

- وبمقتضى القرار المؤرخ في 14 صفر عام 1415 الموافق 23 يوليو سنة 1994 والمتعلق بالمواسفات الميكروبيولوجية لبعض المواد الغذائية، المعدل والمتمم،

يقرر ما يأتي :

المادة الأولى : تطبيقا لأحكام المادة 19 من المرسوم التنفيذي رقم 90 - 39 المؤرخ في 3 رجب عام 1410 الموافق 30 يناير سنة 1990، المعدل والمتمم والمذكور أعلاه، يهدف هذا القرار إلى جعل منهج البحث وإحصاء بكتيريا القولون وبكتيريا القولون المتقبلة للحرارة وإشيريشيا كولي المفترضة في الماء إجباريا.

المادة 2 : من أجل البحث وإحصاء بكتيريا القولون وبكتيريا القولون المتقبلة للحرارة وإشيريشيا كولي المفترضة في الماء، فإن مخابر مراقبة الجودة وقمع الغش وتلك المعتمدة لهذا الغرض، ملزمة باستعمال المنهج المبين في الملحق المرفق بهذا القرار.

ويجب أن يستعمل المخبر هذا المنهج عند الأمر بإجراء خبرة.

المادة 3 : ينشر هذا القرار في الجريدة الرسمية للجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية.

حرر بالجزائر في 18 صفر عام 1434 الموافق 31 ديسمبر سنة 2012.

مصطفى بن بادة

الملحق

منهج البحث وإحصاء بكتيريا القولون وبكتيريا القولون المتقبلة للحرارة وإشيريشيا كولي المفترضة (منهج العدد الأكثر احتمالا)

يحدد هذا المنهج تقنية البحث وإحصاء بكتيريا القولون وبكتيريا القولون المتقبلة للحرارة وإشيريشيا كولي المفترضة بالزرع في وسط سائل داخل عدة أنابيب وحساب عددها الأكثر احتمالا في العينة.

يمكن تطبيق هذا المنهج على جميع أنواع المياه، حتى التي تحتوي على كمية معتبرة من الجزيئات المعلقة.

يمكن اعتبار اختيار التجارب المستعملة للبحث والتأكد للأجسام العضوية من مجموعة بكتيريا القولون، بما فيها إشيريشيا كولي كجزء من سلسلة متتالية. إن أهمية التأكيد لعينة ما تعتمد في جزء منه على طبيعة الماء والأسباب التي أدت إلى هذا الاختبار. عمليا، يدل البحث عن إشيريشيا كولي المفترضة في الماء، كما هو مبين في (3.1)، عموما عن تلوث برازي حديث.

وزارة التجارة

قرار مؤرخ في 18 صفر عام 1434 الموافق 31 ديسمبر سنة 2012، يجعل منهج البحث وإحصاء بكتيريا القولون وبكتيريا القولون المتقبلة للحرارة وإشيريشيا كولي المفترضة في الماء إجباريا.

إن وزير التجارة،

- بمقتضى القانون رقم 05 - 12 المؤرخ في 28 جمادى الثانية عام 1426 الموافق 4 غشت سنة 2005 والمتعلق بالمياه، المعدل والمتمم،

- وبمقتضى المرسوم الرئاسي رقم 12 - 326 المؤرخ في 17 شوال عام 1433 الموافق 4 سبتمبر سنة 2012 والمتضمن تعيين أعضاء الحكومة،

- وبمقتضى المرسوم التنفيذي رقم 90 - 39 المؤرخ في 3 رجب عام 1410 الموافق 30 يناير سنة 1990 والمتعلق برقابة الجودة وقمع الغش، المعدل والمتمم،

- وبمقتضى المرسوم التنفيذي رقم 02 - 453 المؤرخ في 17 شوال عام 1423 الموافق 21 ديسمبر سنة 2002 الذي يحدد صلاحيات وزير التجارة،

- وبمقتضى المرسوم التنفيذي رقم 05 - 465 المؤرخ في 4 ذي القعدة عام 1426 الموافق 6 ديسمبر سنة 2005 والمتعلق بتقييم المطابقة،

- وبمقتضى القرار الوزاري المشترك المؤرخ في 22 ذي الحجة عام 1426 الموافق 22 يناير سنة 2006 الذي يحدد نسب العناصر التي تحتويها المياه المعدنية الطبيعية ومياه المنبع وكذا شروط معالجتها أو الإضافات المسموح بها، المعدل والمتمم،

1. تعاريف

لمتطلبات هذا المنهج، تطبق التعاريف الآتية :

1.1 بكتيريا القولون :

أجسام عضوية قادرة على تشكيل مستعمرات في الشروط الهوائية في 35 م ± 0,5 م أو 37 م ± 0,5 م فوق وسط لاكتوزي انتقائي وتبايني، مع تشكل حمض (وألدهيد) في 24 ساعة.

2.1 بكتيريا القولون المتقبلة للحرارة :

أجسام عضوية تتجاوب مع التعريف المبين في (1.1)، لها نفس ميزات التخمر في 24 سا في 44 م ± 0,25 م أو 44,5 م ± 0,25 م.

3.1 إشيريشيا كولي المفترضة :

بكتيريا قولون متقبلة للحرارة تتجاوب مع التعريف المبين في (1.1) والتي تشكل أيضا الغاز انطلاقا من اللاكتوز (والمينيتول) وكذلك الأندول انطلاقا من التريببتوفان في 24 سا، إما في 44 م ± 0,25 م أو 44,5 م ± 0,25 م.

2. المبدأ

تزرع عينات مأخوذة للتجربة مخففة أو غير مخففة في سلسلة من أنابيب اختبار تحتوي على وسط انتقائي لاكتوزي.

تفحص أنابيب الاختبار بعد التحضين لمدة 24 سا إلى 48 سا في 35 م أو في 37 م، إعادة الزرع لكل أنبوب اختبار أظهر تعكّر مع تشكّل غاز في وسط التأكيد الأكثر انتقاء والبحث عن إشيريشيا كولي المفترضة، يكون في وسط يمكن أن يثبت فيه تشكّل الأندول.

تحضن أوساط التأكيد لمدة 48 ساعة على الأكثر في 35 م أو 37 م، للبحث عن بكتيريا القولون، وفي 44 م لمدة 24 ساعة على الأكثر للبحث عن بكتيريا القولون المتقبلة للحرارة وإشيريشيا كولي المفترضة.

يحسب بواسطة جداول إحصائية، العدد الأكثر احتمالا (ع.أ.إ) لبكتيريا القولون وبكتيريا القولون المتقبلة للحرارة وإشيريشيا كولي المفترضة، المحتمل وجودها في 100 ملل من العينة، انطلاقا من عدد الأنابيب التي أعطت نتائج تأكيد إيجابية.

3. المخففات وأوساط الزرع والكواشف :**1.3 المركبات الأساسية :**

لتحضير أوساط الزرع والكواشف، تستعمل مكونات من نوعية متجانسة ومواد كيميائية ذات نوعية تحليلية، تتبع التعليمات المعطاة في "الجدول ب". للمعلومات عن الحفظ (أنظر منهج إحصاء الأجسام الدقيقة في وسط الزرع). من الممكن كذلك استعمال أوساط كاملة مجففة. تتبع إذا التعليمات المتعلقة بها حرفيا.

لتحضير الأوساط، يستعمل الماء المقطر أو ماء منزوع الأيونات، خال من المواد القادرة على منع نمو البكتيريا في شروط التجربة.

2.3 المخفف :

لتحضير تخفيفات العينة، يستعمل أحد المخففات المنصوح بها في "الجدول ب"، يحضر المخفف طبقا للتعليمات المعطاة في "الجدول ب".

3.3 أوساط العزل :

يستعمل وسط واحد أو أكثر من أوساط الزرع الآتية. التعليمات الخاصة بالتحضير معطاة في "الجدول ب".

1.3.3 مرق لاكتوزي**2.3.3 مرق ماك كونكني****3.3.3 وسط لاكتوزي محسن بالفلوتامات****والفورميات****4.3.3 مرق باللوريل تريبتوز (لاكتوز)****4.3 أوساط التأكيد**

يستعمل وسط واحد أو أكثر من الأوساط الآتية :

1.4.3 أوساط لتشكّل الغاز**1.1.4.3 مرق (صفاوي) لاكتوزي بالأخضر****اللامع****2.1.4.3 وسط (EC)****2.4.3 وسط لتشكّل الأندول (ماء تريبتوني).****3.4.3 وسط لأنبوب اختبار وحيد لتشكّل الغاز****والأندول**

مرق تريبتوزي بالمانييتول، باللوريل سلفات وبالتريببتوفان.

التي أظهرت تعكس ناتج عن تكاثر البكتيريا وتشكل الغاز في أجراس دورهام، كذلك تشكل حمض إذا كان وسط العزل يحتوي على مؤشر العامل الهيدروجيني (pH). تحضن من جديد أنابيب الاختبار التي لم تبدأ أياً من هذه التغيرات وتفحص من جديد بعد 48 ساعة للبحث عن تفاعل إيجابي.

4.6 اختبارات التأكيد :

تجدر الإشارة إلى أن التفاعلات الإيجابية في أنابيب الاختبار التي تحتوي على وسط العزل لا تدل إلا على وجود بكتيريا قولون مفترضة. من المهم إذا إجراء اختبارات التأكيد.

1.4.6 إعادة الزرع والتحضين والفحص

يعاد الزرع انطلاقاً من كل أنبوب يحتوي على وسط العزل الذي أظهر نتيجة إيجابية في أنبوب واحد أو عدة أنابيب تحتوي على أوساط التأكيد (4.3) لإظهار تشكل الغاز والأندول.

الملاحظة الأولى : إذا استعمل مرق لاكتوزي الأقل

منعاً للعزل، ينصح بإعادة الزرع فوق أحد وسطي التأكيد الأكثر انتقاء [مرق صفراوي لاكتوزي بالأخضر اللامع أو مرق (EC)] للتأكيد.

1.1.4.6 بكتيريا القولون

لتأكيد وجود بكتيريا القولون، يحضن أنبوب الاختبار الذي يحتوي على مرق (صفراوي) لاكتوزي بالأخضر اللامع (1.1.4.3) في 35 م° أو في 37 م° ويكشف عن تشكل الغاز في 48 ساعة.

2.1.4.6 بكتيريا القولون المتقبلة للحرارة

وإشيريشيا كولي المفترضة

لتأكيد وجود بكتيريا القولون المتقبلة للحرارة، يحضن أنبوب اختبار آخر يحتوي على وسط (EC) (2.1.4.3) في 44 م° لمدة 24 ساعة ويكشف عن تشكل الغاز.

لتأكيد وجود إشيريشيا كولي مفترضة، يحضن أنبوب اختبار يحتوي على ماء تريبتوني (2.4.3) للكشف عن الأندول في 44 م° لمدة 24 ساعة. ثم يضاف 0,2 ملل إلى 0,3 ملل من كاشف كوفاكس (1.5.3) في الأنبوب الذي يحتوي على ماء تريبتوني : يدل ظهور اللون الأحمر بعد المزج بعناية على وجود الأندول.

5.3 الكواشف

1.5.3 كاشف كوفاكس للبحث عن الأندول

2.5.3 كاشف الأكسيدان للبحث عن الأكسيدان

4. التجهيزات

الأجهزة المتداولة في مخبر الميكروبيولوجيا، بما فيها :

1.4 فرن ذو هواء ساخن للتعقيم بالحرارة الجافة

وجهاز التعقيم

إضافة إلى التجهيزات التي تستلم معقمة، يجب تعقيم الأواني الزجاجية وجميع الأجهزة الأخرى طبقاً للتعليمات المعطاة في منهج إحصاء الأجسام الدقيقة في وسط الزرع.

2.4 جهاز التحضين أو الحمام المائي، يمكن ضبطه

في 35 م° ± 0,5 م° أو 37 م° ± 0,5 م°.

3.4 جهاز التحضين أو الحمام المائي، يمكن ضبطه

في 44 م° ± 0,25 م° أو 44,5 م° ± 0,25 م°.

4.4 جهاز قياس العامل الهيدروجيني (pH)

5. اقتطاع العينة

تقتطع العينات وترسل إلى المخبر طبقاً لمنهج إحصاء الأجسام الدقيقة في وسط الزرع.

6. طريقة العمل

1.6 تحضير العينة وزرع الأوساط

لتحضير العينة والتخفيفات وزرع أوساط العزل بالعينات المأخوذة للتجربة، تتبع التعليمات المعطاة في منهج إحصاء الأجسام الدقيقة في وسط الزرع. تزرع أنابيب الاختبار التي تحتوي على وسط عزل ذي تركيز مضاعف، بالعينات المأخوذة للتجربة بأحجام 5 ملل أو أكثر.

2.6 تحضين الأنابيب :

تحتضن الأنابيب المزروعة في 35 م° ± 0,5 م° أو في 37 م° ± 0,5 م° لمدة 48 ساعة.

3.6 فحص أنابيب الاختبار :

يفحص الزرع في أنابيب الاختبار بعد التحضين لمدة 18 إلى 24 ساعة وتعتبر كتفاعلات إيجابية الأنابيب

7. التعبير عن النتائج

انطلاقا من عدد الأنابيب التي تحتوي على وسط العزل التي أعطت تفاعلات إيجابية لتجارب التأكيد، يحسب بالاستناد إلى جداول الإحصاء الموجودة في منهج إحصاء الأجسام الدقيقة في وسط الزرع، العدد الأكثر احتمالا لبكتيريا القولون وبكتيريا القولون المتقبلة للحرارة وإشيريشيا كولي المفترضة الموجودة في 100 ملل من العينة.

الجدول أ

معلومات ميكروبيولوجية مكملة متعلقة بتحليل الماء للبحث من الأجسام العضوية من مجموعة بكتيريا القولون

للتحليل الروتيني للماء، يمكن وصف مجموعة بكتيريا القولون عموما بالمصطلحات الميكروبيولوجية ولو لم تكن مصنفة كالاتي :

بكتيريا القولون عبارة عن بكتيريا على شكل عصيات، غرام سلبي، لا تشكل أبواغ، تعطي تفاعلا سلبيا مع الأكسידان، تستطيع النمو في الشروط الهوائية وكذلك اللاهوائية بوجود الأملاح الصفراوية (أو مشتق ناشط له نفس خصائص منع النمو)، وأيضا قادرة على إحداث تخمر اللاكتوز (والمانيتول) مع تشكيل حمض، غاز وألدهيد في 48 ساعة عندما تحضن في درجة حرارة محصورة بين 35 م° و 37 م°.

بكتيريا القولون المتقبلة للحرارة عبارة عن بكتيريا القولون لها نفس الخصائص البيولوجية والتخمير عندما يتم حضنها في درجة حرارة 44 م° و 44,5 م°.

إشيريشيا كولي المفترضة عبارة عن بكتيريا قولون متقبلة للحرارة قادرة كذلك على تشكيل الأندول انطلاقا من التريبوتوفان.

يمكن اعتبار إشيريشيا كولي المفترضة هي الأشيريشيا كولي التي تعطي أيضا تفاعلا إيجابيا أثناء التجارب مع أحمر الميثيل وتستطيع نزع الكربوكسيل من حمض (L - غلوتاميك)، لكنها غير قادرة على تشكيل الأستيل مثيل كربينول، تستعمل السيترات كمصدر وحيد للكربون أو النمو في مرق بسانور البوتاسيوم (KCN).

الملاحظة 2 : يسمح استعمال مرق تريبتوزي

بالمانيتول، باللوريل سولفات والتريبوتوفان، بإظهار تشكل الغاز والأندول من طرف إشيريشيا كولي.

الملاحظة 3 : يعتبر الكشف عن إشيريشيا كولي

المفترضة دليلا كافيا لتلوث برازي. إلا أنه يمكن إنجاز تجارب مكملة لإشيريشيا كولي إذا اقتضى الأمر (5.6).

الملاحظة 4 : عند إعادة زرع المستعمرات فوق

غشاء داخل أنابيب تحتوي على أوساط التأكيد، من الأحسن إعادة الزرع أيضا فوق علبه تحتوي على وسط مغذ هلامي لاجراء اختبار الأكسידان.

5.6 اختبار الأكسידان

تستطيع بعض البكتيريا الموجودة في الماء أن تكون لاعتبارات عديدة مطابقة لتعريف بكتيريا القولون، لكن لا يمكنها تشكيل الغاز انطلاقا من اللاكتوز إلا في درجات حرارة تقل عن 37 م°. فهي تعطي إذا نتائج سلبية أثناء تجارب التأكيد الموحدة لبكتيريا القولون ووجودها في الماء غير معبر. لأن صنف الأيرومون الموجود طبيعيا في الماء يتفاعل فقط في درجة 37 م° وأقل. من الضروري فقط إنجاز اختبار الأكسידان بتحديد بكتيريا القولون.

1.5.6 ينجز اختبار الأكسידان على مزارع نقية

من البكتيريا بالعمل على تخمر اللاكتوز، مزرومة فوق وسط مغذ هلامي كالاتي :

- توضع قطرتان أو 3 قطرات من كاشف الأكسידان محضر حديثا (2.5.3) فوق ورق الترشيح في علبه بتري،

- بواسطة عود زجاجي أو عود قطني أو حلقة من البلاتين (وليس من النيكل - كروم)، ينشر جزء من الزرع فوق ورق الترشيح المحضر (الملاحظة 4)،

- يعتبر ظهور لون أزرق بنفسجي داكن في خلال 10 ثوان كتفاعل إيجابي.

الملاحظة 5 : في كل مرة يستعمل فيها كاشف

الأكسידان، تنجز تجارب المراقبة بمزارع أجسام عضوية معروفة والتي تعطي تفاعلا إيجابيا (بسودوموناس أيروجينوزا) وكذلك مع زرع يعطي تفاعلا سلبيا (إشيريشيا كولي).

وسط ذو تركيز عادي

- يحضر الوسط ذو التركيز العادي بتخفيف الوسط ذي التركيز المضاعف بنفس الحجم من الماء المقطر أو يحضر مباشرة بتقسيم تركيز المكونات إلى اثنين،

- يوزع الوسط ذو التركيز العادي على أحجام 5 ملل والوسط ذو التركيز المضاعف على أحجام 10 ملل أو 50 ملل في أنابيب الاختبار أو في قارورات تحتوي على جرس دورهام. توضع في جهاز التعقيم في درجة حرارة 115 م° لمدة 10 دقائق.

وسط لاكتوزي محسن بالغلوتامات والفورميات

وسط ذو تركيز مضاعف

لاكتوز 20 غ

ملح الصوديوم لحمض (+) L غلوتاميك 12,7 غ

أحادي الكلوريدات لـ (+) L أرجنين 0,048 غ

حمض (-) L أسبارتيك 0,04 غ

L (-) سيستين 0,04 غ

فورميات الصوديوم 0,5 غ

أحادي هيدرو جينو فوسفات البوتاسيوم 1,8 غ

كلورور الأمونيوم 5 غ

سولفات المغنيزيوم (MgSO₄,7 H₂O) 0,02 غكلورور الكالسيوم (CaCl₂,2 H₂O) 0,02 غ

بلورات سترات الحديد (III) 0,02 غ

تيامين (هيدروكلورور الأنورين) 0,002 غ

حمض النيكوتينيك 0,002 غ

حمض البانتوتنيك 0,002 غ

أحمر أرجواني البروموكريزول

(محلول لـ 1 % (ك/ك) في الإيثانول 2 ملل

ماء مقطر، يكمل حتى 1000 ملل

الجدول ب

أوساط الزرع والكواشف والمخففات

وسط العزل

مرق لاكتوزي

وسط ذو تركيز مضاعف

بيتون 10 غ

لاكتوز 10 غ

مستخلص اللحم 6 غ

ماء مقطر 1000 ملل

- تذوب المكونات في الماء المغلي.

- إذا اقتضى الأمر يضبط العامل الهيدروجيني (pH) بحيث يصبح بعد التعقيم $6,9 \pm 0,2$. يحضر وسط ذو تركيز بسيط بتخفيف الوسط ذي التركيز المضاعف بحجم مساو من الماء المقطر.

مرق ماك كونكي

وسط ذو تركيز مضاعف

أملاح صفراوية 10 غ

بيتون 40 غ

لاكتوز 20 غ

كلورور الصوديوم 10 غ

أحمر أرجواني البروموكريزول [محلول إيثانولي

لـ 1 % (ح/ح) 2 ملل

ماء مقطر 1000 ملل

- يذوب في الماء وبالتسخين البيتون وكلورور الصوديوم والأملاح الصفراوية وتحفظ في درجة حرارة 4 م° ليلة كاملة.

يرشح بعدما يصبح الخليط باردا، يضاف اللاكتوز ويذوب.

- يضبط العامل الهيدروجيني (pH) في $7,4 \pm 0,2$. ويضاف أحمر أرجواني البروموكريزول ضروريا.

المحلول 6

محلول التامين المعقم بـ 0,1 % في الماء المقطر.

من الأحسن تحضير هذا المحلول بإضافة محتوى قارورة صغيرة (100 ملغ) بطريقة مطهرة لـ 99 ملل من الماء المقطر معقم. يحفظ هذا المحلول في 4 م مع إلغاء استعماله في أجل لا يتعدى 6 أسابيع.

لتحضير 10 لترات من وسط ذي تركيز مضاعف، تذوب كميات مناسبة من ملح الصوديوم، حمض (+L) غلوتاميك، فورميات الصوديوم، أحادي هيدروجينو فوسفات البوتاسيوم، كلورور الأمونيوم وسلفات المغنيزيوم في 9 لتر من الماء المقطر الساخن. ثم تضاف جميع المحاليل 1 و 2 و 3 و 4 و 4 ملل من المحلول 5. إذا اقتضى الأمر، يضبط العامل الهيدروجيني (pH) ليصبح 6,8 أو أكثر، بحيث يكون العامل الهيدروجيني (pH) النهائي بعد التعقيم 6,7. إذا استعملت نفس الأجهزة ونفس مناهج التعقيم، يجب أن تحدث نفس التغيرات للعامل الهيدروجيني (pH) خلال عملية التعقيم. يمكن أن تكون التجارب التمهيدية ضرورية لجعل الهيدروجيني (pH) صحيح قبل التعقيم.

بعد ضبط العامل الهيدروجيني (pH)، يضاف 20 ملل من محلول إثنانولي يحتوي على 1 % من أحمر أرجوان البروموكريزول. يكمل الحجم للحصول على حجم نهائي يساوي 10 لترات. يحتاج ذلك إلى حوالي 810 ملل من الماء المقطر. إذا لم يستعمل الوسط الكامل مباشرة، يسكب في قارورات سعتها 500 ملل ويوضع في جهاز التعقيم في درجة حرارة 115 م لمدة 10 دقائق. للاستعمال، تضاف كمية من اللاكتوز ومحلول التيامين (محلول 6) إذا اقتضى الأمر، يترك ليذوب، ثم يوزع بأحجام 10 ملل و 50 ملل. يجب أن يحتوي كل أنبوب اختبار أو قارورة على جرس دورهام. من المهم التأكد أنه بعد المرور بجهاز التعقيم وقبل الاستعمال، يكون جرس دورهام مملوءا كلياً بالوسط. في الحالة العكسية، من المحتمل الحصول على نتيجة إيجابية خاطئة لتشكيل الغاز. تعقم في درجة حرارة 115 م لمدة 10 دقائق أو توضع في جهاز التحضين في 100 م لمدة 30 دقيقة لمدة 3 أيام متتالية.

وسط ذو تركيز بسيط

- يحضر وسط ذو تركيز بسيط بتخفيف الوسط ذي التركيز المضاعف مع حجم مساو من الماء المقطر ويوزع بأحجام تقدر بـ 5 ملل داخل أنابيب تحتوي على جرس دورهام.

- تعقم في 115 م لمدة 10 دقائق أو توضع في جهاز التحضين في 100 م لمدة 30 دقيقة لمدة 3 أيام متتالية.

من الأنسب أن يحضر الوسط بكميات تقدر بـ 10 لترات أو أكثر. إذا لم يوزع في أنابيب الاختبار مباشرة، يستحسن ألا يدمج معها اللاكتوز والتيامين وتضاف فقط قبل الاستعمال. من السهل إضافة بعض المكونات على شكل محاليل متفرقة محضرة كالاتي :

المحلول الأول

أحادي الكلورات لـ (+) L أرجنين 0,4 غ
حمض (-) L أسبارتيك 0,48 غ
ماء مقطر 50 ملل

يسخن للتذويب.

المحلول 2

L (-) سيستين 0,4 غ
هيدروكسيد الصوديوم (5 مول/ل) 10 ملل
ماء مقطر 90 ملل

يسخن للتذويب.

المحلول 3

حمض النيكوتينيك 0,02 غ
حمض البانتوتينيك 0,02 غ
ماء مقطر 5 ملل

يذوب في البرودة.

المحلول 4

بلورات سترات الحديد (III) 0,2 غ
ماء مقطر 10 ملل

يسخن للتذويب.

المحلول 5

كلورور الكالسيوم (CaCl₂·2H₂O) 5 غ
ماء مقطر 100 ملل
حمض الكلورديريك المركز 0,1 ملل

يذوب في البرودة ويعقم في درجة حرارة 121 م لمدة 20 دقيقة. يحفظ كمحلول أم.

- تذوب الببتون في 500 ملل من الماء المقطر .
- تضاف 20 غ من صفراء البقر المجففة محللة في 200 ملل من الماء المقطر. يجب أن يكون العامل الهيدروجيني (pH) لهذا المحلول محصور بين 7,0 و 7,5.
- يكمل الحجم بإضافة الماء المقطر بتقريب 975 ملل.
- يضاف اللاكتوز ويضبط العامل الهيدروجيني (pH) في 7,4.
- يضاف محلول الأخضر اللامع ويكمل الحجم إلى 1000 ملل بإضافة الماء المقطر .
- توزع أحجام بـ 5 ملل في أنابيب اختبار تحتوي على أجراس دورهام مقلوبة وتوضع داخل جهاز التعقيم في درجة حرارة 115 م° لمدة 10 دقائق.

وسط (EC) (لتشكل الغاز)

- تريبتوز أو تريبتيكاز 20 غ
- لاكتوز 5 غ
- خليط الأملاح الصفراوية
- أو أملاح صفراوية رقم 3 1,5 غ
- أحادي هيدروجينو فوسفات البوتاسيوم 4 غ
- ثنائي هيدروجينو فوسفات البوتاسيوم 1,5 غ
- كلورور الصوديوم 5 غ
- ماء مقطر 1000 ملل

- قبل التعقيم يوزع في أنابيب اختبار بحيث يغطي الوسط على الأقل جزءا من جرس دورهام بعد التعقيم.
- يجب أن يساوي العامل الهيدروجيني (pH) بعد التعقيم 6,9.

ماء تريبتوني (لتفاعل الأندول)

- يعطي بعض الببتون نتائج مرضية في التجارب التي تجرى 35 م° أو 37 م° وغير مرضية في تجربة الأندول في 44 م°. ثبت أن التريبتون يعطي نتائج مرضية لذا ينصح به.

- تريبتون 20 غ
- كلورور الصوديوم 5 غ
- ماء مقطر 1000 ملل

- الملاحظة 6 :** يمكن أن تعطي إضافة حلالة الكازيين لـ 0,1 % (ك/ك) خالية من الفيتامين نتائج أسرع.

مرق تريبتوزي باللوريل سولفات

وسط ذو تركيز مضاعف

- تريبتوز 40 غ
- لاكتوز 10 غ
- كلورور الصوديوم 10 غ
- أحادي هيدروجينو فوسفات البوتاسيوم 5,5 غ
- ثنائي هيدروجينو فوسفات البوتاسيوم 5,5 غ
- لوريل سلفات الصوديوم ذو نقاوة عالية 0,2 غ
- ماء مقطر 1000 ملل

- يضاف التريبتوز، كلورور الصوديوم، اللاكتوز والفوسفات للماء ويسخن للتذويب.

- يضاف لوريل سولفات الصوديوم ويخلط برفق لتجنب تشكل رغوة.

- يضبط العامل الهيدروجيني (pH) في 6,8 ± 0,2.

- يحضر وسط ذو تركيز بسيط بتخفيف الوسط ذي التركيز المضاعف بحجم مساو من الماء المقطر.

- يوزع الوسط ذو التركيز البسيط بأحجام 5 ملل والوسط ذو التركيز المضاعف بأحجام 10 ملل و 50 ملل. يجب أن يحتوي كل أنبوب اختبار أو قارورة على جرس دورهام.

- يوضع في جهاز التعقيم في درجة حرارة 115 م° لمدة 10 دقائق.

أوساط التأكيد

مرق (صفراوي) لاكتوزي بالأخضر اللامع (لتشكل

الغاز)

- ببتون 10 غ
- لاكتوز 10 غ
- صفراء البقر مجففة 20 غ
- أخضر لامع [محلول لـ 0,1 % (ك/ك)] 13 ملل
- ماء مقطر، يكمل حتى 1000 ملل

- تذوب المكونات في الماء ويضبط العامل الهيدروجيني (pH) في 7,5.

- توزع بأحجام 5 ملل وتوضع في جهاز التعقيم في درجة حرارة 115 م° لمدة 10 دقائق.

الملاحظة 7 : إن إضافة التريبتوفان D أو DL بـ 0,1 % (ك/ك) يمكن أن يحسن فعالية الوسط.

مرق تريبتوزي بالمانيتول، باللوريل سلفات وبالتريبتوفان

(قارورة وحيدة لتشكيل الغاز والأندول)

تريبتوز 20 غ

مانيتول 5 غ

كلورور الصوديوم 5 غ

أحادي هيدروجينو فوسفات البوتاسيوم 2,75 غ

ثنائي هيدروجينو فوسفات البوتاسيوم 2,75 غ

لوريل سلفات الصوديوم 0,1 غ

تريبتوفان (-) L 0,2 غ

ماء مقطر 1000 ملل

- يضاف إلى الماء التريبتوز وكلورور الصوديوم والمانيتول والفوسفات والتريبتوفان ويسخن للتذويب.

- يضاف لوريل سلفات الصوديوم ويخلط برفق لاجتناب تشكل رغوة.

- يضبط العامل الهيدروجيني (pH) في 6,8 ± 0,2.

- توزع بأحجام تساوي 5 ملل في أنابيب تحتوي على جرس دورهام.

- توضع في جهاز التعقيم في درجة حرارة 115 م° لمدة 10 دقائق.

الكواشف

كاشف كوفاكس للأندول

p - ثنائي المثيل أمينو بنزلاهديد 5 غ

كحول الأميليك 75 ملل

حمض الكلوريدريك (p = 1,18 غ/ملل) 25 ملل

- يذوب الأدهيد في كحول الأميليك.

- يضاف الحمض المركز برفق. يوضع بعيدا عن الضوء في درجة حرارة 4 م°.

الملاحظة 8 : يجب أن يتغير لون الكاشف من الأصفر الفاتح إلى الأسمر الفاتح، لقد اتضح أن بعض عينات كحول الأميليك غير مرضية وتعطي لونا داكنا مع الأدهيد.

كاشف الأكسيدان

ثنائي كلورات p - فنيلان ديامين 0,1 غ

ماء مقطر 10 ملل

لا يحفظ هذا الكاشف، لذا يجب أن يحضر بكميات صغيرة قبل كل استعمال.

المخففات

مخفف بالببتون (0,1%)

ببتون 1 غ

ماء مقطر 1000 ملل

- تذوب الببتون في حوالي 950 ملل من الماء.

- يضبط العامل الهيدروجيني (pH) بمحلول هيدروكسيد الصوديوم أو بمحلول حمض الكلوريدريك (1 مول/ل) ليصبح بعد التعقيم 7,0 ± 0,1.

- يكمل الحجم بالماء للحصول على 1000 ملل، ويوزع بأحجام مستعملة وتوضع في جهاز التعقيم في درجة حرارة 121 م° ± 1 م° لمدة 15 دقيقة.

محلول ملحي ببنتوني

ببتون 1 غ

كلورور الصوديوم 8,5 غ

ماء مقطر 1000 ملل

- تذوب المكونات في حوالي 950 ملل من الماء موضوع للغليان.

- يضبط العامل الهيدروجيني (pH) بهيدروكسيد الصوديوم أو محلول حمض الكلوريدريك (1 مول/ل) ليصبح بعد التعقيم 7,0 ± 0,1.

- يكمل الحجم بالماء للحصول على 1000 ملل، ويوزع على أحجام مستعملة ويوضع في جهاز التعقيم في درجة حرارة 121 م° ± 1 م° لمدة 15 دقيقة.

هلام مغذي

مستخلص اللحم 1,0 غ
ببتون 1,0 غ
كلورور الصوديوم 5 غ
هلام 15 غ

- تسكب المكونات في الماء وتسخن للتذويب.

- يضبط العامل الهيدروجيني (pH) في 8,2 بواسطة هيدروكسيد الصوديوم (1 مول/ل) ويغلى لمدة 10 دقائق.

- يصفى بالترشيح ويضبط العامل الهيدروجيني (pH) 7,2 + 7,4.

- يوزع في قارورات سعتها 100 ملل وتنقل إلى جهاز التعقيم مضبوط في درجة حرارة 121 م° + 1 م° لمدة 15 دقيقة.

محلول رنجان (مخفف إلى الربع)

كلورور الصوديوم 2,25 غ
كلورور البوتاسيوم 0,105 غ
كلورور الكالسيوم (خال من الماء) 0,12 غ
هيدروجينو كربونات الصوديوم 0,05 غ
ماء مقطر 1000 ملل

- تذوب المكونات وتوزع بأحجام مستعملة.

- تعقم في جهاز التعقيم في درجة حرارة 121 م° ± 1 م° لمدة 15 دقيقة. يجب أن يساوي العامل الهيدروجيني (pH) النهائي 7,0 ± 0,1.

محلول مثبت بالفوسفات

ثنائي هيدروجينو فوسفات البوتاسيوم 42,5 ملغ
كلورور المغنزيوم 190 ملغ
ماء مقطر 1000 ملل

التحضير

(أ) محلول الفوسفات

- تذوب 34 غ من الفوسفات في 500 ملل من الماء المقطر.

- يضبط العامل الهيدروجيني (pH) في 7,2 + 0,5 بمحلول هيدروكسيد الصوديوم لـ 1 مول / ل ويكمل الحجم بالماء المقطر حتى 1000 ملل.

(ب) محلول كلورور المغنزيوم

يذوب 38 غ من كلورور المغنزيوم في 1000 ملل من الماء المقطر.

المحلول النهائي

للاستعمال، يضاف 1,25 ملل من محلول الفوسفات (أ) و 5,0 ملل من محلول كلورور المغنزيوم (ب) لـ 1000 ملل من الماء المقطر. يوزع بأحجام مستعملة ويعقم في جهاز التعقيم في درجة حرارة 121 م° + 1 م° لمدة 15 دقيقة. يجب أن يساوي العامل الهيدروجيني (pH) النهائي في 7,0 + 0,1.