ويحصى العدد وفقاً لجدول J.C.DOMAN مثلاً عند فحص ثلاثة حجوم من تمديدات متتالية وزرع ثلاثة أنابيب لكل تمديد في المنتج السائل.

فحص 1 مل من التمديدات من $\frac{1}{10}$ وحتى $\frac{1}{100}$

أحجام التمديدات المختبرة	1مل	1-	2-
النتائج	+ + +	- + +	- - +
النتائج الإيجابية الكلية	3	2	1
تشكيل العدد من ثلاثة أرقام	3	2	1

العدد المسجل 321 اعتباراً من 1 مل وللتعبير عن النتائج في مل باستخدام جدول J.C.DEMAN .

321 = 15 عدد الأحياء الدقيقة في مل . الشكل (2-4)



الشكل (2-4): النتائج الإيجابية والسلبية للأنابيب المختبرة وفق التمديدات المختلفة .

المنتج الصلب أو نصف الصلب :

تحضير معلق الأم عند التمديد $\frac{1}{10}$ أي أن كل 1 مل من المعلق الأم يساوي 0.1 غ من المنتج .

تفحص التمديدات ويؤخذ 1 مل من $\frac{1}{10}$ و $\frac{1}{100}$ للمعلق الأم

أحجام التمديدات المختبرة	1 مل = 0.01 غ	1- = 0.001 غ	2- = 0.0001 غ
تقدير النتائج	+ + +	+ + +	- - -
النتائج الإيجابية الكلية	3	3	0
تشكيل العدد بثلاثة أرقام	3	3	0

العدد المأخوذ 330 اعتباراً من 0.1 مل أو 0.1 غ من المنتج وللتعبير عن النتائج في الغرام وفق جدول J.C.DEMAN 1-4 .

330 = 220 عدد الأحياء الدقيقة في الغرام

الحالة الثانية :

فحص أربع تمديدات متتالية

التمديدات المختبرة	1 مل	1-	2-	3-
تقدير النتائج	+ + +	- + -	- - +	- - -
النتائج الإيجابية الكلية	3	1	1	0
تشكيل العدد	3	1	1	0

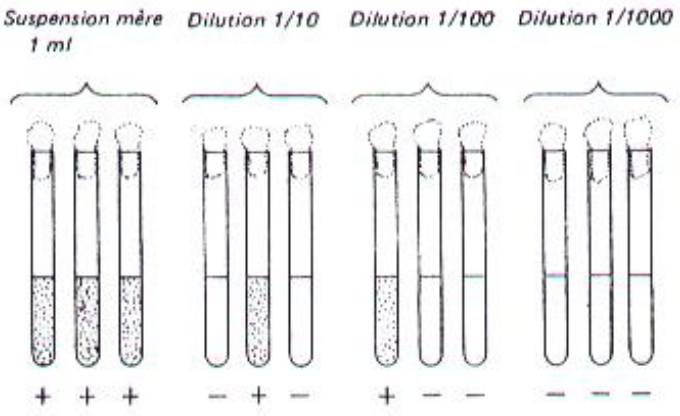
الرقم المأخوذ 311

وللتعبير عن النتائج وفق الجدول في المنتج السائل

311 = 7 عدد الأحياء الدقيقة / مل .

أما في العينة المحضرة من المعلق الأم إلى العشر أي 311 اعتباراً من محاول الأم يعني 311 = 7 عدد الأحياء الدقيقة في 0.1 غ .

= 7 × 10 = 70 عدد الأحياء الدقيقة في الغرام . (الشكل 4-3)



الشكل (4-3)
النتائج الإيجابية والسلبية للأنابيب المختبرة وفق التمديدات المختلفة .

الجدول (4-1) : الخاص بطريقة العد الاحتمالي (J.C.DEMAN – 1977)

عدد الأنابيب الموجبة على مستوى ثلاثة تمديدات متتالية مأخوذة

الرقم	الأنبوب الثالث	الأنبوب الثاني	الأنبوب الأول
0.3 >	0	0	0
0	1	0	0
0.3	0	1	0
	0	2	0
0.4	0	0	1
0.7	1	0	1
0.7	0	1	1
	1	1	1
1.1	0	2	1
	1	2	1
	0	3	1
0.9	0	0	2
1.4	1	0	2
1.5	0	1	2
2.1	1	1	2
2.1	0	2	2
	1	2	2
	0	3	2
2	0	0	3
4	1	0	3
	2	0	3
4	0	1	3
7	1	1	3
	2	1	3
9	0	2	3
15	1	2	3
21	2	2	3
	3	2	3
20	0	3	3
50	1	3	3
110	2	3	3
110 <	3	3	3

2-2 الوسط المتصلب :

2-2-1 العدد في حالة النتيجة الإيجابية :

يترجم نمو الأحياء الدقيقة في الوسط الصلب على شكل مستعمرات تمتاز بأشكال مختلفة وفقاً للوسط المستنبت المستخدم .
- أوساط عامة للنمو حيث يتغير شكلها : منتظم أو غير منتظم أو الدائري أو العدسي أو المحدب أو المسطح أما بالنسبة للحجم فهي شديدة التنوع .
- أوساط منتخبة والتي يجب أن تتطابق وفق المعلومات المقدمة عن الوسط المستخدم .

2-2-2- تعداد المستعمرات :

بشكل عام يتم زرع كل تمديد مأخوذ ضمن طبقين وبعد الحضانة تسحب الأطباق من الحاضنة .

آ - اختيار التمديد المختبر :

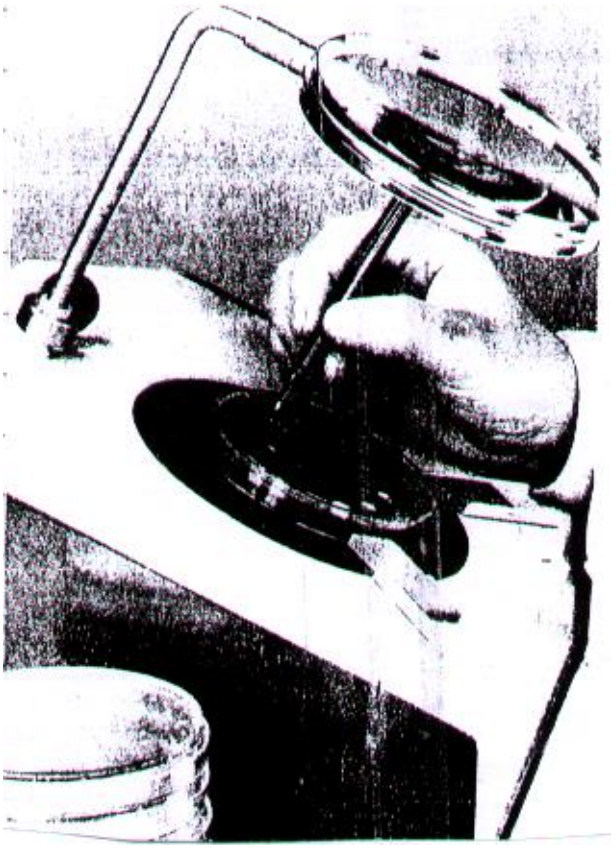
يجب أن تتطابق المعطيات المقدمة عن الوسط المستنبت المستخدم و إذا لم يقدم أية معلومات دقيقة ومحدودة فيجب أخذ الأطباق التي تحتوي على عدد من المستعمرات المتراوحة بين 30- 300 إذا أمكن ذلك مع مستوى تمديدين متتاليين .

ب- تعداد المستعمرات :

وفقاً لنموذج التعداد المتبع ضع الطبق بحيث يكون الغطاء على السطح الأسود أو الأبيض أو على سطح مصدر ضوئي وسجل عدد المستعمرات في الطبق وفقاً لكل تمديد . (الشكل 4-4)

ج – التعبير عن النتائج :

ويعبر عن العدد المتوسطي لكل تمديد واحتياطياً بين تمديد**ين** متتاليين إلا إذا كانت العلاقة بين الرقم الأعلى إلى الرقم الأدنى أعلى من 2 فعند ذلك يؤخذ الرقم الأدنى .



الشكل (4-4) : تعداد المستعمرات

(2) - التعداد الميكروبي المباشر :

Numƍration microbienne directe

وفق طريقة Breed

يستخدم المجهر لتعداد الأحياء الدقيقة الحية والميتة الموجودة في الحليب وتطبق أيضاً على المنتجات اللبنية الأخرى .

1 - تحضير ونشر العينة :

- يستخدم شريحة زجاجية فيها مربع محدد مساحته 1سم^2 .
- تستخدم ماصة شعرية معقمة لأخذ كمية 0.01 مل من الحليب ووضعها على المربع الزجاجي .
- تستخدم إبرة معقمة باللهب لنشر كمية الحليب على مساحة 1سم^2 .
- تجفف الشريحة الزجاجية على لوحة مسخنة درجة حرارتها 40-50^{o}م خلال خمس دقائق .

2 – تلوين الشريحة :

- توضع الشريحة الزجاجية ضمن المادة الملونة صبغة بريد أو صبغة نيومان R2O المعدلة خلال مدة دقيقتين ويتم التخلص من الكمية الزائدة بإمالة الشريحة على ورقة الترشيح .
- تجفف الشريحة على درجة الحرارة العادية .
- تغسل الشريحة بالماء ثلاث مرات بإدخال الشريحة عمودياً ضمن الماء .
- تجفف الشريحة على درجة الحرارة العادية .

3 – الفحص المجهري :

- تفحص الشريحة بالعدسة الغاطسة للمجهر .
- يحصى عدد الجراثيم الموجودة والملونة باللون الأزرق الغامق ضمن 10 إلى 20 حقلاً مجهرياً ويؤخذ العدد المتوسط .

يعبر عن عدد الجراثيم في مل من الحليب وفق العلاقة التالية :

$$\text{عدد الجراثيم في مل من الحليب} = \frac{\text{مساحة الشريحة (1سم}^2\text{)} \times \text{متوسط عدد الجراثيم}}{\text{مساحة حقل المجهر} \times \text{كمية الحليب المستخدمة (0.01 مل)}}$$

(3) – ترشيح الحليب : Filtration du lait

1 – الهدف : تحديد درجة نظافة الحليب وكشف المواد الغريبة والشوائب الموجودة .

2 – الأدوات اللازمة :

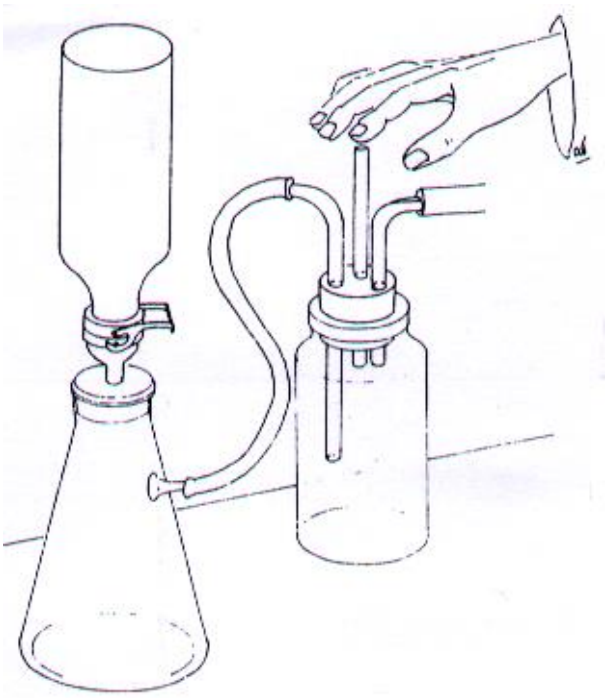
- جهاز كشف الشوائب ويتكون من حوض سعته نصف لتر من الحليب .
- مصفاة معدنية يثبت عليها قرص من القطن للترشيح .
- وسادة أو قرص من القطن .
- مخلب يثبت الحوض مع قرص القطن والمصفاة المعدنية .
- سدادة مطاطية مثقوبة .
- دورق مخروطي يثبت عليه المجموع السابق .
- مضخة تفريغ لتسريع ترشيح الحليب مرتبطة مع الدورق المخروطي ، (الشكل 4-5) .

3 – طريقة العمل :

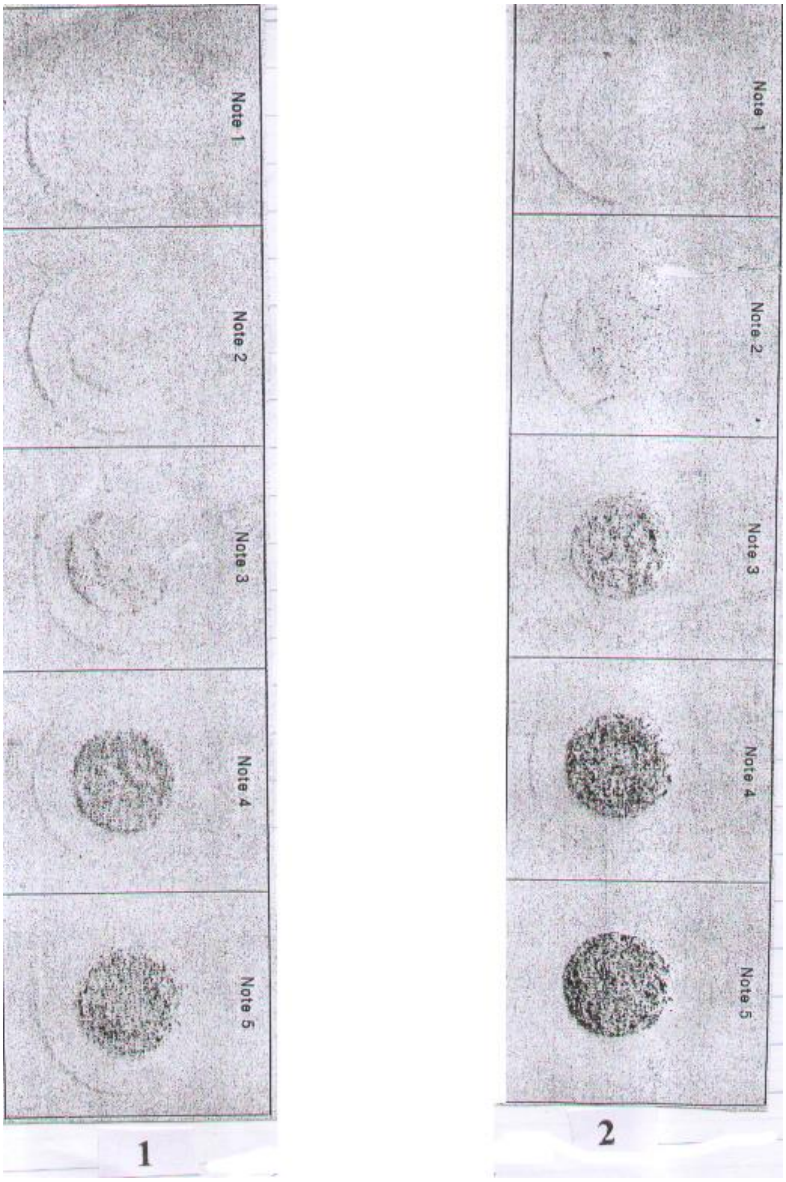
- يسكب حجم من الحليب مقداره 500مل باستخدام مخبار مدرج .
- لزيادة سرعة الترشيح عبر قرص القطن ، تستخدم مضخة التفريغ .
- عند الانتهاء من الترشيح يؤخذ قرص الترشيح ويقارن مع سلم النظافة .

4 – تفسير النتائج :

- تقدر درجة النظافة للحليب المختبر بتحديد درجة النظافة المطابقة مع لوحة المقارنة .
- في حالة الحليب الخام ، يجب ألا يحتوي قرص الترشيح على كتل كبيرة أو كتل عديدة تغطي سطح القرص .
- في حالة الحليب المبستر يجب ألا يحتوي القرص على كتل غريبة وإذا وجدت يجب أن تكون ناعمة ومنفردة . (الشكل 4-5) .



الشكل (4-5) : الأدوات المستخدمة لترشيح الحليب



سلم درجات نظافة الحليب وفق التسلسل التالي للدرجات الخمسة :
1 – جيد – 2- مقبول – 3- وسط – 4- سيء – 5- سيء جداً
1- تعريض الحليب إلى ترشيح أولي في المزرعة
2- عدم تعريض الحليب إلى الترشيح الأولي في المزرعة .

(4) – تعداد الأحياء الدقيقة :

1-4 تعداد الأحياء الدقيقة على درجة حرارة 30°م

Dϑnombrementdesmicro-organismesa'30°C

تستخدم تعابير متنوعة للدلالة على تعداد الجراثيم بالبكتريا الكلية الهوائية أو البكتريا الكلية أو البكتريا الهوائية القابلة للنمو أو البكتريا الأليفة لدرجة الحرارة المتوسطة .

يعتمد تعداد الأحياء الدقيقة الهوائية أو الهوائية اللا هوائية الاختيارية على النمو في وسط مغذي من الجيلوز المحضن على درجة حرارة 30°م خلال 72 ساعة فتظهر البكتريا على شكل مستعمرات ذات أحجام مختلفة .

1 – تعداد الأحياء الدقيقة على درجة حرارة 30°م للحليب والحليب المجفف :

تدل الحمولة الجرثومية للحليب الخام أو الحليب المراد تصنيعه على درجة تلوثه. فعند وجود التلوث المرتفع يتطلب ذلك تطبيق بعض المعاملات لتحسين نوعية الحليب وفقاً للحالة وظروف الإنتاج والتصنيع .

1-1 طريقة العمل :

1-1-1 الأدوات اللازمة :

- ماصات معقمة 1مل ± 0.02 مل .
- أطباق بتري معقمة .
- أنابيب اختبار معقمة 20×200 مم يحتوي كل أنبوب 9مل من المحلول تريبتون – ملح M7 أو محلول رانجر الممدد إلى الربع M8 .
- الوسط المغذي جيلوز معياري M42 .

جيلوز M59 .

2-1-1 اختبار التمديد :

بشكل عام يتم تعداد الأطباق التي يكون فيها عدد المستعمرات يتراوح بين 30 و300 ولذلك من المفضل اختيار نوعي التمديد المتتاليين اللذين يؤمنان عدد المستعمرات المشار إليه .

3-1-1 الزرع :

أدخل 1 مل من التمديد المطلوب ضمن طبق بتري وصب بعد ذلك وسط الجيلوز المصهور على درجة حرارة 45-46°م خلال 3 ساعات على الأكثر.

2-1 التحضين :

ضع أطباق بتري المقلوبة ضمن الحاضنة على درجة حرارة 30° م خلال 72 ساعة .

3-1 تفسير النتائج :

يجب القيام بعد كل المستعمرات النامية مهما يكن حجمها ويعبر عن النتائج بعددها في مل أو الغرام .

ملاحظة : فيما يتعلق بالبكتريا الأليفة لدرجة الحرارة المرتفعة تطبق الطريقة نفسها العد القياسي بالأطباق كما ذكر سابقاً مع استبدال درجة حرارة التحضين على 55°م ولمدة 48 ساعة ويحسب عدد البكتريا في مل/من الحليب .

2-4 تعداد البكتريا الأليفة لدرجات الحرارة المنخفضة

: D9nombrement des bact9ries psychrotrophes

يتم تعداد البكتريا المحبة لدرجة الحرارة المنخفضة للكشف عن عددها وتطوره خلال الحفظ على درجة حرارة منخفضة للحليب الخام أو الحليب المعامل حرارياً . تمتاز هذه البكتريا بفعالية إنتاج بروتيئاز وليباز تتصف بمقاومتها لدرجة الحرارة المرتفعة .

تعرف البكتريا المحبة للبرودة بالبكتريا التي تنمو في وسط مغذي ضمن شروط محددة ولذلك يتم تعدادها بعد الحضانة على درجة حرارة 6.5°م وخلال 10 أيام .

1 – طريقة العمل :

1 – 1 أخذ العينة

1 – 2 المواد اللازمة :

- ماصات معقمة 1مل ± 0.02 مل .
- أطباق بتري معقمة .
- أنابيب اختبار معقمة 200×20مم محتوية على 9مل من محلول رانجر الممدد إلى الربع M8 أو محلول تريبتوفان – ملح M7 .
- الوسط المغذي M42 أو M59 .
- حمام مائي درجة حرارته 46-47°م .
- حاضنة درجة حرارتها منظمة على 6.5 ± 0.5°م .

1 – 3 الزرع :

- يوضع ضمن طبق بتري 1مل من الحليب أو 1مل من التمديد -1 و -2 و -3 .
- يصب حوالي 12مل من الوسط المغذي المصهور المبرد على درجة حرارة 46-47°م .
- يخلط الوسط مع العينة بتحريك طبق بتري ضمن حركة دورانية .
- تترك الأطباق حتى تتصلب .

1 – 2 الحضانة :

توضع الأطباق المقلوبة في الحاضنة على درجة حرارة 6.5°م ± 0.5 .

1 – 3 تفسير النتائج :

تؤخذ الأطباق المحتوية على أقل من 300 مستعمرة وتحسب عددها مهما يكن حجمها ويعبر عن النتائج بعددها في مل أو غرام من المنتج .

4 – 3 تعداد البكتريا المقاومة لدرجة الحرارة المرتفعة

D9nomberment de la flore th9rmor9sistante

يسمح تقدير تعداد البكتريا المقاومة لدرجة الحرارة المرتفعة في :

- كشف التلوث الناتج عن الشروط الصحية وشروط جمع الحليب والحلابة غير المناسبة .
- كشف طبيعة وأهمية الأنواع التي يمكن أن تكون موجودة بعد البسترة .

لدى مقارنة تعداد البكتريا الكلية في الحليب الخام وتعداد البكتريا المقاومة لدرجة الحرارة المرتفعة لنفس الحليب بعد تطبيق البسترة يمكن التكهن بشروط التلوث قبل المعاملة الحرارية وعدم كفايتها أو تطبيقها بشكل غير كاف . وتعرف الجراثيم المقاومة لدرجة المرتفعة في الحليب بالجراثيم المتبقية في الحليب بعد تسخينه مدة 30 دقيقة على درجة حرارة 63°م ± 0.5°م .

1 – طريقة العمل :

1 – 1 أخذ العينة

1 – 2 الأدوات اللازمة :

- أنابيب اختبار معقمة 16×160مم .
- أطباق بتري معقمة .
- حمام مائي تنظم حرارته .
- مقياس حراري مدرج إلى $\frac{1}{10}$ أو $\frac{1}{2}$ الدرجة المئوية .

1 – 3 الوسط المستخدم M42 أو M59 .

1 – 4 تحضير العينة :

- جانس عينة الحليب المراد اختبارها بالتحريك خلال مدة عشر ثوان .
- انزع سدادة العبوة .
- خذ 10مل من الحليب وانقلها إلى أنبوب اختبار .
- سد الأنبوب .
- ضع الأنبوب في حمام مائي درجة حرارته 63°م ± 0.5 بحيث تصل درجة الحرارة إلى 63°م خلال 5دقائق والتأكد من درجة الحرارة باستخدام الحليب الشاهد .

- اسحب الأنبوب بعد مدة 35دقيقة وبرده في حمام مائي يحتوي على الماء والثلج للوصول إلى درجة حرارة حوالي 10°م .
يجب الانتباه إلى عدم استخدام حليب يتخثر باختبار الغليان .

1 – 5 الزرع :

تستخدم طريقة الزرع نفسها للأحياء الدقيقة المقدرة على درجة حرارة 30°م.

1-6 – التحضين :

توضع الأطباق في الحاضنة على درجة حرارة 30°م خلال 72 ساعة .

1-7 – تفسير النتائج :

تحصى وتعد المستعمرات ويعبر عن عددها في 1مل أو في غ من المنتج .

4 – 4 البحث وتعداد بكتريا الكوليفورم (القولونيات)

Recherches et dϑnombrement des coliformes

يسمح تحديد أعداد بكتريا الكوليفورم في تقدير :
- مستوى التلوث في الحليب الخام .
- فعالية البسترة وتحديد نقاط التلوث بعد البسترة .
- خطر وجود جراثيم ممرضة والكشف عن نوعية الماء المستخدم وتلوثه بالجراثيم الممرضة مثل السالمونيلا .

1 – البحث عن الكوليوفورم في الحليب :

1 – 1 الوسط السائل (مرق اللاكتوز مع الأملاح الصفراوية والأخضر اللامع M64) :

1-1- 1 المبدأ :

تخمر البكتريا اللاكتوز بسرعة مؤدية إلى انطلاق الغاز ويلاحظ ذلك باستخدام أنابيب دورهام Durham وتعتبر النتيجة إيجابية عند تشكل فقاعات كبيرة من الغاز .

1-1- 2 : طريقة العمل :
- التأكد من عدم احتواء أنابيب دورهام على الغاز .
- إدخال 1مل من المادة أو 1مل من التمديدات -1 و -2 و -3 ضمن الأنابيب مع المرق في الأخضر اللامع .
- تحضن الأنابيب على درجة حرارة 37°م أو 30°م خلال 24-28 ساعة .
- يحصى عدد الأنابيب الموجبة والسالبة ويعبر عن العدد في مل أو في غ من المنتج وفق الجداول القياسية الخاصة بذلك .

1-2 الوسط الصلب جيلوز مع دي أوكاسالات اللاكتوز M63 .

1-2- 1 المبدأ :

الوسط المستخدم خاص بتعداد بكتريا الكوليفورم حيث يتخمر اللاكتوز وتظهر البكتريا على شكل مستعمرات حمراء غامقة ذات مظهر أقل من 0.5مم.

1-2- 2 : طريقة العمل :

- يوضع 1مل من الحليب أو أقل من التمديدات المناسبة ضمن واحد أو اثنين من أطباق بتري .
- يصب الوسط المصهور من جيلوز مع دي أوكسالات اللاكتوز بمعدل 12مل على درجة حرارة 45-46°م .
- تحرك الأطباق ضمن حركة دائرية .
- عند تصلب الجيلوز يسكب حوالي 4 مل على السطح من الوسط المستخدم سابقاً لتشكيل طبقة متجانسة .

1-2- 3 : التحضين :

تحضن الأطباق على درجة حرارة 30°م أو 37°م لمدة 24/18 ساعة .

1-2- 4 : تفسير النتائج :

تحصى الأطباق المحتوية على المستعمرات التي يتراوح العدد فيها بين 15 و150 مستعمرة حمراء ويعبر عن النتائج بعددها في مل أوفي غرام من المنتج.

2 – البحث عن E. coli :

2 – 1 المبدأ :

تمتاز بكتريا E. coli في إنتاج الأندول في الماء الببتوني والحموضة والغاز في مرق ماكونكي .

2 – 2 التلقيح :

يلقح من كل أنبوب موجب في الاختبار السابق أنبوبين الأول يحتوي على مرق ماكونكي والآخر يحتوي على الماء الببتوني M4 .

2 – 3 التحضين :

تحضن الأنابيب على درجة حرارة 24°م ±0.5°م لمدة 48 ساعة .

2 – 4 تفسير النتائج :

تعد النتيجة إيجابية بظهور الغاز والحموضة في مرق ماكونكي وتكوين الأندول في ماء الببتون وتحصى الأنابيب الإيجابية وفق كل تخفيف ويحسب عدد البكتريا في 1مل من الجداول القياسية .

4 – 5 تعداد الجراثيم المسببة للفساد :

Dϑnombrement des germes putrides

تحرض هذه الجراثيم تفكك الكازئين مع تشكيل مواد ذات رائحة غير مستساغة . تعتمد طريقة التحليل على المراقبة المرتبطة في الكشف عن الجراثيم

المنتجة للأندول وتحديد مصادر الطعم والرائحة السيئة وكشف صعوبات ومشاكل التصنيع .

1 – المبدأ :

تدعى الجراثيم المفسدة الجراثيم المنتجة لكبريت الهيدروجين H2S ويتم البحث عنها وكشفها ضمن المرق البيتوني في ثيوسلفات الصوديوم أو هيبو سلفيت الصوديوم أو على وسط السيستين .

2 – طريقة العمل :

ازرع الأنابيب المحتوية على وسط السيستين أو وسط المرق البيتوني في وجود ثيوسلفات الصوديوم ، بعد الزرع يتم إدخال شريط من الورق المبلل في خلات الصوديوم بعيد عن سدادة القطن وجدار الأنبوب على شرط أن تكون النهاية السفلى للشريط الورقي أعلى بمسافة 1سم عن سطح وسط المزرعة . توضع الأنابيب في حاضنة على درجة حرارة 37°م لمدة 48 ساعة .

3 – تفسير النتائج :

عند سحب الأنابيب وإخراجها من الحاضنة يترافق إنتاج H2S بظهور اللون الأسود على شريط الورق .

- عند استخدام المرق البيتوني في وجود ثيوسلفات الصوديوم يسود الشريط الورقي .
- عند استخدام مرق السيستين يسود الوسط أو يظهر وجود راسب أسود .

ويعبر عن النتائج بالعدد التقريبي أو توقع العدد الاحتمالي الممكن عندما يشتمل الزرع ثلاثة أنابيب لثلاثة تمديدات متتالية كما ذكر سابقاً . ويعبر عن النتائج بعدد الجراثيم في مل أو في الغرام من المادة .

4 – 6 تعداد الخمائر والفطور :

Dϑnombrement des levures et des moisissures

يسمح تعداد الخمائر والفطور في معرفة إمكانية حفظ منتجات الألبان وبصورة خاصة منتجات الألبان الحامضية . يعتمد في تعداد الخمائر والفطور على نموها في وسط مغذي انتخابي متحمض على رقم حموضة 3.5 أو 4.5 مع وجود مضاد حيوي مثل تيراميسين Terramycine بمعدل 50مغ/اللتر .

من أهم الأوساط الغذائية المستخدمة :

جيلوز بالحليب المهضوم بفعل بابايين M14 .
جيلوز جيلوزي بالبطاطا M44 .
جيلوز بالمالت M51 .

1 – طريقة العمل :

- حضر ولقح الأطباق وفق التمديدات المطلوبة .

- طبق صهر الوسط المغذي على درجة حرارة 45-50°م مع تنظيم رقم الحموضة بشكل معقم على رقم 3.5 أو 4.0 وإضافة المضاد الحيوي .
- صب الوسط المغذي ضمن أطباق بتري بالسرعة الممكنة .

2 – التحضين :

توضع أطباق بتري ضمن الحاضنة على درجة حرارة 20-25°م خلال 5 أيام .

3 – تفسير النتائج :

يحصى عدد المستعمرات في الأطباق المحتوية على عدد يتراوح بين 15 و150 مستعمرة ويعبر عن تعدادها في مل أو غرام من المنتج .

4 – 7 تعداد الجراثيم المحللة للكازئين :

Dϑnombrement des germes casϑolytiques

تعتبر البكتريا المحللة للكازئين من العوامل المفككة للكازئين ضمن بعض المنتجات اللبنية وتتصف هذه البكتريا بقدرتها الأنزيمية على تحلل الكازئين الموجود في الوسط المنتخب والتي تظهر تحت شكل مستعمرات محاطة بمنطقة شفافة .

1 – طريقة العمل :

- حضر وازرع أطباق بتري بما يتناسب مع التمديدات المدروسة .
- صب بعد ذلك جيلوز كازئينات الكالسيوم M18 أو مع أي وسط مناسب آخر وفق طريقة الاستخدام .

2 – الحضانة :

ضع الأطباق ضمن الحاضنة على درجة حرارة 31 ± 1°م خلال 72 ساعة .

3 – تفسير النتائج :

احتفظ في الأطباق المحتوية على أقل من 150 مستعمرة واحص عدد المستعمرات المحاطة بطبقة شفافة وعبر عن النتائج بعدد البكتريا في 1مل أو في الغرام من المنتج .

4 – 8 تعداد الجراثيم المحللة للمادة الدسمة :

Dϑnombrement de la flore lipolytique

يطلق الجراثيم المحللة للمادة الدسمة على الجراثيم التي تتصف بفعالية أنزيمية كالليباز والإستراز محللة المادة الدسمة ومعطية الأحماض الدسمة الحرة.

1- المبدأ بمكن تقدير الفعالية في تحليل المادة الدسمة بطرق عديدة وفقاً للوسط المستخدم :

1-1- الإستراز يحلل أستر حمض الأوليك 80 Tween الموجود ضمن وسط Sierra مؤدياً إلى تشكيل هالة كاملة ناتجة عن بلورات أملاح الكالسيوم لحمض الدسم التحرر.

1-2- الليباز تقدر فعاليته بتحلل الجليسريدات الثلاثية ضمن وسط طبيعي من أصل حيواني مثل مادة دسم الزبدة كطريقة Rath أو ضمن وسط تركيبي ثلاثي بيوتيرين .

2- طريقة العمل :

حضر وصب عدداً من الأطباق يتناسب مع التمديدات المدروسة .

2-1- كشف الاستراز باستخدام وسط Sierra M75 .

2-2- كشف الليباز : صب ضمن الأطباق الوسط المستخدم إما :

جيلوزفي وجود تري - بيوتيرين أوM46 Rath

3- التحضين :

ضع الأطباق وفقاً للوسط المستخدم على درجة حرارة 31 ^{o}م $\pm$ 1^{o}م خلال مدة 3 أيام ولنمو الخمائر والفطور توضع الأطباق من جديد على درجة حرارة 20-25 ^{o}م لمدة 3 أيام .

4- النتائج :

يجب الاحتفاظ في الأطباق المحتوية على أقل من 60 مستعمرة .

4-1- الاستراز: يلاحظ في وسط Sierra أن المستعمرات المحللة للمادة الدسمة تظهر العتامة على طرفها الخارجي .

4-2- الليباز: عند استخدام وسط جيلوز مع تري بيوتيرين تظهر المستعمرات المحللة للمادة الدسمة بوجود مركز محاط بطبقة شفافة .

وعند استخدام تقنية Rath المبدلة تظهر المستعمرات المحللة للمادة الدسمة باللون الأزرق وتحاط بمناطق زرقاء مختلفة الشدة والتوسع وفقاً لفعاليتها .

ويعبر عن النتائج بعدد البكتريا في 1 مل أو في الغرام من المنتج .

5- تفسير النتائج :

يمكن أن نبين التفسير مع الانتباه إلى أنه ليست كالطرق المستخدمة كافية لتعداد الجراثيم المحللة للمادة الدسمة للأسباب التالية :

- الفعل المضاد لبعض الجراثيم الذي يعيق من كشف الفعالية المحللة للدسم .

- الفعل المضاد لبعض الملونات المستخدمة .
- شروط النمو غير الملائمة .
ملاحظة : ضمن مجال تحليل المنتجات الدسمة يعتبر وسط Rath الأكثر ملائمة نظراً لاستخدام مادة دسم الزبدة .

4-9- عدد المثبطات (كلوستريديوم) وفقاً لرشدي 1994 :
Recherche et dθnombrement des clostridiums

1- طريقة العمل :
- يوضع10 مل من الحليب ضمن دورق معياري معقم يحتوي على 90 مل من ماء الببيون (0.1 %) وبعد خلطها تقسم الكمية إلى قسمين متساويين .
- يسخن أحد القسمين في حمام مائي على درجة حرارة 75 °م لمدة 30 دقيقة.
- تستخدم طريقة العد الاحتمالي باستعمال ثلاثة أو خمسة أنابيب لكل تخفيف من تخفيفات القسمين السابقين وبكل أنبوب للمستنبت الزرعي للمطثيات DRCM.
- توضع الأنابيب في حاوية لا هوائية لمدة 48 ساعة على درجة حرارة 37°م.

2- تفسير النتائج :
تظهر الأنابيب الإيجابية بلون أسود وتحصى الأنابيب الإيجابية لكل تخفيف ثم تحسب عدد المطثيات في مل من الحليب وفقاً للجداول القياسية الخاصة ويعبر عن عدد المطثيات في مل من الحليب للقسم غير المسخن أما القسم المسخن فيعبر عن عدد الأبواغ .
ويمكن تطبيق اختبار الاختمار العاصف على عينة الحليب لكشف المطثية الحاطمة Cl.perfrigenes والتي تدل على تلوث الحليب بالبراز .
- توضع كمية 10 مل من الحليب في أنبوب اختبار معقم .
- توضع فوقها طبقة من شمع البرافين .
- توضع الأنبوبة في الحمام المائي على درجة حرارة 80 °م لمدة نصف ساعة.
- تبريد الأنبوبة وتحضن على درجة حرارة 37°م مدة 3-5 أيام .
- الأنابيب الايجابية تظهر بها خثرة حامضية مفككة إلى جزئيات نتيجة إنتاج الغاز .

(5)- الكشف عن التهاب الضرع :

D9pistage des mammites

1- طريقة العمل :

- جانس العينة جيداً
- أدخل ضمن أنبوب خاص بجهاز الطرد المركزي 10 مل من الحليب المختبر وضع السدادة المطاطية .
- سخن الأنابيب في حمام مائي على درجة حرارة 60 ^{o}م .
- طبق الطرد المركزي لمدة عشر دقائق 1200دورة / دقيقة مع الانتباه إلى حماية القسم الشعري من الأنبوب .

1-2- تفسير النتائج :

- أقرأ حجم الراسب والمقدر بالألف من الحجم .
- إذا كان ممكناً طبق الفحص المجهري على الراسب لمعرفة أشكال الميكروبات الموجودة .
- يجب آلا يتجاوز حجم الراسب 0.3 بالألف .

2- إختبار CMT

2-1- طريقة العمل :

- أدخل 2 مل من الحليب ضمن زجاجة الفحص ذات القطر 60 مم .
- أضف 2 مل من محاول مائي لمادة Teepol و 0.1 بالألف من برموكريزول الأرجواني .
- حرك خلال 4 إلى 5 ثواني .

تفسير النتائج :

التفاعل	عدد الخلايا / مل	التفسير
+++	أكثر من 5 ملايين	تشكيل هلام ثخين – التهاب الضرع
++	بين 0.8 ومليون 5 ملايين	تشكيل خثرات ثخينة ملتصقة مع وجود كتل لزجة في قاع زجاجة الاختبار - التهاب للضرع .
+	بين 0.4 و 0.5 مليون	خثرة خفيفة ومرئية بشكل شفاف في قاع الزجاجة ذات اللون الأسود المضاء
±	بين 0.2 و 0.5 مليون	تخثر خفيف يختفي بعد 10 ثواني .
-	أقل من 0.2 مليون	لا يوجد خثرات
+++ و ++		التهاب للضرع
+		التهاب تحت السريري غير واضح

عند التطبيق العملي تعتبر ± سلبية
فيما يتعلق باللون المرتبط مع رقم الحموضة pH فإن

6.6 - 6.5	رمادي بنفسجي	طبيعي
6.8 - وما فوق	بنفسجي	التهاب الضرع ونهاية الإدرار
6.4 - 6.5	أصفر زيتي	حليب السرسوب
6.3	أصفر	حليب حامضي .

ملاحظات عامة :

إذا كان التفاعل إيجابياً في الأرباع الأربعة (حليب نهاية الإدرار) قلوي
(حليب السرسوب) حامضي

يتطلب العودة إلى الحالة الطبيعية ضمن فترات زمنية مختلفة وفقاً لـ :

- عمر الحيوان حيث تطول الفترة كلما ارتفع العمر .
- السرعة في المعالجة .
- وفي بعض الحالات يكون التفاعل + خلال فترة الإدرار .
- يجب تطبيق الاختبار على الأرباع الأربعة مع أخذ عينة من حليب الحلابة الكاملة .

3- اختبار وايت سايد : Whiteside

- توضع خمس نقاط من عينة الحليب المختبرة بعد مزجها جيداً على سطح مقداره 1 سم2 على شريحة زجاجية ملساء ومعقمة باستخدام محقن أو قطارة معقمة .
- يضاف نقطتين من محلول ماءات الصوديوم 4% باستخدام قطارة معقمة
- يخلط المزيج بقضيب زجاجي مع توزيعه بشكل دائري على سطح الشريحة

- تفسير النتائج :

1- يعتبر الحليب سالباً للاختبار إذا بقي على الحالة السائلة المستحلبة .
2- يعتبر الحليب إيجابياً إذا ترسب ويسجل معدل الترسب وفق الدرجات الثلاثية التالية +1 أو ++2 أو +++3 .

4- اختبار هوتس :

- يوضع 9.5 مل من الحليب المختبر ضمن أنبوب اختبار .
- يضاف إليه 0.5 مل من محلول معقم لبرومو كريزول القرمزي 0.2 % .
- يمزج جيداً ويوضع الأنبوب في الحمام المائي على درجة حرارة 37°م خلال 24 ساعة . إذا كان رقم الحموضة طبيعياً 6.8 يكون اللون قرمزياً أما إذا كان اللون أخضر مصفراً فيكون الحليب حامضياً ورقم حموضته 5.2 ويلاحظ عند وجود str. agalaetiae تشكل خثرة موضعية مع صفيحات رقيقة صفراء اللون ناتجة عن فعاليتها .

5- اختبار الكأس :

- تؤخذ القطرات الأولى من الحليب المراد اختباره من كل من الأرباع لوحده ويمرر الحليب على مصفاة معدنية أو مرشح من القطن .
- إذا بقي على المصفاة أو على مرشح القطن قطع رقيقة متخثرة أو مواد متقيحة فيدل ذلك على التهاب الضرع .

6 – فحص الضرع من الخارج :

يتصف الضرع السليم بليونة ملمسه أما الضرع المصاب فيصبح أشد صلابة وأقل مرونة .

7 – اختبار درجة الحموضة :

يؤدي التهاب الضرع إلى تبدلات محسوسة في مكونات الحليب حيث تزداد بعض البروتينات الذائبة وكلور الصوديوم وينخفض المحتوى من الكازئين وكلوريد الكالسيوم مما يؤثر على درجة الحموضة الطبيعية فتنخفض إلى أقل من $14^{o}D$ وبالمقابل يرتفع رقم الحموضة pH إلى 7 .

8 – اختبار رقم الـ pH بالدلائل الملونة :

تستخدم الطرق اللونية لقياس رقم الحموضة نظراً لسهولتها وبساطتها وسرعتها ولكنها أقل دقة ويوضح الجدول التالي أهم المواد المستخدمة ونوعية الحليب :

اللون الناتج			
دلالة رقم الـ pH **نوعية الحليب**	**6.4 وما دون** **حليب حامضي**	**6.8 – 6.6** **حليب طبيعي**	**6.9 وما فوق** **حليب قلوي**
بروموكريزول الأرجواني (محلول مائي0.2%)	رمادي ثم أصفر مخضر	رمادي – أزرق	أزرق ثم بنفسجي
أزرق بروموتيمول (محلول كحولي0.5% درجة الكحول60%)	أصفر	أخضر مصفر	أخضر - أزرق
أليزارين سيلفونات الصوديوم (محلول مشبع في الكحول 68%)	وردي ثم بني مصفر	لون ليلكي	أحمر غامق بنفسجي

9 – اختبار الكلور :

1 – المبدأ : يعتمد اختبار الكلور على التفاعل بين كرومات البوتاسيوم ونترات الفضة حيث يتشكل اللون الأحمر الناتج عن كرومات الفضة ولذلك عند إضافة الحليب فإن أملاح الكلور الموجودة تتحد مع كرومات الفضة مشكلة راسب كلور الفضة .

2 – المواد اللازمة :

2 – 1 نترات الفضة 1.34 غ/اللتر

2 – 2 كرومات البوتاسيوم 10% .

3 – طريقة العمل :

3 – 1 يوضع 5مل من نترات الفضة ضمن أنبوب اختبار .

3 – 2 يضاف عدة نقاط من كرومات البوتاسيوم حيث يتشكل اللون الأحمر .

3 – 3 يضاف 10 مل من الحليب المختبر ويسجل اللون الناتج .

4 – تفسير النتائج :

يدل زوال اللون وتحوله إلى الأصفر على أن لتراً من الحليب يحتوي على كمية زائدة من الكلور أكثر من 1.4 غ/اللتر أو أكثر من 2.3غ/في اللتر من كلور الصوديوم .

عند تجاوز معدل كلور الصوديوم أكثر من 2.3غ/اللتر فيدل ذلك على التهاب الضرع .

10 – اختبار المنفحة :

عند حدوث مرض التهاب الضرع يرتفع رقم الحموضة الـ pH إلى 7 وينخفض معدل الكازئين والكالسيوم مما يزيد من الزمن اللازم للتخثر أو أن الحليب لا يتخثر ولذلك يمكن مقارنة الزمن اللازم لتخثر الحليب الشاهد بالمنفحة مع الحليب المختبر بإضافة نفس الحجم من المنفحة وتقدير الزمن اللازم للتخثر وفق طريقة بريدج Berridge .

11 – الكشف عن المضادات الحيوية :

1 – الهدف : البحث عن وجود مضادات للبكتريا في الحليب المستخدم لصناعة الألبان المتخمرة .

2 – المبدأ : تقدير ارتفاع درجة الحموضة المتطورة الناجمة عن إضافة بكتريا حمض اللبن إلى الحليب المختبر .

3 – الأدوات المطلوبة :

3 – 1 - حمام مائي درجة حرارته 45°م .

3 – 2 – أنابيب اختبار .

4 – طريقة العمل :

4-1- تؤخذ ثلاثة أنابيب اختبار ويوضع ضمن الأول 2 مل من الحليب المختبر وضمن الأنبوب الثاني 2 مل من الحليب الشاهد وضمن الأنبوب الثالث 2 مل من الحليب مع إضافة 0.01 وحدة دولية من البنسلين .

4-2- توضع الأنابيب الثلاثة في الحمام المائي على درجة حرارة 100°م لمدة 5 دقائق .

4-3- تبرد الأنابيب إلى درجة حرارة 45°م .

4-4- يضاف لكل أنبوب 0.2 مل من بكتريا حمض اللبن Str.thermophilus. الناتج من خليط يتكون من :

- 10مل من مزرعة طازجة للبكتريا Str.thermophilus
- 5مل من محلول معقم يحتوي على 10% من مستخلص الخميرة .
- 10مل من برومو كريزول الأرجواني المعقم 0.25% .

4-5- ضع الأنابيب بعد المزج في الحمام المائي على درجة حرارة 45°م لمدة ساعتين ونصف .

5 – تفسير النتائج :

الأنبوب الثالث : يجب أن يبقى أزرق اللون .

الأنبوب الثاني : يصبح أصفر اللون .

الأنبوب الأول : إذا بقي اللون أزرق أو أصبح اللون بين الأزرق واللون الثاني يعتبر الحليب إيجابياً ويحتوي على المضادات الحيوية . ويمكن استخدام الطريقة السريعة وفق الخطوات التالية :

1 – يوضع 10مل من الحليب ضمن أنبوب اختبار ويسخن لمدة 15 دقيقة على درجة حرارة 80°م .

2 – يبرد الحليب إلى درجة حرارة 45°م .

3 – يضاف بادئ اللبن الخاثر بمعدل 2% ويحضن لمدة 3 ساعات وتسجل النتائج :

- عند تخثر الحليب لا يوجد مضادات حيوية .
- عدم ارتفاع درجة الحموضة وبقاء الحليب على الحالة السائلة يدل على وجود مضادات حيوية

12 – تعداد الخلايا الجسدية :

Dϑnombrement des cellules somatiques

توجد خلايا عديدة ومتنوعة في الحليب وهي في الغالب متكونة من الخلايا الطلائية والكريات البيض

1 – الهدف : تحديد محتوى الحليب من الخلايا الجسدية للحكم على نوعيته .
2 – المبدأ : تكوين الخلايا الجسدية بمادة ملونة فتتشكل معقدات مفلورة بفعل DNA الخلايا الجسدية تتحول إلى أشعة يمكن كشفها بجهاز Fossmation 900 .
3 – المواد اللازمة : مادة ملونة من Bromure dethpidium .
4 – الأدوات :
4-1- محقن خاص سعته 500 ميكرولتر .
4-2- جهاز Fossmation 900 .
5 – طريقة العمل :
5-1- سخن الحليب حتى درجة حرارة 40°م .
5-2- احقن 500 ميكرو لتر من الحليب ضمن الجهاز حيث يتم خلطه مع المادة الملونة وانتظر مدة 30 ثانية .
5-3- سجل عدد الخلايا الجسدية / 1مل الموجودة على شاشة الجهاز .
6 – تفسير النتائج :
يعتبر حليب الأبقار مقبولاً عندما يكون محتواه أقل من 400.000/مل .

13 – تعداد الخلايا البيض عديدة النوى :

1 – المبدأ : تحضير الأغشية من الحليب الناتج عن التهاب الضرع وتثبيت الغشاء باستخدام إحدى الصبغات كالفوكسين أو أزرق الميثلين والقيام بعد الكريات البيض عديدة النوى باستخدام العدسة الغاطسة للمجهر .

2 – المواد اللازمة :
2-1- كحول إتيلي نقي .
2-2- كحول إتيلي 60% .
2-3- صبغة أزرق المثيلين .
2-4- زيلول .
2-5- شريحة زجاجية لها مربعات معروفة المساحة .
2-6- ماصة شعرية 0.01مل .

3 – طريقة العمل :
3-1- يوضع 0.01 مل من الحليب المختبر على الشريحة الزجاجية وتوزع بشكل منتظم .
3-2- تجفف الشريحة في الحاضنة على درجة حرارة 37°م لعدة دقائق .
3-3- تغمر الشريحة في الكحول لمدة 5 دقائق لتثبيت الغشاء .
3-4- تعاد الشريحة إلى الحاضنة لتجفف خلال 5دقائق .
3-5- تغمر الشريحة من جديد ضمن الزيلول لمدة 5 دقائق .
3-6- تغسل الشريحة بالكحول 60% وتجفف من جديد .

3-7- تصبغ الشريحة بأزرق الميثلين لمدة خمس دقائق .
3-8- تغسل الشريحة بالكحول 60% وتجفف من جديد .
3-9- تفحص الشريحة بالعدسة الغاطسة .
تعد الكريات البيض عديدة النوى في الحقل ثم في 1مل من الحليب .

4 – تفسير النتائج :

يعتبر الحليب طبيعياً عندما يكون محتواه من الخلايا أقل من 400.000/مل أما إذا تجاوز العدد 500.000/مل فيعتبر حليب الأبقار غير طبيعي ويدل على حالة مرضية أما عدد الخلايا في حليب الأغنام والماعز يعتبر طبيعياً عند وجود 500.000/مل .

(6) – التحليل الميكروبيولوجي للحليب الخام :

Analyse bactɵriologique du lait cru

لدفع ثمن الحليب :

1 – طرق الإرجاع (خاصة في الحليب غير المبرد)

أخذ العينات : يجب أن يطبق أخذ العينات لدى المنتجين بمعدل مرتين في الشهر إذا كان المنتج من الصف الأول وثلاث مرات شهرياً إذا كان المنتج يتعامل لأول مرة وبمعدل أربع مرات شهرياً إذا كان يتم جمع الحليب صباحاً ومساءً .

1-1 حفظ العينات :

يجب إدخال العينات إلى المخبر بأسرع وقت ممكن مع المحافظة على درجة حرارة 4°م .

1-2- تحديد النوعية البكتريولوجية :

الأدوات اللازمة :

- أنابيب اختبار معقمة 160×16مم .
- سدادات مطاطية معقمة .
- محقن آلي 2مل ومنظم على 1مل .
- حمام مائي على درجة حرارة 37°م ومزود بغطاء معقم .

1-3- طريقة العمل :

- حرك العينة وجانسها وانزع السدادة .
- أدخل بشكل معقم 10مل من الحليب ضمن الأنبوب المعقم .
- أضف باستخدام المحقن 1مل من أزرق الميثلين R5 أو 1 مل من ريزازورين R21 .
- امزج واخلط الحليب مع المادة الملونة بعد وضع السدادات .

- ضع الأنابيب في الحمام المائي على درجة حرارة 37°م مع الانتباه إلى وضع الغطاء لتجنب وصول الأشعة .
- سجل الزمن اللازم لإزالة اللون في حالة أزرق الميثلين أما في حالة الريزازورين فسجل اللون الناتج بعد مدة ساعة . وقارن لون الأنبوب مع ألوان جهاز المقارنة وسجل الرقم المطابق حيث تتدرج الألوان من الصفر اللون الأبيض إلى 6 اللون الأزرق وتعطى درجة لنوعية الحليب وفقاً للجدول التالي :

الزمن اللازم لإرجاع الميثلين	رقم اللون الناتج بعد مدة ساعة للريزازورين	الدرجة
أقل من ساعة ونصف	0 و 1	1
بين ساعة ونصف وثلاث ساعات	2 و 3	2
أكثر من ثلاث ساعات	4 و 5 و 6	3

4-1- تصنيف الحليب :

يصنف الحليب في نهاية الشهر ضمن ثلاثة صفوف ويمكن إعطاء الدرجة النهائية للحليب وفق مجموع الاختبارات المطبقة في الشهر وفق الجدول الآتي :

الصف	أربعة اختبارات شهرياً	ثلاثة اختبارات شهرياً	اختباران شهرياً
الأول	3 . 3 . 3 . 3 2 . 3 . 3 . 3 1 . 3 . 3 . 3 1 . 2 . 3 . 3	3 . 3 . 3 2 . 3 . 3	3 . 3 2 . 3
الثاني	1 . 2 . 3 . 3 1 . 1 . 3 . 3 2 . 2 . 2 . 3 1 . 2 . 2 . 3 1 . 1 . 2 . 3 2 . 2 . 2 . 2 1 . 2 . 2 . 2	1 . 3 . 3 2 . 2 . 3 1 . 2 . 3 2 . 2 . 2	1 . 3 2 . 2
الثالث	1 . 1 . 1 . 3 1 . 1 . 2 . 2 1 . 1 . 1 . 2 1 . 1 . 1 . 1	1 . 1 . 3 1 . 2 . 2 1 . 1 . 2	1 . 2 1 . 1

2– طريقة التعداد الكلي :

2-1- الطريقة الرسمية أو طريقة العد القياسي .

2-2- الطريقة المبسطة (خاصة في الحليب المبرد أو بعد أقل من ساعتين من الحلابة)

2-2-1 الأدوات اللازمة :

- محقن آلي 2مل .
- حلقة من البلاتين حجمها 0.001مل (حلقة Burri)
- أطباق بتري معقمة .
- حمام مائي 47°م .
- حاضنة منظمة على درجة حرارة 30°م .

2-2-2- طريقة العمل :

- جانس وحرك عينة الحليب وانزع السدادة .
- ثبت الحلقة على ساق المحقن بزاوية مائلة45°م وعقم المحقن مع الحلقة ضمن ماء مغلي لمدة 10دقائق .
- خذ عينة بالحلقة البلاتينية وضعها ضمن طبق بتري بضغط أسطوانة المحقن .
- عقم الحلقة على اللهب بعد غسلها بالماء ثلاث مرات لأخذ العينة الآتية .
- صب حوالي 10مل من الوسط المناسب .
- حرك الطبق خلال 15 ثانية لخلط العينة مع الجيلوز .
- اترك الأطباق جانباً حتى يتصلب الجيلوز وضع الأطباق ضمن الحاضنة على أغطيتها على درجة حرارة 30°م لمدة 3أيام .

2-2-3- قراءة النتائج :

احصِ عدد المستعمرات في الطبق أو في نصفه أو في العشر ويعبر عن العدد الكلي في مل من الحليب وفق ما يلي :

1 – يضرب العدد بـ 1000 عند عد المستعمرات في الطبق كله .

2 – يضرب العدد بـ 2000 عند عد المستعمرات في نصف الطبق .

3 – يضرب العدد بـ 10000 عند عد المستعمرات في عشر الطبق .

وتعطي الدرجات الآتية وفقاً لعدد الجراثيم /مل .

الدرجة	1	عند احتوائه على أكثر من 500.0000 جرثومة /مل .
	2	عند احتواء الحليب بين 10.000 و 500.000 جرثومة /مل
	3	عند احتواء الحليب على أقل من 100.000 جرثومة /مل .

2-2-4- التصنيف الشهري للحليب :

يصنف الحليب وفق الجدول التالي :

الصف	أربعة اختبارات	ثلاثة اختبارات /	اختباران في

	شهرياً	شهرياً	الشهر
الأول	3 . 3 . 3 . 3 2 . 3 . 3 . 3 1 . 3 . 3 . 3 2 . 2 . 3 . 3	3 . 3 . 3 2 . 3 . 3	3 . 3 2 . 3
الثاني	1 . 2 . 3 . 3 1 . 1 . 3 . 3 2 . 2 . 2 . 3 1 . 2 . 2 . 3 1 . 1 . 2 . 3 2 . 2 . 2 . 2 1 . 2 . 2 . 2	1 . 3 . 3 2 . 2 . 3 1 . 2 . 3 2 . 2 . 2	1 . 3 2 . 2
الثالث	1 . 1 . 1 . 3 1 . 2 . 2 . 3 1 . 1 . 1 . 2 1 . 1 . 1 . 1	1 . 1 . 3 1 . 2 . 2 1 . 1 . 2 1 . 1 . 1	2 . 1 1 . 1

(7) - التحليل البكتريولوجي للحليب الخام والحليب الخام الموجه لتحضير الحليب المبستر :

Analyse bact9riologique du lait cru

1 – الحليب الخام الموجه إلى الاستهلاك :

1-1- تحضير العينات :

1-1-1- أخذ العينة :

يجب أن تبرد العينة المأخوذة مباشرة إذا كان ذلك في المزرعة أو في وحدة التصنيع وتحفظ على درجة حرارة 4°م .

1-1-2- تحضير العينة للتحليل :

- اسحب العينة وحركها خلال عدة ثوان .
- عقم عنق العبوة في محلول كحولي 0.1% من اليود .
- انتظر عدة دقائق حتى يسيل السائل .
- افتح العبوة بشكل معقم .

1-2- التحاليل البكتريولوجية :

الاختبار والأحياء الدقيقة	مادة التفاعل والوسط المستخدم	الكمية – التمديد
إرجاع اللون	R5	10مل
مضادات حيوية	اختبار ارتفاع درجة الحموضة	
الجراثيم الكلية	M42 أو M59/72ساعة على درجة حرارة 30°م	3- حتى 7-
الجراثيم المتحملة للحرارة المرتفعة	M42 أو M59 72ساعة/30°م	2- و 3-
البكتريا اللا هوائية المنتجة للغازات	M25 أو M12	1مل و-1حتى-3
اختبار الغليان		5-10مل
اختبار الكحول		2مل

1-3- النتائج :

طبق تعداد المستعمرات كما ذكر سابقاً في التعداد الكلي .

1-4- تفسير النتائج :

يعتبر الحليب غير صالح للاستهلاك البشري .

- إذا احتوى على المضادات الحيوية أو المواد المعقمة .
- إذا تخثر في الغليان .
- إذا لم تكن نتيجة التعداد الكلية جيدة .

وعند لحظة المبيع يجب ألا يرجع لون أزرق الميثلين في أقل من 5 ساعات .

(8) – تحليل الحليب الخام بكتريولوجياً الموجه لتحضير الحليب المبستر عالي الجودة :

Analyse bactϑriologique du lait distinϑe a' la prϑparation du lait pasteurisϑ de haut qualitϑ

1 – أخذ العينة :

- اختبار الحليب الخام من وصوله إلى المعمل ويكمن تطبيقه في المزرعة مع ضرورة حفظ الحليب على درجة حرارة منخفضة .
- تطبيق الاختبار على الحليب الخام قبل البسترة .

2 – تحضير العينة :

- حرك العينة خلال مدة 10 عشر ثوان .
- عقم رقبة العينة بمحلول معقم لليود في الكحول 0.1% .
- افتح العبوة وطبق التحاليل .

3 – التحليل الميكروبيولوجي :

الاختبار والأحياء الدقيقة	مادة التفاعل أو الوسط المستخدم	الكمية والتمديد
اختبار الحليب الخام عند وصوله إلى المصنع		
الإرجاع الميكروبي تحديد النظافة التعداد الميكروبي	R5 (أزرق الميثلين) M42 خلال 72ساعة/30°م	10مل -2 ، -3
اختبار قبل البسترة		
التعداد بطريقة بريد المضادات الحيوية ومضادات البكتريا	R20 اختبار ارتفاع درجة الحموضة	0.01 مل

تفسير النتائج :

يمتـاز الحليـب الخـام الموجـه إلـى تحضـير الحليـب المبسـتر عـالي الجـودة بالخصائص الآتية :

- عدم احتوائه على أكثر من 500.000 جرثومة /مل .
- عدم احتوائه على المضادات الحيوية والمواد المعقمة .
- عدم إرجاع أزرق الميثلين في أقل من 5 ساعات .
- نظيف عند تطبيق اختبار النظافة بالترشيح .

(9) - مراقبة ثباتية الحليب المركز غير المحلى :

Contrôle de la stabilité du lait concentré non sucré

1 – أخذ العينات : مهما تكن نوعية التحاليل كيميائية أو فيزيائية أو ميكروبيولوجية يجب أخذ خمس وحدات مصنعة حيث يخضع قسم منها إلى التحضين كما يلي :

- تحضين وحدتين على درجة حرارة 55°م لمدة عشرة أيام .
- تحضين وحدتين على درجة حرارة 30°م خلال 21 يوماً .
- عينة تعتبر كشاهد إذا لم تخضع إلى التحضين .

2 – اختبار الوحدات خلال التحضين :

انتبـه يومياً للكشـف عـن احتمـال وجـود تحلـل لـبعض الوحـدات الموجـودة فـي التحضين على درجة حرارة 30°م و 55°م .

2-1- طريقة العمل :

خذ الوحدة ورجها بالقرب من الأذن ولاحظ الصوت .

2-2- تفسير النتيجة :

إذا لوحظ وجود صوت باهت أو ثقيل أو عدم وجود الصوت يمكن التمييز والدلالة على وجود تحلل وفساد وفي هذه الحالة الأخيرة اسحب الوحدة من الحاضنة وافتحها فالوحدات المتخثرة خلال الحضانة تعتبر منتجات غير مستقرة سجل عدد الأيام التي بقيت فيها العينات غير متحللة .

3 – اختبار العبوة غير المحضنة :

3-1- أخذ العينة لإجراء التحليل البكتريولوجي :

- يجب فتح عبوة الحليب المركز بعناية كبيرة وضمن ظروف معقمة .
- جانس العبوة بقلبها عدة مرات .
- عقم سطح الغطاء بالقطن والكحول الإتيلي 95% .
- طبق عملية التنظيف مرتين .
- ضع عدة نقاط من الكحول على الغطاء وجفف .
- افتح العبوة ضمن ظروف معقمة باستخدام مطرقة وقطعة من الحديد غير قابل للأكسدة المعقمة بالكحول واثقب الغطاء في نقطتين متقابلتين قطرياً .
- خذ 15مل من الحليب وأدخلها ضمن أنبوب اختبار معقم 200×20 مم للتحليل البكتريولوجي .

3-2- الاختبار الحسي : سجل المظهر ، والرائحة والطعم .

فإذا أبرزت العينة أي حالة غير طبيعية يعتبر الحليب غير طبيعي ويجب الكشف عن وجود طعم المرارة .

3-3- الاختبارات الفيزيائية الكيميائية :

3-3-1- رقم الحموضة : قدر رقم حموضة العينات التي خضعت إلى التحضين والعينة غير المحضنة . عند وجود فرق أعلى من 0.1 وحدة pH يدل على أن الحليب غير طبيعي .

3-3-2- اختبار الكحول 68% :

أدخل ضمن أنبوب اختبار 160×16مم .

- حليب ممدد 2مل .
- كحول إتيلي 2مل 68% .
- امزج واخلط بشدة .

فإذا كان الخليط سائلاً ولم يترك أثراً على طول جدار الأنبوب يعدّ الحليب طبيعياً، أما إذا ترك خثرات صغيرة يظهر الحليب غير طبيعي ويكون في الغالب حامضياً .

3-3-3- اختبار الغليان :

أدخل 5 مل من الحليب الممدد ضمن أنبوب اختبار 160×16مم وسخنه ضمن حمام مائي مغلي لمدة 5 دقائق . إذا بقي الحليب سائلاً فيدل على أنه طبيعي وإذا تخثر الحليب وانفصل المصل فيدل على أنه غير طبيعي .

3-3-4- الكشف عن وجود تخثر بسيط :

- أدخل ضمن أنبوبة جهاز الطرد المركزي كمية من الحليب الممدد المراد اختباره .
- طبق الطرد المركزي لمدة خمس دقائق على سرعة 1000 دورة/دقيقة .
- اسحب الأنبوبة من جهاز الطرد المركزي .

لاحظ تشكل الراسب في قاع الأنبوبة ، فإذا لم يتشكل الراسب فيدل على أن الحليب طبيعي .

3-4- الفحص المجهري :

- حضر عينة من الحليب المركز المحلى الممدد .
- خذ بالماصة 0.01 مل وضعها على مساحة 1سم^2 .
- جفف بلطف بعيداً عن الغبار .
- تخلص من المادة الدسمة بخليط من الكحول والأسيتون .
- جفف ولون خلال مدة دقيقتين بأزرق الميثلين R12 .
- اغسل بالماء وجفف بلطف .
- افحص بالعدسة الغاطسة عند تكبير 800 إلى 1000 .
- سجل عدد البكتريا الملونة بالأزرق ضمن عشر حقول .

عند وجود أكثر من 2 من الجراثيم الملونة في حقل مجهري يدل على أن نوعية الحليب سيئة .

3-5- التحاليل البكتريولوجية :

يطبق التحليل الميكروبيولوجي للكشف عن نموذجين من الجراثيم :

- الجراثيم الهوائية والجراثيم الهوائية – اللاهوائية الإختيارية الأليفة لدرجة الحرارة المتوسطة والمرتفعة .
- الجراثيم اللاهوائية والهوائية اللاهوائية الإختيارية الأليفة لدرجة الحرارة المتوسطة والمرتفعة .

بالإضافة إلى البحث عن البكتريا المتبوغة التي يصعب إتلافها بالمعاملة الحرارية المرتفعة أو الملوثة أحياناً بعد التعقيم .

3-5-1- تعداد البكتريا الهوائية والهوائية – اللاهوائية الإختيارية المحبة لدرجة الحرارة المتوسطة والمرتفعة على وسط الجيلوز ومستخلص الخميرة والنشاء M57 .

2-5-3- تعداد البكتريا اللاهوائية والهوائية - اللاهوائية الإختيارية الأليفة لدرجة الحرارة المتوسطة والمرتفعة على وسط الجيلوز M53 وفق المخطط الموضح في الجدول التالي :

مخطط الزرع	نموذج التحضين	تعداد البكتريا على وسط			
		M57		M53	
		30°م	55°م	30°م	55°م
	عينة غير محضنة	1مل×3	1مل×3	1مل×3	1مل×3
	عينتين محضنتين على 55°م/10أيام		1مل×3		1مل×3
	عينتين محضنتين على 30°م/21يوماً	1مل×3		1مل×3	

4 – فحص العينات المحضنة على درجة حرارة 55°م و 30°م :

عند سحب العينات من الحضانة فإنها تخضع إلى الاختبارات الآتية للوحدات غير المتحللة :

4-1- أخذ العينة :

يطبق أخذ العينة على العبوات الأربعة كما ذكر سابقاً في 3-1 للتحليل الميكروبيولوجي .

4-2- الاختبار الحسي :

يجب عدم تطبيق الاختبار الحسي على العينة التي تعرضت للتحضين ويمكن فقط تقدير وملاحظة اللون .

4-3- الاختبار الفيزيائي الكيميائي :

طبق نفس الاختبارات كما ذكر سابقاً في 3-3 .

4-4- الاختبار المجهري :

اختبار اختياري ولكنه مفيد في كشف الوحدات المحضنة على درجة حرارة 55°م و 30°م ويطبق كما ذكر في 3-4 .

4-5- تحليل ميكروبيولوجي :

طبق الاختبارات نفسها المطبقة في 3-5 . ويراعى عند التحضين أن تترك الأطباق على درجة حرارة 55°م لمدة 72ساعة وكذلك الأمر أن تترك الأنابيب والأطباق على درجة حرارة 30°م لمدة 72 ساعة مع الانتباه إلى ضرورة وضع طبقة من المادة المعقمة على حواف الأطباق التي تحضن على 55°م لتجنب تجفافها .

5 – النتائج :

5-1- اختبار الأطباق وعدد المستعمرات :
يجب تطبيق تعداد المستعمرات باستخدام جهاز العد الضوئي .
5-2- اختبار الأنابيب :
افحص أمام مصدر ضوئي وجود نمو ميكروبي على سطح الجيلوز .

6 – تفسير النتائج :
- يجب ألا يحتوي الحليب المركز غير المحلى على الجراثيم الممرضة أو المفرزة للمواد السامة .
- يجب ألا يتجاوز عدد الأبواغ 5 في مل .
- يجب أن تتطابق خصائص الحليب واختبارات الثباتية .
- عند التحضين : عدم وجود تحلل وفساد .
- اختبارات فيزيائية وكيميائية : حليب طبيعي يجب ألا يتغير رقم pH أكثر من 0.5 وحدة مقارنة مع الشاهد .
- اختبارات المجهر : عدم وجود أو وجود أقل من 2 بكتريا ملونة في الحقل المجهري .

(10) - التحليل الميكروبيولوجي للحليب المركز المحلى :
Analyse bact9riologique du lait concentr9 sucr9

1- تحضير العينة .
يطبق التحليل المكيروبيولوجي على محلول ممدد إلى الثلث للحليب المركز المحلى .
تؤخذ العينة وفق الطريقة التالية :
- تنظف بعناية غطاء العبوة باستخدام قطعة من القطن المغمورة في الكحول الإتيلي بمعدل مرتين مع قطعة القطن في كل مرة .
- توضع عدة نقاط من الكحول على الغطاء ويجفف الغطاء .
- يعقم مفتاح العلبة ويجفف وتفتح العبوة .
- تستخدم ماصة واسعة لأخذ كمية من الحليب المركز 30غ وتدخل ضمن دورق معياري معقم .
- يضاف 60 مل أو 60غ من محلول رانجر الممدد إلى الربع .

2 – التحليل الميكروبيولوجي :

الأحياء الدقيقة	الوسط المستخدم	التحضين	كمية الممدد
جراثيم هوائية محبة لدرجة الحرارة المتوسطة	M59	30°م-72ساعة	1مل على -2 بشكل مضاعف
بكتريا الكوليفورم	M64 M63 (احتياطياً)	30°م-48 ساعة 30°م-20-24ساعة	1مل×3 واحتمالياً -1

الخمائر والفطور	M44 أو M52	20-25°م/5أيام	1مل على -1 بشكل مضاعف
S.aureus	M68	37°م-48ساعة	10 مل على -1
C.SULFITO Reducteur	M54	37°م-24-72ساعة	5 مل × 2 احتياطياً
C.perfrigens	الاختبار العاصف	أو46°م-18ساعة	1 مل × 2
Salmonella	أو M26 M70		5مل ×2
			25-50غ

3 – النتائج :

يعبر عن النتائج بعدد الأحياء الدقيقة في غرام من الحليب المركز المحلى علماً أن 1مل من المحلول يساوي ثلث غ من الحليب المركز المحلى .

4 – تفسير النتائج :

- يجب أن يكون الحليب خالياً من الأحياء الدقيقة القادرة أن تحلل وتفسد الحليب.
- يجب أن يكون المحتوى من البكتريا الهوائية أقل من 30.000 / الغرام .
- يجب أن يكون عدد الكوليفورم أقل من 1 في الغرام .

يضاف إلى ذلك :

- عدم وجود البكتريا العنقودية الذهبية في 3غ من المنتج .
- عدم وجود السالمونيللا في 25غ من المنتج .
- عدد أبواغ C.sulfitoreducteur 9 كحد أقصى في 3غ من المنتج .
- عدد الخمائر أقل من 50 خلية/غ وكذلك الفطور .
- عدم وجود أبواغ C.perfrigenes في 3غ من المنتج .

(11) - مراقبة ثباتية الحليب المعقم :

Contrôle de la stabilitϑ du lait sterilisϑ

1 – عدد العينات المأخوذة والتحضين :

يجب أخذ خمس عبوات لنفس عملية التصنيع حيث :

- تحضن عينتين على درجة حرارة 55°م لمدة 7-10 أيام .
- تحضن عينتين على درجة حرارة 30°م لمدة 14-21 يوماً .
- يحتفظ بالعينة الأخيرة لاستخدامها كشاهد .

2 – فحص العينات خلال التحضين :

تطبق نفس الخطوات المشار إليها في الحليب المركز غير المحلى .

3– فحص العينة غير المحضنة والعينات المحضنة :

تطبق نفس الخطوات المشار إليها في الحليب المركز غير المحلى .

3-1- أخذ العينات : مثل الحليب المركز غير المحلى .

3-2- الفحص الحسي : مثل الحليب المركز غير المحلى .

3-3- الفحص الكيميائي والفيزيائي :
تطبق الاختبارات التالية بدون تمديد :
- رقم الحموضة .
- اختبار الكحول 68% .
- اختبار الغليان .
- اختبار الترسيب لمعرفة وجود تخثر بسيط .

4 – الفحص البكتريولوجي :

- طبق الاختبارات على العينات الخمسة مثل الحليب المركز غير المحلى واستخدم أوساط الزرع M53 , M57 , M59 .
- طبق الحضانة على درجة حرارة 30°م خلال 72ساعة للأطباق واحتمالياً للأنابيب ولتلافي تجفاف الأطباق عند الحضانة على درجة حرارة 55°م يفضل بعد تصلب الوسط قلب الطبق إدخال 1 مل من دهن النفط المعقم على الطرف الداخلي لغطاء الطبق بغية تجنب تجفاف الوسط .

ونوضح فيما يلي مخطط الزرع :

نموذج العينات	تعداد الجراثيم باستخدام أوساط مختلفة			
	M57		M53	
	30°م	55°م	30°م	55°م
عينة غير محضنة	2×1مل 2×0.1مل	2×1مل 2×0.1مل	2×1مل 2×0.1مل	2×1مل 2×0.1مل
عيّنتان محضنتان على 55°م		2×1مل 2×0.1مل		2×1مل 2×0.1مل
عيّنتان محضنتان على 30°م	2×1مل 2×0.1مل		2×1مل 2×0.1مل	

5– نتائج التحليل البكتريولوجي :

عند أخذ الأطباق والأنابيب من الحاضنة احصِ عدد المستعمرات الموجودةفي1مل و0.1 مل من الحليب

6– تفسير النتائج :

6-1- يجب ألا يحتوي الحليب المعقم على جراثيم ممرضة أو جراثيم منتجة للمواد السامة أو الأحياء الدقيقة القابلة للنمو والتزايد .
6-2- يجب أن يبقى الحليب ثابتاً بعد الحضانة لمدة 21 يوماً على درجة حرارة 31°م ولمدة 10 أيام على درجة حرارة 55°م .
6-3- يجب ألا يكون الفرق بين رقم حموضة العينة المحضنة مقارنة مع العينة غير المحضنة أكثر من 0.2 وحدة pH أما بالنسبة للحليب المعطر والمنكه يمكن أن يصل الفرق إلى 0.3 وحدة pH .

6-4- إذا لم يلاحظ أي تحلل عند تطبيق الاختبارات الفيزيائية والكيميائية يمكن أن نعتبر أن الحد الأعلى 100 لعدد الجراثيم في مل من الحليب .

7 – مراقبة التجنيس .

(12) – التحليل الميكروبيولوجي للحليب المجفف :

Analyse microbiologique du lait deshydraté

1 – تحضير العينة :

- أدخل 10غ من بودرة الحليب ضمن دورق معياري معقم له فتحة واسعة .
- أضف 90غ أو 90مل من محلول تريبتون ملح أو محلول رانجر الممدد إلى الربع المعقم والمسخن على درجة حرارة 47°م .
- جانس الخليط .
- ضع الدورق في حمام مائي على درجة حرارة 47°م لمدة خمس دقائق .
- امزج جيداً من جديد خلال مدة 5 دقائق باستخدام خلاط كهرومغناطيسي .
- ضع الدورق من جديد ضمن الحمام المائي على درجة حرارة 47°م لعدة دقائق ثم طبق التحاليل المطلوبة .

2- التحاليل الميكروبيولوجية :

الأحياء الدقيقة	الوسط المستخدم	التحضين	الكمية الممددة المستخدمة
جراثيم هوائية	M59	30°م/72ساعة	1-،2-،3- وبشكل مضاعف
كوليفورم احتياطياً	M64 M63	30°م/48ساعة 30°م/20-24ساعة	0.7مل×0.6،2مل 1مل ، 1-
الخمائر والفطور العنقودية الذهبية C.sulfitoreducteur الكوستريديوم المرجعية	M52 أو M44 M68 M54 أو M54	20-25°م/5أيام 37°م/48ساعة 37°م/48ساعة 46°م/18ساعة	1مل،1- وبشكل مضاعف 10مل ،1مل 5مل×2 1مل (احتياطياً)
C.perfringens Salmonella السالمونيللا	M26 M70	37°م/6-7أيام 37°م/18-24ساعة	5مل×2 100غ أو 25غ

3 – النتائج :

الكوليفورم : قدر انطلاق الغاز الذي يدل على تخمر اللاكتوز عندما تكون الأنابيب الثلاثة للوسط M64 إيجابية فيدل على وجود 5 بكتريا من الكوليفورم في غ من الحليب المجفف أي 1 بكتريا من الكوليفورم في 2مل من المحلول 10% أي في 0.2غ من الحليب المجفف .

يطبق الاختبار التالي لمعرفة عدد بكتريا الكوليفورم في الحليب الموجه إلى الصناعات الغذائية .

- مدد 1مل من المحلول 10% للحليب المجفف ضمن 4مل من محلول تربيتون – ملح .
- لقح اعتباراً من التمديد الجديد $\frac{1}{5}$ ثلاثة أنابيب تحتوي على الوسط M64 بمعدل 0.7 مل×2 و0.6 مل أي 0.04 غ من الحليب المجفف .
- حضن خلال مدة 48 ساعة على درجة حرارة 30°م .
- افحص الأنابيب ولاحظ انطلاق الغاز فإذا كانت الأنابيب الثلاثة إيجابية فيدل ذلك على وجود 1 بكتريا من الكوليفورم على الأقل في 0.04غ من الحليب المجفف أي ما يساوي على الأقل 25في /غ من المنتج . بالنسبة للأحياء الدقيقة الأخرى يعبر عن النتائج بالعدد في الغرام من الحليب المجفف علماً بأن كل 1مل من المحلول 10% للحليب المجفف يساوي 0.01غ من الحليب المجفف .

4- تفسير النتائج :

يجب أن يتصف الحليب المجفف باحتوائه على أقل من 50.000 بكتريا/الغرام .

- وعلى أقل من 5 من بكتريا الكوليفورم في الغرام .
- عدم وجود السالمونيللا في 25 أو 100غ .
- عدم وجود بكتريا العنقودية الذهبية في 0.1غ .
- وجود الخمائر والفطور ضمن مجال 50-100 خلية في الغرام من الحليب المجفف .
- وجود 9 أبواغ في الغرام من بكتريا C.sulfitoreducteur كحد أقصى .
- عدم وجود C.perfringens في 1غ من الحليب المجفف .

(13) – التحليل البكتريولوجي لمنتجات الألبان المتنوعة :

Analyse bactɘriologique de divers produits laitiɘrs

1-13 اللبن الخاثر (اليوغورت) Yaourt :

1 – تحضير العينة :

- يجب أن يطبق التحليل على خمس وحدات ناتجة عن عملية تصنيع واحدة .
- فحص البكتريا المتخصصة .

يجب أن يطبق التحليل خلال فترة 4أيام كحد أقصى بعد التصنيع .

- فحص المعايير الصحية .

يجب أن تطبق التحاليل خلال الفترة الفاصلة بين التصنيع وانتهاء الصلاحية .

1-1- تحضير العينة للتحاليل :

- انزع بشكل معقم غطاء العبوات .
- جانس محتويات العبوة باستخدام ملعقة معقمة بالكحول واللهب ، فيما يتعلق باللبن الخاثر بالفواكه يجب مجانسة العينة ضمن خلاط مناسب خلال مدة دقيقة .

1-2- تحضير معلق 10% لمعرفة عدد البكتريا المتخصصة :

- استخدم ملعقة معقمة بالكحول واللهب وخذ 10غ من اللبن الخاثر وضعها ضمن مخروط المجنس المعقم .
- أضف 40غ من ماء الببتون (M5) .
- جانس خلال مدة دقيقة .
- أضف 50غ من ماء الببتون .
- خلط جيداً .
- طبق التحاليل بأسرع ما يمكن .
- حضر محاليل ممددة عشرية اعتباراً من معلق الأم 10% في ماء الببتون .

1-3- تحضير معلق الأم $\frac{1}{3}$ لاختبار المعايير الصحية :

- خذ 25غ من اللبن الخاثر بشكل معقم وأدخلها ضمن دورق معقم 250مل يحتوي على خلاط مغناطيسي .
- أضف 50غ من المحلول المعقم 2% فوسفات ثنائية البوتاسيوم على رقم حموضة pH 7.6-7.4 (M9) المسخن على درجة حرارة 45-46°م .
- جانس باستخدام الخلاط المغناطيسي خلال مدة دقيقة .
- طبق التحاليل بأسرع ما يمكن باستخدام محلول المعلق الأم والممدد إلى $\frac{1}{3}$ حيث إنّ التمديد -1 يمثل $\frac{1}{30}$ من غرام اللبن الخاثر .

2 – التحاليل الميكروبيولوجية :

1-2 فحص الوحدة المصنعة وفق المخطط التالي :

الأحياء الدقيقة	الوسط المستخدم	التحضين	الكمية التمديد
Str.thermophilus	M17	37°م/48ساعة	7-،6-،5-
L.bulgaricus	M43	37°م/72ساعة في شروط لاهوائية	7-،6-،5-
كوليفورم	M63	30°م/22-24ساعة	1مل ، 1-
كوليفورم برازية	M63	44-45°م/22-24ساعة	ثلاثة أطباق مع 1مل
سالمونيللا	M70	37°م/18- 24ساعة	25غ من اللبن الخاثر

2-2 النتائج :

يعبر عن النتائج بعدد الأحياء الدقيقة في غرام من اللبن الخاثر .

(14) - التحليـــل البكتريولـــوجي للأجبـــان الطريـــة والمطبوخـــة وللأجبان المصهورة :

Analyse bact9riologique des fromges a' pate molle , a' pate cuite et des fromages fondus

1-14 – الأجبان الطرية :

يجب أن يتم تحليل الأجبان المصنعة سوية بين اليوم الرابع واليوم السابع من الإنتاج .

1-1- تحضير العينات :

1-1- (1) أخذ العينات :

تقدر النوعية الصحية للأجبان على خمسة أقراص من الأجبان أو خمسة أقسام لنفس قرص الجبن .

1-1-(2) تحضير معلق الأجبان :

- استخدم السكين المعقمة بالكحول واللهب في أخذ 10غ من قطاعين متقابلين من الأجبان وأدخلها ضمن خلاط معقم .
- أضف 90غ من محلول معقم 2% . فوسفات ثنائية البوتاسيوم على رقم pH 7.4-7.8 (M9) تسخن على درجة حرارة 45-46°م .
- خلط خلال دقيقة واحدة .
- طبق التحاليل المطلوبة مباشرة .

قم بتطبيق التمديدات العشرية باستخدام محلول ببتون – الملح وأن التمديد -1 يمثل $\frac{1}{100}$ غرام في الأجبان .

2-2-1 التحاليل البكتريولوجية :

الأحياء الدقيقة	الوسط	التحضين	الكمية / التمديد
الكوليفورم	M63	22-24ساعة/30°م	1مل،-1،-2،-3
E.coli	M63	22-24ساعة/45°م	1مل،-1،-2،-3
العنقودية الذهبية	M60	24-48ساعة/37°م	نشر 1مل للمعلق والتمديد -1
السالمونيللا	M70	18-24ساعة/37°م	25غ

3-2-1- النتائج :

يعبر عن النتائج بتعداد البكتريا في غرام من الأجبان مع الأخذ بعين الاعتبار أن 1مل من المعلق 0.1غ من الأجبان وأن التمديد -1 يمثل 0.01غ .
بالنسبة لـ E.coli إذا تجاوز عددها 3000/غ يجب أن نتأكد من الأنواع الموجودة وخاصة الممرضة منها .

2 – الأجبان المطبوخة والمصهورة :

2-1- تحضير العينات :

- استخدم السكين المعقمة بالكحول واللهب في التخلص من الطبقة الخارجية بسماكة 5مم وخذ 10غ من العينة وضعها ضمن مخروط مسخن معقم .
- أضف 90غ من محلول فوسفات ثنائية البوتاسيوم (M9) المسخنة على درجة حرارة 45°م .
- خلط خلال مدة دقيقة .
- انقل الخليط الناتج إلى دورق معقم وضعه ضمن حمام مائي على درجة حرارة 45°م وحرك بشكل معتدل من وقت لآخر .
- بعد 5 إلى 10دقائق حضر التمديدات العشرية المتتالية باستخدام محلول تريبتون -الملح ويمثل التمديد -1 ، $\frac{1}{100}$ غرام من الأجبان .

2-2- التحاليل الميكروبيولوجية :

الأحياء الدقيقة	الوسط المستنبت / التحضين	الكمية – التمديد
الكوليفورم	M63 / 22-24ساعة /30°م M64 /48ساعة/30°م	1مل ، -1 1مل،-1،-2،-3 وبشكل ثلاثي
E.coli	M63 / 22-24ساعة /44-46°م M14+M64/48ساعة ،44-45°م	1مل،-1،-3،2 وبشكل ثلاثي
الجراثيم المنتجة للأندول وH_2S	M34/48ساعة/30°م M69 / أو 30°م	1مل،-1،-2،-3 وبشكل ثلاثي

الخمائر والفطور	M14أوM44،M53 /5أيام / 20-25°م	1مل،-1،-2
الجراثيم اللاهوائية المنتجة للغاز	M54أوM12/72ساعة/37°م +سدادة من البرافين M16 إذا كان الاختبار سلبياً مدد التحضين 7أيام	1مل،-1،-2،-3 وبشكل ثلاثي
Clostridium من مجموعة بكتريا حمض الزبدة	M26 مع سدادة من البرافين M16 /6أيام /37°م النتيجة +=إنتاج الغاز	1مل،-1،-2،-3 وبشكل ثلاثي
C.tyrobutyricum تأكيدية	M27ازرع كل الأنابيب الإيجابية للغاز حضن 4أيام/37°م سجل إنتاج الغاز	

3-2 النتائج :

يعبر عن النتائج بعدد الجراثيم في 1غ من الأجبان علماً بأن 1مل من المحلول الممدد يساوي 0.1غ من الأجبان وأن التمديد -1 يساوي 0.1غ من الأجبان .

ملحق (1) المعايير الميكروبيولوجية لحليب الاستهلاك وفق المواصفات الأوروبية

	Micro-organismes					Teneur en germes (par ml)	
	Listeria monocytogènes dans 25 g	Salmonella spp. dans 25 g	Staphylococcus aureus (par ml)	Coliformes 30° C (par ml)	Streptocoques β-hémolytiques (dans 0,1 ml)	à 21° C	à 30° C
1	–	Absence $n = 5$ $c = 0$	$m = 100$ $M = 500$ $n = 5$ $c = 2$	$m = 100$ $M = 1000$ $n = 5$ $c = 2$	Absence $n = 5$ $c = 0$	–	< 50 000
2	Absence $n = 5$ $c = 0$	Absence $n = 5$ $c = 0$	–	$m = 0$ $M = 5$ $n = 5$ $c = 1$	–	$m = 5 \times 10^5$ $M = 5 \times 10^5$ $n = 5$ $c = 1$ (4)	–
3	–	–	–	–	–	–	< 10 pour 0,1 ml

حيث :

1- الحليب الخام .

2- الحليب المبستر
3- الحليب المعقم بـ UHT .

m عتبة عدد البكتريا في مل المسموح بها وتعتبر العينة مقبولة إذا كان عدد البكتريا في كل الوحدات المشكلة للعينة لا يتجاوز m .

M العدد الأعظمي المسموح به لعدد الأحياء الدقيقة في مل وتعتبر كل الوحدات غير مقبولة إذا كان عدد البكتريا في مل يساوي أو يتجاوز M في وحدة أو كل الوحدات المشكلة للعينة .

c عدد الوحدات التي يكون فيها عدد البكتريا في مل يتراوح بين قيمة m وقيمة M .

ملحق (2) المعايير الميكروبيولوجية الخاصة بالأجبان وفق المواصفات الأوروبية

	Listeria monocytogènes	Salmonella spp.	Staphylococcus aureus	Escherichia coli	Coliformes à 30° C
1	Absence dans 1 gramme $n = 5$ $c = 0$	Absence dans 25 grammes $n = 5$ $c = 0$			
2	Absence dans 1 gramme $n = 5$ $c = 0$	Absence dans 25 grammes $n = 5$ $c = 0$	$m = 1\,000$ M = 10 000 $n = 5$ $c = 2$	$m = 10\,000$ M = 100 000 $n = 5$ $c = 2$	
3	Absence dans 25 grammes $n = 5$ $c = 0$	Absence dans 25 grammes $n = 5$ $c = 0$	$m = 1\,000$ M = 10 000 $n = 5$ $c = 2$	$m = 10\,000$ M = 100 000 $n = 5$ $c = 2$	
4	Absence dans 25 grammes $n = 5$ $c = 0$	Absence dans 25 grammes $n = 5$ $c = 0$	$m = 100$ M = 1 000 $n = 5$ $c = 2$	$m = 100$ M = 1 000 $n = 5$ $c = 2$	$m = 10\,000$ M = 100 000 $n = 5$ $c = 2$
5	Absence dans 25 grammes $n = 5$ $c = 0$	Absence dans 25 grammes $n = 5$ $c = 0$	$m = 1\,000$ M = 10 000 $n = 5$ $c = 2$	$m = 10\,000$ M = 100 000 $n = 5$ $c = 2$	
6	Absence dans 25 grammes $n = 5$ $c = 0$	Absence dans 25 grammes $n = 5$ $c = 0$	$m = 100$ M = 1 000 $n = 5$ $c = 2$	$m = 10\,000$ M = 100 000 $n = 5$ $c = 2$	
7	Absence dans 25 grammes $n = 5$ $c = 0$	Absence dans 25 grammes $n = 5$ $c = 0$	$m = 10$ M = 100 $n = 5$ $c = 2$		
8	Absence dans 25 grammes $n = 5$ $c = 0$	Absence dans 25 grammes $n = 5$ $c = 0$	$m = 1\,000$ M = 10 000 $n = 5$ $c = 2$	$m = 10\,000$ M = 100 000 $n = 5$ $c = 2$	
9	Absence dans 25 grammes $n = 5$ $c = 0$	Absence dans 25 grammes $n = 5$ $c = 0$	$m = 10$ M = 100 $n = 5$ $c = 2$		
10	Absence dans 25 grammes $n = 5$ $c = 0$	Absence dans 25 grammes $n = 5$ $c = 0$			
11	Absence dans	Absence dans			

1- الأجبان القاسية المصنعة من حليب معامل حرارياً
2- الأجبان القاسية المصنعة من حليب خام أو معامل حرارياً
3- الأجبان الطرية مع الحليب الخام أو الحليب المعامل حرارياً
4- الأجبان الطرية مع الحليب المعامل حرارياً
5- أجبان متعفنة مصنعة من حليب معامل حرارياً أو حليب خام
6- أجبان متعفنة مصنعة من حليب معامل حرارياً
7- أجبان غير ناضجة مصنعة من حليب معامل حرارياً
8- أجبان غير ناضجة مصنعة من حليب خام
9- أجبان المصل الطازجة
10- أجبان المصل الجافة
11- أجبان أخرى مصنعة من حليب معامل حرارياً
12- أجبان أخرى مصنعة من حليب خام أو معامل حرارياً

ملحق (3) المعايير

	Listeria monocytogènes	Salmonella spp.	Staphylococcus aureus	Coliformes 30° C	Teneur en germes à 21° C	Teneur en germes à 30 ° C
1		Absence dans 25 grammes $n = 10$ $c = 0$	$m = 10$ M = 100 $n = 5$ $c = 2$	$m = 0$ M = 10 $n = 5$ $c = 2$		
2	Absence dans	Absence dans		$m = 0$		

1- بودرة الحليب

2- منتجـات مجففـة يـدخل فـي تركيبها الحليب

3- منتجـات لبنيـة سـائلة غيـر متخمرة

4- منتجات لبنية سائلة متخمرة

5- منتجـات لبنيـة سـائلة غيـر معاملة حرارياً

6- منتجات لبنية

7- الزبدة

8- منتجات لبنية أخرى

ملحق (4) بعض المحاليل المستخدمة في التحليل الميكروبيولوجي

خليط كرومات – حمض الكبريت R1 .
ثاني كرومات البوتاسيوم 60غ .
حمض الكبريت النقي 500مل .
الماء المقطر 1000مل .
أذب ثاني كرومات في الماء ثم أضف حمض الكبريت .
كاشف البحث عن الأندول R2 .
بارا داي ميثيل أمينو بنزالدهيد 5غ .
كحول اميلي أو ايزواميلي 75مل .
حرك الخليط بعد الإذابة وأضف 25مل من حمض كلور الماء كثافته 1.19 ويجب أن يكون اللون أصفرَ .
ورق مبلل في خلات الرصاص R3 .
- خذ أوراق ترشيح وقسمها إلى قطع مستطيلة 8×200مم .

- اغمر طرف الورقة ضمن محلول خلات الرصاص 3غ ضمن 15مل من الماء المقطر خلال مدة 1-2 ساعة .
- اسحب الورق وضعه ضمن حاضنة على درجة حرارة 37°م ضمن طبق بتري مفتوح.
- احفظ الأوراق ضمن أنابيب معقمة أو أطباق بتري معقمة .

كاشف للبحث عن ريدكتاز خلوي R4 .

محلول كحولي مشبع لأزرق الميثلين	5مل .
فورمول 40% متعادل	5مل .
الماء	190مل .

البحث عن ريدكتاز ميكروبي R5 :

أزرق الميثلين	5مغ .
الماء المقطر	1000مل .

احفظ المحلول الناتج على درجة حرارة منخفضة وبعيداً عن الضوء .

محلول لطريقة Dupouy R6 :

1 – محلول مشبع لـ Gaiacol :

Gaiacol	2غ .
الماء المقطر	100مل .

2 – الماء الأكسجيني عشرة أحجام :

يجب حفظ هذين المحلولين على درجة حرارة منخفضة .

محلول للبحث عن بيروكسيداز R7 :

1 – محلول بارا فينيلين –داي أمين

- الماء المقطر	100مل .
- بارا فينيلين داي أمين	2غ .

2 – الماء الأكسجيني عشرة أحجام :

تحفظ المحاليل على درجة حرارة منخفضة .

معلق لتفاعل Schern – Gorli R8 :

صبغة قرمزية	1غ .
الماء	100مل .

محلول للبحث عن الفوسفاتاز القلوي R9 :

1 – محلول منظم

كربونات الصوديوم اللامائية	3.5غ .
بيكربونات الصوديوم	1.5غ .
الماء المقطر	1000مل .

2 – المواد الكاشفة :

بارا نتروفينول الصوديوم	0.15غ .
محلول منظم	100مل .

يحفظ المحلول في البراد ويجب أن يبقى عديم اللون

أزرق الميثلين R12 .

أزرق الميثلين 0.3غ .
كحول 95% 30مل .
بعد طحن أزرق الميثلين وخلطه بالكحول أضف وبشكل تدريجي 100مل من الماء المقطر مع التحريك الدائم . رشح المحلول قبل الاستخدام .

محلول البنفسجي المتبلور R14 :
بنفسجي متبلور 1غ .
كحول 95% 10مل . أذب ثم أضف 100مل من محلول 1% فينول مع التحريك .
محلول Lugol R15 :
يود 1غ ، يوديد البوتاسيوم 2غ ، الماء المقطر 200مل .
كحول إتيلي 68% R17 :
كثافة الكحول الاتيلي 68% ، 0.895 :
إن كمية الماء للحصول على كحول بدرجات مختلفة بالغرام الواجب إضافتها إلى 100غ من الكحول حجمه V وكثافته D للوصول إلى حجم V1 وكثافة D1 يعطى بالعلاقة التالية :

$$Y = 100(D_1 \frac{V}{V_1} - D)$$

فللحصول على كحول 68% اعتباراً من 100حجم للكحول الاتيلي
90% يضاف 35.09 حجماً من الماء .
95% يضاف 41.43 حجماً من الماء .
كحول اتيلي 74% R18 :
للحصول على كحول اتيلي 74% اعتباراً من 100حجم من الكحول الاتيلي :
90% أضف 23.6 حجماً من الماء
95% أضف 31.3 حجماً من الماء
محلول ريزازورين R21 :
بودرة ريزازورين 0.005غ .
ماء مقطر 100مل
استخدم المحلول في نفس يوم التحضير .

ملحق (5) أوساط الزرع المستخدمة في ميكروبيولوجيا الألبان

الماء المعقم : M1
- استخدم الماء المقطر ووزعه ضمن دوارق معيارية بمعدل 50 مل مل/دورق .
- ضع سدادة من القطن أو أغطية من بولي بروبلين أو عبوات معدنية .
- طبق التعقيم على درجة حرارة 121°م خلال عشرين دقيقة .

الماء الفيزيولوجي M2 :
كلور الصوديوم 8.5غ .
الماء المقطر 1000مل .
- أذب الملح في الماء المقطر على درجة حرارة 45-50°م .

- وزع الماء الفيزيولوجي ضمن دوارق معيارية بمعدل 50مل .
- ضع سدادة من القطن أو من بولي بروبيلين .
- عقم على درجة حرارة 121°م خلال 20 دقيقة .

بعد التعقيم وزع الماء الفيزيولوجي في أنابيب اختبار 20×200مم بمعدل 9مل أو ضمن عبوات بمعدل 90مل أو 90غ .

- عقم على درجة حرارة 121°م خلال 20 دقيقة .

ماء الببتون M3 :

ببتون بكتريولوجي خال من الأندول 15غ .
كلور الصوديوم 5غ .
الماء المقطر 1000مل .

- أذب المكونات في الماء المقطر على درجة حرارة حارة نسبياً ونظم pH على رقم7
- وزع المحلول الذائب ضمن أنابيب بمعدل 10مل أو ضمن دوارق بمعدل 100 مل سد الأنابيب أو الدوارق بسدادة من القطن أو بولي بروبيلين .
- عقم على درجة حرارة 121°م خلال 20 دقيقة .

ماء الببتون M4 :

وسط بسيط
ببتون تريبسين 15غ .
كلور الصوديوم 5غ .
الماء المقطر 1000مل .

- أذب المكونات ضمن الماء المقطر على درجة حرارة ساخنة نسبياً .
- نظم رقم الحموضة pH على 7 .
- وزع المحاليل ضمن أنابيب بمعدل 10مل .
- سد الأنابيب وعقم على درجة حرارة 121°م لمدة 20دقيقة .

الوسط المركز :

ضاعف كميات الببتون وكلور الصوديوم ووزع المحلول الناتج ضمن أنابيب وعقم على درجة حرارة 121°م خلال 20 دقيقة .

ماء الببتون لفحص اللبن الخاثر M5 :
ببتون الكازئين 0.5غ .
ببتون اللحم 0.5غ .
الماء المقطر 1000مل .

- أذب المكونات على درجة حرارة مرتفعة نسبياً .
- وزع المحلول الناتج بمعدل 100مل ضمن دوارق معيارية .
- ضع السدادة وعقم على درجة حرارة 121°م خلال 20 دقيقة .

ماء الببتون المنظم M6 :
ببتون 20غ .
كلور الصوديوم 5غ .
فوسفات ثنائية الصوديوم 9غ .

فوسفات أحادية البوتاسيوم 1.5غ .
الماء المقطر 1000مل .
- أذب المكونات ونظم pH الوسط على 7.2 .
- وزع المحلول ضمن دوارق بمعدل 225مل أو بمعدل 90مل .
- ضع السدادات وطبق التعقيم على درجة حرارة 121° م خلال 20دقيقة .
- عند الاستخدام وزع المحلول ضمن أنابيب اختبار بمعدل 9مل/ أو 90غ ضمن عبوات سعتها 250مل .

محلول فوسفات ثنائية البوتاسيوم 2% M9 :
فوسفات ثنائية البوتاسيوم 20غ .
الماء المقطر 1000مل .
- أذب المادة في الماء المقطر على درجة حرارة مرتفعة نسبياً .
- نظم رقم الحموضة على 7.4-7.6 .
- وزع المحلول الناتج بمعدل 90مل / في الدورق .
- سد الدوارق وعقم على درجة حرارة 121° م خلال 15 دقيقة .

محلول معقم لأزرق Nil M10 :
أذب ضمن دورق معقم 1.10غ من أزرق Nil ضمن 50مل من الماء المقطر المعقم .
وعند الاستخدام حضر محلولاً ممدداً إلى 40/1 ضمن الماء المقطر .

الحليب الفرز M12 :
بودرة الحليب الفرز 10غ .
الماء المقطر 100مل .
- أذب بودرة الحليب ضمن الماء المقطر على درجة حرارة 45-50° م .
- وزع الحليب المعاد التشكيل بمعدل 10مل/ في الأنبوب أو 300مل ضمن العبوة وسد العبوات والأنابيب .
- عقم على درجة حرارة 115° م خلال 15دقيقة .

حليب متحلل بفعل البابايين على رقم 3.5 pH M14
بابايين عيار 100 1غ
حليب فرز 333مل .
الماء المقطر 666مل .
- اطحن العبوة مع قليل من الماء للحصول على معلق .
- أكمل الحجم إلى 1000مل مع الحليب والماء .
- عقم على درجة حرارة 115° م خلال 20 دقيقة ، ورشح .
- خذ الرشاحة ضمن عبوات بمعدل 50مل .
- عقم على درجة حرارة 118° م خلال 20دقيقة .

عند الاستخدام سخن مرة ثانية على درجة حرارة 48-50° م وأضف حجم إلى حجم من الجيلوز مضاعف التركيز M58 ثم طبق الاسالة ضمن أطباق بتري المزروعة .

حليب متحلل بفعل البابايين على رقم 7 pH M15 :
1 – وسط الجيلوز على رقم 7 pH

بابايين عيار 100 1غ
حليب فرز 170مل .
الماء المقطر 830مل .
2 – جيلوز في الحليب المتحلل بفعل البابايين :
- أضف إلى الرشاحة أجار 9-18غ .
- أذب مع التسخين حتى الغليان .
- نظم رقم الحموضة على 7 .
- وزع المحلول الناتج بمعدل 100 ضمن عبوات لها سدادات خاصة .
- عقم على درجة حرارة 118°م خلال 20 دقيقة .

بارافين صلب M16 :
بارافين وزن محدد (100غ) .
زيت فازلين وزن محدد (100غ) .

ضمن أنابيب اختبار مسدودة عقم على درجة حرارة 121° م خلال 20دقيقة وعند الاستخدام طبق الصهر على درجة حرارة 60°م .

1 – الوسط الأساسي M17 :

ببتون الكازئين الناتج عن التحلل بفعل الترببسين 2.5غ .
ببتون الببسين الناتج عن اللحم 2.5غ .
ببتون ناتج عن تحلل فول الصويا بفعل البابايين 5غ .
مستخلص الخمائر المجفف 2.5غ .
مستخلص اللحم 5غ .
جليسروفوسفات الصوديوم 19غ .
كبريتات مغنزيوم 0.25غ .
حمض اسكوربيك 0.50غ .
أجار 9-18غ .
الماء المقطر 950مل .

- أذب المكونات في الماء المغلي .
- برد على درجة حرارة 50°م .
- نظم رقم الحموضة على 7.1-7.2 .
- وزع المحلول الناتج بمعدل 95مل في العبوة .
- عقم على درجة حرارة 121°م خلال 20دقيقة .

2 – محلول اللاكتوز :

اللاكتوز 10غ .
الماء 100مل .

- أذب اللاكتوز في الماء وعقم على درجة حرارة 121°م خلال 20دقيقة .

3 – الوسط المكمل :

الوسط الأساسي على درجة حرارة 50°م 95مل .
محلول اللاكتوز 5مل .

خلط مع التحريك .
وسط كازئينات الكالسيوم M18 :
لتحضير لتر من الوسط يستخدم كازئين 30غ .
- أدخل الكازئين ضمن دورق وأضف إليه كمية من الماء المقطر .
- أضف ماء الكلس المشبع والمرشح .
- نظم رقم الحموضة حتى pH 7 .
- برده لمدة 12 ساعة ونظم من جديد رقم الحموضة على 7 .
- أكمل الحجم إلى 1000مل بالماء المقطر .
- وزع المحلول الناتج ضمن عبوات بمعدل 50مل . أو أنابيب اختبار 5مل . سد العبوات والأنابيب وعقم على 121° م خلال 20دقيقة . عند الاستخدام سخن وسط الكازئينات على درجة حرارة 50° م وأضف حجم إلى حجم من الجيلوز المضاعف M58 على درجة حرارة 50° م ،
جانس وطبق الإسالة ضمن أطباق بتري .
وسط الجيلوز في أزرق فيكتوريا M19 :
للبحث عن الأنواع المحللة للمادة الدسمة :
مستخلص الخمائر 2غ .
الببتون 8غ .
كلور الصوديوم 5غ .
الجيلوز 15غ .
الماء المقطر 1000مل .
أذب المكونات ضمن الماء المقطر .
وزع المحلول الناتج بمعدل 2مل/ في الأنبوب
عقم على درجة حرارة 121° م خلال 20 دقيقة .
وسط أزرق هيدرات البوتاسيوم أو وسط Rathe M22 :
الوسط البسيط
ببتون 20غ .
جلوكوز 5غ .
كلور الصوديوم 5غ .
فوسفات ثنائية البوتاسيوم 2.7غ .
فوسفات أحادية البوتاسيوم 2.7غ .
أزرق هيدرات الصوديوم 0.2غ .
الماء المقطر 1000مل .
وزع المحلول الناتج بمعدل 10مل ، سد الأنابيب وعقم على درجة حرارة 121° م خلال 20 دقيقة .

الوسط المركز :

ضاعف الكميات المستخدمة السابقة بدون الماء مع استخدام 30غ فقط من الببتون
وزع المحلول ضمن أنابيب بمعدل 10مل . سد الأنابيب .

عقم على درجة حرارة 121° م خلال 20 دقيقة .
وسط Litsky M23 :
ببتون 20غ .
جلوكوز 5غ .
كلور الصوديوم 5غ .
فوسفات ثنائية البوتاسيوم 2.7غ .
فوسفات أحادية البوتاسيوم 2.7غ .
أزرق هيدرات الصوديوم 0.3غ .
محلول 0.01غ من ايتيل البنفسجي في 100مل من ماء مقطر : 5مل الماء المقطر .
أذب المكونات ووزعها بمعدل 10مل / الأنبوب وعقم على درجة حرارة 121° م خلال 20دقيقة .
وسط Wilson – Blair M24 :
مستخلص اللحم 3غ .
ببتون 2غ .
كلور الصوديوم 5غ .
أجار 30غ .
الماء المقطر 1000مل .
أذب على درجة حرارة الغليان ونظم رقم الحموضة على 7.6 .
أضف الجلوكوز 20غ .
وزع المحلول الناتج بمعدل 20مل ضمن الأنبوب . سد الأنابيب وعقم على درجة حرارة 115° م خلال 30 دقيقة .
وسط CNERNA M25 :
للكشف عن الأبواغ المنتجة للغاز في شروط لا هوائية :
مستخلص الخمائر 3غ .
ببتون Difco 30غ .
مستخلص اللحم 10غ .
جلوكوز 5غ .
خلات الصوديوم 5غ .
كلور هيدرات السيستئين 0.5غ .
نشاء ذواب 1غ .
آجار 0.5غ .
الماء المقطر 1000مل .
أذب المجموع على درجة حرارة الغليان
نظم رقم الحموضة على 7.2 .
وزع المحلول الناتج بمعدل 10مل/ الأنبوب . سد الأنابيب ،
عقم على درجة حرارة 121° م خلال 20دقيقة
وسط CNERNA المعدل في اللاكتات M26 :

استخدم نفس الوسط السابق مع استبدال الجلوكوز بمادة لاكتات الصوديوم بمعدل 20غ/اللتر .
نظم رقم الحموضة على 6 .
وزع ضمن أنابيب بمعدل 10مل ، سد الأنابيب .
عقم على درجة حرارة 121° م خلال 20دقيقة .
وسط تأكيدي لـ C.tyrobutyricum : M27
لاكتات الكالسيوم 20غ .
خلات الصوديوم 7غ .
ثيو جليكولات الصوديوم 0.5غ
كبريتات الأمونيوم 0.1غ .

مضافات معدنية 10مل لمحلول يتكون من :
كبريتات المغنزيوم 2غ .
كبريتات المنغنيز 0.5غ .
كبريتات الحديد 0.4غ .
الماء المقطر 1000مل .

جيلوز 2غ .
الماء المقطر 1000مل .
يذاب الخليط على درجة حرارة الغليان وينظم رقم الحموضة pH على 6.1 ويعبأ ضمن أنابيب اختبار بمعدل 10مل / الأنبوب ويطبق التعقيم على درجة حرارة 121° م خلال عشرين دقيقة .
وسط السيستين : M34
ببتون بنكرياتي 10غ .
كلور الصوديوم 5غ .
هيدروكسيد الصوديوم 2% 10مل .
الأمونياك 0.5غ .
فوسفات ثنائية الصوديوم 9غ .
فوسفات أحادية الصوديوم 1.5غ .
الماء المقطر 1000 مل .
- أذب مع التسخين المعتدل ونظم رقم الحموضة على 6.8-7 .
- وزع المحلول الناتج بمعدل 8مل في الأنبوب وعقم الأنابيب المسدودة على درجة حرارة 121° م خلال 20 دقيقة .
جيلوز في الحليب : M42
ببتون بنكرياتي ناتج عن تحلل اللحم 5غ .
جيلوز 15غ .

الماء المقطر 1000مل .
- أذب المكونات على درجة حرارة الغليان ونظم رقم الحموضة pH على 7.4 .
جلوكوز 1غ .
حليب فرز طازج 5مل .
- وزع المحلول الناتج بمعدل 12-15مل / في الأنبوب أو 100مل في العبوات وعقم الأنابيب والعبوات المسدودة على درجة حرارة 121° م خلال 20 دقيقة .
جيلوز M . R . S. M43 :
بروتيئوز ببتون رقم 3 10غ .
مستخلص لحم الأبقار 10غ .
مستخلص من الخمائر 10غ .
جلوكوز 20غ .
توين 80 Tween, 80 1غ .
خلات الصوديوم 5غ .
كبريتات المغنزيوم 0.1غ .
كبريتات المنغنيز 0.05غ .
فوسفات ثنائية الصوديوم 2غ .
الماء المقطر 1000مل .
أذب المكونات تحت تسخين معتدل ونظم رقم الحموضة على 5.4 بحمض الخل .
وحمل المحلول على درجة حرارة الغليان .
وزع المحلول ضمن عبوات بمعدل 100مل / .
طبق التعقيم على العبوات المسدودة على درجة حرارة 121° م خلال 20دقيقة .
أجار ديكستروز البطاطا M44 :
وسط مجفف 39غ .
الماء المقطر 1000مل .
- أذب على درجة حرارة الغليان ووزع المحلول ضمن دوارق بمعدل 100مل/دورق.
- عقم الدوارق المسدودة على درجة حرارة 121° م خلال 15 دقيقة .
قبل الاستخدام نظم رقم الحموضة باستخدام محلول مائي معقم 10% من حمض طرطريك للحصول على رقم pH على درجة حرارة 25° م .
جيلوز في المالت M51 :
وسط مجفف Difco 2401 45غ .
الماء المقطر 1000مل .
- تذاب المادة مع الماء على درجة حرارة الغليان .
- يوزع المحلول بمعدل 100مل ضمن عبوة زجاجية سعتها 125مل أو ضمن أنبوب اختبار /10مل
- تسد العبوات أو الأنابيب وتعقم على درجة حرارة 121° م خلال 20دقيقة .
- قبل الاستخدام ينظم رقم الحموضة على 4.5 باستخدام محلول 10% لحمض اللبن المعقم على درجة حرارة 45-47° م .

جيلوز في ترامبسين M52 :
مستخلص الخمائر 5غ .
جلوكوز 20غ .
جيلوز 20غ .
الماء المقطر 1000مل .
- تذاب المكونات على درجة حرارة الغليان .
- يوزع المحلول بمعدل 100مل ضمن عبوات سعتها 125مل أو ضمن أنبوب اختبار بمعدل /12مل
- تسد العبوات والأنابيب وتعقم على درجة حرارة 121° م خلال عشرين دقيقة .
- عند الاستخدام يضاف إلى الجيلوز المصهور والمبرد على درجة حرارة 45-47°م.
محلول تيراميسين المعقم بالترشيح بمعدل 1مغ/مل .
جيلوز V.L M53 :
ببتون التريبسين أو البنكرياتين 10غ .
كلور الصوديوم 5غ .
مستخلص اللحم 5غ .
مستخلص الخمائر 5غ .
كلورهيدات السيستين 0.3غ .
أجار 15غ .
الماء 1000مل .
- يذاب الخليط على درجة حرارة الغليان وينظم رقم الحموضة بحيث يكون بعد التعقيم 7.2-7.4 يرشح المحلول ويضاف إليه : جلوكوز 2غ .
نشاء ذواب خالٍ من مضادات البكتريا 1غ .
يوزع المحلول ضمن أنابيب اختبار بمعدل 20مل .
تسد الأنابيب وتعقم على درجة حرارة 115° م خلال 30 دقيقة .
جيلوز في اللحم والكبد Gelose Viand –Foie M54 :
جيلوز في مستخلص الخمائر والنشاء M53 :
ببتون الكازئين ناتج عن فعل التريبسين 5غ .
باكتوتريبتون ديفكو 5غ .
مستخلص الخمائر 3غ .
أجار 15غ .
الماء المقطر 1000مل .
- يذاب الخليط على درجة حرارة الغليان وينظم رقم الحموضة على 7 .
- يضاف على التسلسل : جلوكوز 1غ .
نشاء ذواب خالٍ من مضادات البكتريا 1غ .
- يوزع المحلول ضمن أنابيب بمعدل 25مل .
- تسد الأنابيب وتعقم على درجة حرارة 115° م خلال 20 دقيقة .
جيلوز FIL الاتحاد الدولي للألبان M59 :

ببتون الكازئين متحلل بفعل التريبسين 5.0غ .
مستخلص الخمائر 2.5غ .
حليب مجفف عالي الجودة 1غ .
أو حليب فرز خالٍ من مضادات البكتريا 10مل .
أجار 15غ .
الماء 1000مل .
تذاب مكونات الخليط وتسخن ضمن المعقم على درجة حرارة 121° م خلال 20دقيقة .
يرشح المحلول ويضاف : جلوكوز 1غ .
وينظم رقم الحموضة على 7.00 .
- يوزع المحلول الناتج ضمن أنابيب اختبار بمعدل 12-15مل / في الأنبوب أو ضمن عبوات زجاجية بمعدل 90مل .
- تسد الأنابيب أو العبوات وتعقم على درجة حرارة 118° م خلال 20 دقيقة .

جيلوز Baird Parker M60 :

تريبتون 10غ .
مستخلص لحم الأبقار 5غ .
مستخلص الخمائر 1غ .
كلور ليثيوم 5غ .
أجار 20غ .
محلول سولفا ميزاتين 0.2% 25مل Sulfamezathine
يذاب الخليط على درجة حرارة الغليان وينظم رقم الحموضة على 7.2 .
يوزع الوسط الناتج ضمن عبوات بمعدل 90مل في العبوة سعتها 125مل .
تسد العبوات وتعقم على درجة حرارة 121° م خلال 20 دقيقة .
عند الاستخدام يصهر الوسط ويبرد إلى درجة حرارة 50° م ويضاف إليه :
- محلول مائي 20% جلايسين 6مل .
- محلول 1% من تلوريت البوتاسيوم BDH 1مل .
- محلول كبريتات الصوديوم 20% 5مل .
- مستحلب صفار البيض 5مل .

يتم التعقيم بالترشيح على أغشية سيللوزية للمحاليل الثلاثة الأولى أما مستحلب البيض يتم الحصول عليه بتمديد 5مل من صفار البيض ضمن 95مل من الماء المالح 8.5%.
يوزع الوسط المغذي Baird Parker بمعدل 8مل ضمن طبق بتري قطره 10سم وبمعدل 28مل ضمن طبق بتري قطره 14سم . تستخدم الأطباق في نفس يوم التحضير .

جيلوز مع دي أوكسالات M63 :

بروتيئوز ببتون 10غ .
لاكتوز 10غ .
دي أوكسالات الصوديوم 0.5غ .
كلور الصوديوم 5غ .
ليمونات الصوديوم 2غ .

أجار	15غ .
أحمر متعادل	0.03غ .
الماء المقطر	1000مل .

أذب المجموع قبل الغليان ونظم رقم الحموضة pH على 7.1 على درجة حرارة 25°م.
وزع المحلول ضمن أنابيب اختبار 16×160 مم معدل 5مل / الأنبوب والتعقيم خلال 20 دقيقة /120°م

مرق اللاكتوز بالأملاح الصفراوية والأخضر اللامع M64 :

ببتون	10غ .
أملاح صفراوية مجففة	20غ .
اللاكتوز	10غ .
محلول الأخضر اللامع	1.33%
الماء المقطر	1000مل .

- أذب المجموع ونظم رقم الحموضة على pH 7.2 .
- وزع المحلول ضمن أنابيب اختبار 16×160مم بمعدل 10مل لكل أنبوب .
- أدخل ضمن كل أنبوب اختبار أنبوب دورهام 5×32مم .
- سد الأنابيب وعقم على درجة حرارة 121°م ± 1°م خلال عشرين دقيقة .

M68 :

تريبتون	10غ .
مستخلص اللحم	5غ .
مستخلص الخمائر	5غ .
كلورليثيوم	5غ .
توين 80 Tween	1غ .
كلور الصوديوم	1.5غ .
جلايسين	1.2غ .
بيروفات الصوديوم	3غ .
الماء المقطر	1000مل .

أذب المجموع مع التسخين اللطيف ونظم رقم الحموضة بحيث يكون بعد التعقيم 6.8-7 .
- وزع المحلول الناتج ضمن أنابيب اختبار 200×20مم بمعدل 9مل في الأنبوب أو ضمن دوارق بمعدل 125مل في الدورق .
- عقم على درجة حرارة 115°م خلال 20 دقيقة .

مرق الببتون مع هيبوسيلفيت الصوديوم M69 :

مستخلص لحم الأبقار	5غ .
ببتون تريبسين	10غ .
كلور الصوديوم	5غ .
محلول 10% هيبوسيلفيت الصوديوم	5مل .
الماء المقطر	1000 مل .

- يذاب الخليط على درجة حرارة لطيفة وينظم رقم الحموضة بحيث يكون بعد التعقيم 7-7.2 .
- يوزع المحلول بمعدل 8مل ضمن أنابيب اختبار 16×160مم .
تعقم الأنابيب على درجة حرارة 121°م خلال 20 دقيقة .

M70 :

يستخدم هذا الوسط على جميع المنتجات اللبنية باستثناء الحليب الطازج والمبستر والمجفف :

مستخلص لحم الأبقار 1غ .
بروتيئوز ببتون 10غ .
اللاكتوز 5غ .
كلور الصوديوم 5غ .
محلول بروموكريزول 1.6% 1مل .
الماء المقطر 1000مل .

يذاب الخليط على درجة حرارة لطيفة وينظم رقم حموضة 7.4 .
يوزع المحلول ضمن دوارق معيارية 500مل أو 1000مل بمعدل 225مل و450مل .
تسد الدوارق وتعقم على درجة حرارة 118°م خلال 20 دقيقة .

وسط Sierra M75 :

الوسط الأساسي باكتو ببتون 10غ .
كلور الصوديوم 5غ .
كلور كالسيوم أحادي الماء 0.1غ .
أجار 25غ .
الماء المقطر 1000مل .

يذاب المجموع على درجة حرارة الغليان وينظم رقم الحموضة على 7.4 .
يوزع المحلول ضمن عبوات بمعدل 125مل / عبوة زجاجية .
تسد العبوات وتعقم على درجة حرارة 121°م ± 1°م خلال 20 دقيقة .