

مرسوم رئاسي مؤرخ في 17 شعبان عام 1425 الموافق 2 أكتوبر سنة 2004، يتضمن تعيين نائبي مدير بوزارة البريد والمواصلات وتكنولوجيات الإعلام والاتصال.

بموجب مرسوم رئاسي مؤرخ في 17 شعبان عام 1425 الموافق 2 أكتوبر سنة 2004 يعين السيدان الآتي اسماهما، نائبي مدير بوزارة البريد وتكنولوجيات الإعلام والاتصال :

- ناصر إغوبة، نائب مدير للاستشارات والتقييس،

- عمر معطوب، نائب مدير للميزانية والمحاسبة.



مرسوم رئاسي مؤرخ في 17 شعبان عام 1425 الموافق 2 أكتوبر سنة 2004، يتضمن تعيين مدير البريد وتكنولوجيات الإعلام والاتصال بولاية باتنة.

بموجب مرسوم رئاسي مؤرخ في 17 شعبان عام 1425 الموافق 2 أكتوبر سنة 2004 يعين السيد الخير شين، مديرا للبريد وتكنولوجيات الإعلام والاتصال بولاية باتنة.

مرسومان رئاسيان مؤرخان في 17 شعبان عام 1425 الموافق 2 أكتوبر سنة 2004، يتضمنان تعيين نائبي مديرين بوزارة التهيئة العمرانية والبيئة.

بموجب مرسوم رئاسي مؤرخ في 17 شعبان عام 1425 الموافق 2 أكتوبر سنة 2004 يعين السيد عبد القادر بن سنوسي، نائب مدير للوسائل والإمداد بوزارة التهيئة العمرانية والبيئة.

بموجب مرسوم رئاسي مؤرخ في 17 شعبان عام 1425 الموافق 2 أكتوبر سنة 2004 تعين السيدة أمال بن طاهر، زوجة أودينة، نائبة مدير للوثائق والأرشيف بوزارة التهيئة العمرانية والبيئة.



مرسوم رئاسي مؤرخ في 17 شعبان عام 1425 الموافق 2 أكتوبر سنة 2004، يتضمن تعيين المديرية العامة للمؤسسة العمومية الوطنية ذات الطابع الصناعي والتجاري "بريد الجزائر".

بموجب مرسوم رئاسي مؤرخ في 17 شعبان عام 1425 الموافق 2 أكتوبر سنة 2004 تعين الأنسة غنية هوادرية، مديرة عامة للمؤسسة العمومية الوطنية ذات الطابع الصناعي والتجاري "بريد الجزائر".

قرارات، مقررات، آراء

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

- وبمقتضى القرار الوزاري المشترك المؤرخ في 29 صفر عام 1414 الموافق 18 غشت سنة 1993 والمتعلق بمواصفات بعض أنواع الحليب المعد للاستهلاك وعرضه،

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

وزارة التجارة

قرار مؤرخ في 26 رجب عام 1425 الموافق 11 سبتمبر سنة 2004، يجعل منهج تحضير العينات للتجربة والتخفيفات بغرض الفحص الميكروبيولوجي إجباريا.

إن وزير التجارة،

- بمقتضى المرسوم التنفيذي رقم 90-39 المؤرخ في 3 رجب عام 1410 الموافق 30 يناير سنة 1990 والمتعلق برقابة الجودة وقمع الغش، 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 و المتمم والمذكور أعلاه ، يهدف هذا القرار إلى جعل منهج تحضير العينات للتجربة والتخفيفات بغرض الفحص الميكروبيولوجي إجباريا.

المادة 2 : من أجل تحضير العينات للتجربة والتخفيفات بغرض الفحص الميكروبيولوجي ، فإن مخابر مراقبة الجودة و قمع الغش و تلك المعتمدة لهذا الغرض ملزمة باستعمال المنهج المبين في الملحق .

كما يجب أن يستعمل هذا المنهج ، من طرف المخبر عند الأمر بإجراء خبرة.

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

حرر بالجزائر في 26 رجب عام 1425 الموافق 11 سبتمبر سنة 2004.

نور الدين بوكروح**الملحق****منهج لتحضير العينات للتجربة والتخفيفات بغرض الفحص الميكروبيولوجي**

1-التعريف : تقتضي متطلبات هذا المنهج، تطبيق التعاريف التالية .

1.1 تخفيف أولي (المحلل الأم) : محلل، محلول أو مستحلب حصل عليه بعد وزن أو كيل كمية من المنتج المراد تحليله (أو العينة المراد تجربتها والمحضرة انطلاقا من هذا المنتج) التي تم خلطها إن اقتضت الحاجة باستعمال خلاط مع مراعاة الاحتياطات الملائمة (6) تسع مرات نفس كمية المخفف (3) مع ترك الجزيئات الكبيرة تتوضع إن وجدت.

يمكن في بعض الحالات، إضافة المخفف بكثرة لاسيما بالنسبة للمنتجات التي تعطي محلل الأم 9+1 لزج أو كثيف. وفي حالات أخرى، يمكن استعمال تخفيف أولي مركز أكثر من 9+1 ذلك بالنسبة لنتائج التجربة التي لها علاقة مع بعض معايير المواصفات. يجب الأخذ بعين الاعتبار هذا العامل لمواصلة العمليات و/ أو للتعبير عن النتائج.

2.1 التخفيفات العشرية التالية : محلل، مستحلب أو محلول متحصل عليه بخلط حجم معين للتخفيف الأولي (1.1) مع

تسع مرات نفس حجم المخفف المناسب و تكرر هذه العملية على كل تخفيف محضر إلى غاية الحصول على مجموعة من التخفيفات العشرية المناسبة لزراع أوساط الزرع .

2-المبدأ

لتسهيل الفحص الميكروبيولوجي، نقوم بتحضير التخفيف الأولي (محلل الأم) (1.1) و إذا اقتضى الأمر التخفيفات العشرية الموالية (2.1) و هذا لتقليص عدد الأعضاء المجهرية لوحدة حجم.

3-المخففات**1.3 المكونات الأساسية**

لتحسين صحة النتائج، يشترط لتحضير المخفف، استعمال مكونات أساسية مجففة أو تحضير كامل مجفف. يجب احترام التعليمات التقنية بدقة.

يجب أن تكون المنتوجات الكيمائية ذات نوعية تحليلية معترف بها.

يجب أن يكون الماء المستعمل ماء مقطرا في جهاز من الزجاج أو ماء خال من الأملاح المعدنية، خال من المواد التي بإمكانها التأثير على نمو الأعضاء المجهرية في الظروف التي أجريت فيها التجربة. يتعين مراقبة هذا الجانب دوريا خاصة في حالة الماء المنزوع الأملاح المعدنية.

يتعين استعمال محاليل هيدروكسيد الصوديوم أو حمض الكلوريدريك (حوالي 0.1مول/ل) من أجل تعديل العامل الهيدروجيني pH للمخففات، ما لم يرد بيان مخالف.

2.3 المخففات للاستعمال العام**1.2.3 محلول بيتون- ملح****التركيب**

بيتون.....1,0غ
كلورور الصوديوم NaCl.....8,5غ
الماء.....1000ملل

يذوب بالماء حتى 1000 ملل. يحفظ المحلول الأصلي في الثلاجة.

قبل الاستعمال، يضاف 1 ملل من المحلول الأصلي (في 20م°) لـ 1000 ملل من الماء لاستعماله كمخفف.

3.3 المخففات للاستعمال الخاص

1.3.3 محلول سترات الصوديوم (للجبين، والجبن الطري والحليب الجاف هات ماکر Hatmaker)

التركيب

سترات ثلاثي الصوديوم المميّه مرتين
Na₃ C₆H₅O₇2H₂O 20,0 غ
ماء 1000 ملل

التحضير

يذوب الملح في الماء بالتسخين بين 45م° و 50م° .
يعدل العامل الهيدروجيني إلى أن يبلغ بعد التعقيم 0,1 ± 7,5 في 25م° .

2.3.3 محلول مونوهيدروجينو- فوسفات البوتاسيوم (للجبين، و الجبن الطري- حمض الكازيين- مسحوق الكازيين اللبني- الكازينات- مساحيق مصل الحليب الحمضي الحمضيات والقشدة الحامضة).

التركيب

مونوهيدروجينو- فوسفات البوتاسيوم
K₂HPO₄ 20,0 غ
ماء 1000 ملل

التحضير

تذويب الملح في الماء بالتسخين بين 45م° و 50م° .

يعدل العامل الهيدروجيني pH. بالنسبة للتخفيف الأولي لحمض الكازيين، الكازيين اللبني ومسحوق مصل الحليب الحمضي، يجب أن يكون العامل الهيدروجيني بعد التعقيم 0,1 ± 8,4 في 25م° . أما بالنسبة للكازينات، الأجبان، الأجبان الطرية والقشدة الحامضة، يكون العامل الهيدروجيني 0,1 ± 7,5

التحضير

تذويب المكونات في الماء ، بالتسخين، إذا اقتضى الأمر،
يعدل العامل الهيدروجيني pH إلى أن يبلغ بعد التعقيم 0,1 ± 7,0 في 25م° .

2.2.3 محلول رينجر المخفف عند الربع

التركيب

كلورور الصوديوم NaCl 2,25 غ
كلورور البوتاسيوم KCl 0,105 غ
كلورور الكالسيوم الجاف CaCl₂ 0,06 غ
هيدروجينوكاربونات الصديوم NaHCO₃ 0,05 غ
ماء 1000 ملل

التحضير

تذويب الأملاح في الماء.
تعديل العامل الهيدروجيني إلى أن يبلغ بعد التعقيم 0,1 ± 6,9 في 25م° .

3.2.3 محلول بيبتون

التركيب

بيبتون 1,0 غ
ماء 1000 ملل

التحضير

تذويب بيبتون في الماء.
تعديل العامل الهيدروجيني إلى أن يبلغ بعد التعقيم 0,1 ± 7,0 في 25م° .

4.2.3 محلول الفوسفات

تركيب المحلول الأصلي

ثنائي هيدروجينو فوسفات البوتاسيوم
(KH₂PO₄) 42,5 غ
ماء 1000 ملل

التحضير

يذوب الملح في 500 ملل من الماء، يعدل العامل الهيدروجيني بواسطة محلول هيدروكسيد الصوديوم أو حمض الكلوريدريك لـ 1 مول /ل، إلى أن يبلغ بعد التعقيم 0,1 ± 7,2 في 25م° .

في حين، يجب عدم تعقيم الماصات في جهاز التعقيم، وذلك بسبب تكثف الرطوبة على الجوانب الداخلية للماصة أثناء التبريد مما يؤثر على دقة الحجم المراد أخذه.

2.4 تجهيزات المجانسة

يجب استعمال إحدى التجهيزات التالية :

أ- جهاز المجانسة الدوراني، يبلغ عدد الدورات فيه بين 8000 د-1 و 45000 د-1، يحتوي على كؤوس زجاجية أو حديدية مجهزة من الأفضل بأغطية ومقاومة للتعقيم.

ب- جهاز المجانسة من النوع الحلقي (Stomacher) يحتوي على أكياس بلاستيكية معقمة .

يجب أن تكون سعة الكؤوس والأكياس البلاستيكية (كيس Stomacher) كافية تسمح بمزج العينة جيدا مع الكمية المناسبة للمخفف . و على العموم، يجب أن يكون حجم الوعاء يساوي مرتين حجم العينة والمخفف معا.

3.4 رجاج له القدرة على خلط 1ملل أو 2 ملل من العينة المراد تجربتها (في حالة المواد السائلة) أو خلط التخفيفات العشرية في أنبوب ذو سعة كافية، مع 9 ملل أو 18 ملل من المخفف للحصول على معلق متجانس و ذلك عن طريق حركات دورانية خارج مركز محتوى أنابيب الاختبار (مثال زجاج فورتيكس).

4.4 قنينات يمكن أن تستوعب 90 ملل من المخفف المستعمل لتحضير المحلول الأصلي أو عدة أحجام من 90 ملل، مع ترك فراغ كافي في هذه القنينات لتسهيل عملية الرج.

5.4 أنابيب اختبار يمكن أن تستوعب 10 ملل (أو عدة أحجام من 10ملل إذا اقتضى الأمر) من العينة المراد تجربتها (إذا كانت سائلا) أو التخفيف الأولي (في حالات أخرى) أو تخفيفات عشرية المولية، مع ترك فراغ كافي في الأنابيب لتسهيل عملية الرج.

6.4 ماصات (مسدودة بواسطة قطن) ذات سعة معتبرة تقدر بـ 1ملل و فتحة سيلان تبلغ بـ 1,75مم و يبلغ قطرها 3 مم.

ينبغي عدم استعمال ماصات مشققة، و إذا استلزم الأمر يتعين أن تكون تدرجات الماصة واضحة لتمييزها عن المحتوى.

7.4 ماصات مدرجة (مسدودة بواسطة قطن) ذات سعة كبيرة نسبيا مثلا 10 ملل أو 20 ملل .

4.3 التوزيع، التعقيم وحفظ المخفف

بالنسبة للتخفيف الأولي، يوزع المخفف (3.2 أو 3.3) في القنينات (4.4)، أما بالنسبة للتخفيفات العشرية (3.2)، فتوزع في أنابيب اختبار (4.5) بكميات تسمح بعد التعقيم باحتواء كل قنينة (4.4) على 9,0 ملل (أو كميات أخرى مطلوبة) و كل أنبوب اختبار (4.5) على 9,0 ملل من المخفف أو مخفف متعدد يقدر بـ 9,0 ملل (أو كميات أخرى مطلوبة).

تسد الأنابيب و القنينات.

تعقيم بواسطة جهاز التعقيم لمدة 15 دقيقة في 121م± (يمكن أن تكون مدة التعقيم طويلة بالنسبة للأحجام الكبيرة).

في حالة عدم استعمال المخفف فوراً، يتعين حفظه بعيداً عن الضوء من 0م° إلى 5م° لمدة شهر كحد أقصى في ظروف لا يحدث فيها أي تغير في حجم المخفف أو تركيبه.

إذا أردنا إحصاء عدة مجموعات من الأعضاء المجهرية باستعمال أوساط زرع مختلفة، يمكن توزيع كل المخففات (أو البعض منها) بكميات أكبر من 9,0 ملل. يجب أن تكون أحجام أنابيب الاختبار و القنينات (4,5 و 4,4) متناسبة مع أحجام المخففات.

4- التجهيزات و الأدوات الزجاجية

تعتبر التجهيزات ذات الاستعمال الواحد مقبولة شأنها شأن الأدوات الزجاجية المعاد استعمالها، إذا كانت خصوصياتها مطابقة لخصوصيات الأدوات الزجاجية وأن تكون مقاومة للتعقيمات المتكررة وأن تكون خاملة كيميائياً.

الأدوات العادية للمخبر الميكروبيولوجي

لاسيما :

1.4 أجهزة التعقيم بالحرارة الجافة (فرن) أو بالحرارة الرطبة (جهاز التعقيم) (جهاز تعقيم معزول أو مدمج داخل نظام تحضير و توزيع الأوساط) .

يجب تعقيم الأدوات الملامسة للمخفف، للعينة المراد تجربتها و التخفيفات إلا في حالة ما إذا كانت معقمة مسبقاً (التجهيزات البلاستيكية) .

أ- سواء في الفرن، بتثبيته في درجة حرارة تتراوح بين 170م° و 175م° لمدة ساعة واحدة على الأقل .

ب- سواء في جهاز التعقيم، بتثبيته في درجة حرارة تقدر بـ 121 م± لمدة 20 دقيقة على الأقل.

تحضر التخفيفات الموالية حسب 2,6.

2.1.6 الحليب الجاف، مسحوق مصلى الحليب ، مسحوق المخيض واللاكتوز

خلط بعناية محتوى الوعاء المغلق بتحريكه
وقلبه بصفة مكررة.

إذا كانت العينة المراد تجربتها موجودة في
الرزق الأصلي ومعبأة بطريقة لا تسمح بالخلط الجيد ،
يتعين تحويلها إلى وعاء أكبر. يخلط الوعاء ثم يفتح
لاقتطاع العينة المطلوبة بواسطة ملعقة وفق الطريقة
المبينة أدناه.

يغلق الوعاء مباشرة بعد ذلك.

تسخن قنينة تحتوي على 90 ملل من المخفف
ملائم (2.3) في حمام مائي (11.4) أو مسحوق الحليب
هات ماکر (1.3.3)، إذا اقتضى الأمر ويبلغ عامله
الهيدروجيني $0,1 \pm 7,5$ في $45^\circ \text{م} \pm 1$.

وزن 10 غ من العينة المراد تجربتها في وعاء
زجاجي مناسب (مثل وعاء بيشر)، يفرغ المسحوق
ببطء في قنينة التخفيف المحتوية على المخفف
المختار أو وزن 10 غ من العينة المراد اختبارها
مباشرة في القنينة مع المخفف.

لتذويب المحتوى، تدور القنينة ببطء من أجل
تمييه المسحوق تم ترج 25 مرة لمدة 10 ثوان عن
طريق حركات تبلغ حوالي 300 مم . يمكن استعمال
جهاز المجانسة من النوع الحلقي (2.4ب) كوسيلة
أخرى للرج .

إعادة وضع القنينة في الحمام المائي لمدة 5
دقائق مع الرج من حين لآخر.

تحضر التخفيفات الموالية وفق 2.6.

من أجل الحصول على مسحوق حليب جيد
معاد تكوينه وخاصة مسحوق الحليب هات ماکر،
يمكن استعمال كريات زجاجية (8.4). وفي هذه الحالة،
يتعين وضعها في القنينات قبل التعقيم.

3.1.6 الجبن و الجبن الطري

يوزن 10 غ من العينة المراد تجربتها في كبسولة
توضع في وعاء جهاز المجانسة الدوراني (2.4أ) أو
جهاز المجانسة من النوع الحلقي (2.4ب) أو توزن 10 غ
من العينة المراد اختبارها مباشرة في الوعاء.

أثناء استعمال جهاز المجانسة الدوراني أو جهاز
المجانسة من النوع الحلقي، يضاف 90 ملل من
المخفف (2.3)، أو (1.3.3) أو (2.3.3) ويكون العامل
الهيدروجيني $0,1 \pm 7,5$ pH

8.4 كريات زجاجية، يبلغ قطرها حوالي 6 مم.

9.4 جهاز قياس العامل الهيدروجيني pH مجهز
بمعدل حراري مضبوط في 0,1 لوحدة العامل
الهيدروجيني pH .

10.4 ميزان ذو حمولة كافية مضبوط في 1%
للكتلة الصافية الموزونة.

11.4 حمام مائي معدل في $45^\circ \text{م} \pm 1$.

12.4 حمام مائي معدل في $37^\circ \text{م} \pm 1$.

5- المعايير

تتم المعايير وفق شروط مناسبة.

6- طريقة العمل

بالنسبة لبعض الأبحاث الخاصة (مثال
السالمونيلا) يشترط تقنيات خاصة أو لزوم بعض
الاحتياطات. بالنسبة لهذه الحالات، فإن التقنيات
مبينة في المنهج المعني.

يجب أن لا تجري العمليات المبينة في 1.1.6
و2.1.6 مباشرة تحت أشعة الشمس.

يتعين أخذ الاحتياطات العادية للنظافة.

1.6 تحضير العينة للتجربة و التخفيف الأولي

لتفادي إلحاق الضرر بالأعضاء المجهرية بسبب
التغير المفاجئ لدرجة الحرارة، يتعين أن تكون درجة
حرارة المخفف خلال العمليات المذكورة أدناه، هي
نفس درجة حرارة العينة المراد تجربتها، إلا في حالة
وجود مواصفات مخالفة.

1.1.6 الحليب و المنتجات الحليبية السائلة

رج العينة المراد تجربتها جيدا لضمان توزيع
متمثل بقدر الإمكان للأعضاء المجهرية ، بالقلب
السريع للوعاء المحتوي على العينة، 25 مرة . يجب
تجنب تشكل رغوة أو تركها تتبعثر. يجب أن لا
تتجاوز المدة بين الخلط واقتطاع العينة، ثلاث دقائق.

اقتطاع 1 ملل من العينة المراد تجربتها بواسطة
ماصة معقمة (6.4) و تضاف إلى 9 ملل من المخفف
(2.3) (أو 10 ملل من العينة المراد تجربتها لـ 90 ملل
من المخفف أو 11 ملل لـ 99 ملل).

- رج هذا التخفيف الأولي (مثال 25 مرة عن
طريق حركة تقدر بـ 300 مم في 7 ثوان) .وبذلك
نتحصل على تخفيف 10⁻¹.

- ترفع درجة الحرارة إلى 37 ± 1 م° في حمام مائي (12.4).

- في حالة استعمال جهاز المجانسة الدوراني ، ينقل الخليط إلى قنينة أخرى تحتوى على تخفيف معقم .

- يترك في 37 ± 1 م° لمدة 15 دقيقة .

- تترك الرغوة تتوزع ، قبل مواصلة العمل .

- تحضر التخفيفات المولية وفق 2.6.

6.1.6 الزبدة

توزن 10 غ من العينة المراد تجربتها في وعاء و توضع في الحمام المائي (11.4) في 45 ± 1 م° .

يترك الوعاء في الماء إلى غاية ذوبان العينة.

يضاف 90 ملل من المخفف (2.3) ثم يخلط .

يسهل إنجاز هذه العملية، في حالة استعمال جهاز المجانسة من النوع الحلقي (2.4ب).

كما يمكن العمل فقط على الطبقة المحتوية على الماء لتحضير التخفيف كما يلي :

تؤخذ كمية تقدر بـ 50 غ تحتوي على حوالي 8 ملل من الماء و يضاف إليها 42 ملل من المخفف (3.2.3) ثم يعاد تسخينه في 45 ± 1 م° .

يوضع الوعاء في الحمام المائي (11.4) في 45 ± 1 م° إلى غاية ذوبان الزبدة. يخلط جيدا و يترك على الأكثر 15 دقيقة إلى غاية حدوث الانفصال .

لفصل الطبقات، إذا اقتضى الأمر، توضع العينة الخاصة باختبار الذوبان في أنبوب الطرد المركزي معقم (أو تدوب العينة المراد تجربتها مباشرة في أنبوب الطرد المركزي) حيث تبلغ سرعة الدوران من 1000د-1 إلى 2000د-1 .

تقتطع الطبقة الدسمة (العليا) بطريقة معقمة بواسطة أنبوب معقم متصل بمضخة فارغة.

تقتطع الطبقة السفلى.

تحضير التخفيفات المولية وفق 2.6.

7.1.6 المنتجات الحليبية المجمدة (بما فيها

المثلجات الموضوعة للاستهلاك)

تطبق نفس الطريقة الخاصة بالزبدة (6.1.6)

(الطريقة الأولى) ولكن باستعمال حمام مائي (12.4) في 37 ± 1 م° على الأكثر.

تخلط المادة إلى غاية توزيعها الكامل (من دقيقة واحدة إلى 3 دقائق). في حالة استعمال جهاز المجانسة الدوراني، نعمل لمدة كافية للحصول على دوران إجمالي يبلغ من 15000 إلى 20000 دورة.

- حتى في حالة استعمال جهاز المجانسة الدوراني الأقل سرعة، ينبغي أن لا تتجاوز المدة 2,5 دقيقة. من الأفضل أن لا تتجاوز درجة حرارة التوزيع 40 ± 1 م° و أن لا تتعدى في أي حال 45 ± 1 م°. تترك الرغوة لتتوزع.

- تحضر التخفيفات المولية وفق 2.6.

4.1.6 حمض الكازيين، الكازيين اللبني، حمض

مسحوق مصلى الحليب

وزن 10 غ من العينة المراد تجربتها ووضعها في كبسولة.

توضع العينة في قنينة التخفيف تحتوي على كريات زجاجية (8.4) و 90 ملل من مخفف هيدروجينو الفوسفات ثنائي البوتاسيوم (2.3.3) ويكون العامل الهيدروجيني $0,1 \pm 8,4$ p H وهذا يتعلق بـ حمض الكازيين و الكازيين اللبني .

تترك القنينة في درجة حرارة محيطية لمدة 15 دقيقة ثم ترفع درجة الحرارة إلى 37 ± 1 م° في حمام مائي (12.4).

تترك القنينات في 37 ± 1 م° لمدة 15 دقيقة مع تحريكها بقوة من حين لآخر .

تجنب استعمال جهاز المجانسة الدوراني (2.4 أ) أو جهاز من النوع الحلقي (2.4ب) بسبب تشكل الرغوة .

- تحضير التخفيفات المولية وفق 2.6.

5.1.6 الكازينات

توزن 10 غ من العينة المراد تجربتها في كبسولة وتوضع في وعاء جهاز المجانسة الدوراني (2.4 أ) أو في جهاز المجانسة من النوع الحلقي (2.4ب) أو توزن 10 غ من العينة المراد اختبارها مباشرة في الوعاء. إضافة 90 ملل من مخفف هيدروجينو- فوسفات ثنائي البوتاسيوم (2.3.3) و يكون العامل الهيدروجيني $0,1 \pm 7,5$ وفي درجة حرارة محيطية.

يخلط لحوالي دقيقتين . في حالة استعمال جهاز المجانسة الدوراني ، ينبغي العمل لمدة كافية للحصول على دوران إجمالي يبلغ من 15000 إلى 20000 دورة . حتى بالنسبة لجهاز المجانسة الدوراني الأقل سرعة يجب أن لا تتجاوز المدة 2,5 دقيقة.

المعقم (2.3) و ذلك باستعمال التخفيف 10-2 و التخفيفات الموالية من أجل الحصول على تخفيفات 10-3، 10-4 الخ، إلى غاية الحصول على العدد المناسب للأعضاء المجهرية للملييلتر الواحد(أنظر2).

- في حالة اقتطاع 10 ملل بإضافة 90 ملل أو اقتطاع 11 ملل بإضافة 99 ملل، ففي هذه الحالة، يتم الخلط بطريقة يدوية كما هو مبين في 1.1.6.

3.6 مدة العمليات

يجب أن لا تتجاوز المدة بين نهاية تحضير التخفيف الأولي و خلط التخفيفات و الأوساط (المبينة وفق الطرق الخاصة) أكثر من 15 دقيقة .



قرار مؤرخ في 26 رجب عام 1425 الموافق 11 سبتمبر سنة 2004 يجعل منهج المراقبة الميكروبيولوجية للحليب المبستر إجباريا.

إن وزير التجارة،

- بمقتضى المرسوم التنفيذي رقم 90 - 39 المؤرخ في 3 رجب عام 1410 الموافق 30 يناير سنة 1990 والمتعلق بمراقبة 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 القرار الوزاري المشترك المؤرخ في 29 صفر عام 1414 الموافق 18 غشت سنة 1993 والمتعلق بمواصفات بعض أنواع الحليب المعد للاستهلاك وعرضه،

- وبمقتضى القرار المؤرخ في 14 صفر عام 1415 الموافق 23 يوليو سنة 1994 والمتعلق بالمواصفات 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 و المتمم والمذكور أعلاه، يهدف هذا القرار إلى جعل منهج للمراقبة الميكروبيولوجية للحليب المبستر إجباريا.

يجب أن لا تتجاوز درجة حرارة العينة المراد تجربتها، درجة حرارة الحمام المائي .

تحضر التخفيفات الموالية وفق 2.6.

8.1.6 الفلان، التحليات، الحليب المخمر و القشدة

توزن 10 غ من العينة المراد تجربتها في قنينة (4.4) تحتوي على كريات زجاجية (8.4).

بالنسبة للفلان و التحليات و القشدة المرطبة، نضيف 90 ملل من المخفف (2.3) ثم يرج ليتوزع .

بالنسبة للحليب المخمر و القشدة الحامضة، يستعمل المخفف (2.3.3) ذو عامل هيدروجيني $7,5 \pm 0,1$. يمكن استعمال جهاز المجانسة الدوراني من النوع الحلقي (2.4 ب).

تحضر التخفيفات الموالية وفق 2.6.

2.6 التخفيفات العشرية التالية

- ليس من الضروري تحضير التخفيفات العشرية، في حالة البحث عن وجود أو غياب عضو مجهري في 0,1 ملل أو 0,1 غ من المنتج .

- يدخل بواسطة ماصة جديدة، 1 ملل من التخفيف الأولي (مثال، 1.1.6 أو 2.1.6) في أنبوب جديد يحتوي على 9 ملل من مخفف معقم (2.3) مع تفادي اتصال الماصة بالمخفف. تستعمل ماصة جديدة لكل تخفيف .

- في حالة استعمال أحجام كبيرة، يدخل 10 ملل من التخفيف الأولي في قنينة تحتوي على 90 ملل من مخفف معقم (2.3) أو 11 ملل من التخفيف الأولي لـ 99 ملل من مخفف معقم (2.3).

- عندما يشترط استعمال تخفيف 10-3، أثناء الممارسة العادية ففي هذه الحالة، يتعين إضافة 1 ملل من التخفيف الأولي لـ 99 ملل من مخفف معقم (2.3) .

- الخلط بعناية 10 مرات إما عن طريق الامتصاص الطردي بواسطة ماصة جديدة و إما عن طريق استعمال خلاط ميكانيكي (3.4) لمدة 5 إلى 10 ثوان للحصول على تخفيف 10-2.

- يتعين اختيار سرعة الدوران بطريقة تجعل السائل المدور يلامس حافة الوعاء بـ 2 سم إلى 3 سم .

وإذا اقتضى الأمر، إعادة هذه العمليات بالمخفف

3.2 تحضير التخفيفات العشرية

عند الاستعمال، يوزع المخفف بصفة نظيفة بمقدار 9 ملل في أنابيب معقمة لـ 20x 200 مم. لتحضير التخفيفات، يستعمل المخفف ذو درجة حرارة محيطية.

يتم الحصول على التخفيف عند 1/10 ينقل بصفة نظيفة 1 ملل من الحليب إلى 9 ملل من المخفف (2.1) بواسطة ماصة معقمة تبلغ سعتها 1 ملل.

للحصول على التخفيف عند 1/100، ينقل 1 ملل من التخفيف عند 1/10 في أنبوب ثاني يحتوي على مخفف بواسطة ماصة جديدة معقمة تبلغ سعتها 1 ملل.

تحضر التخفيفات المولية بنفس الطريقة.

أثناء تحضير التخفيفات و قبل زرعها، تخلط بعناية لمدة 5 إلى 10 ثوان بواسطة رجاج ميكانيكي ذي حركة دورانية خارج المركز.

3 - إحصاء الأعضاء المجهرية الهوائية في 30م³ الهلام للإحصاء

1.3 التركيب

بيبتون بنكرياسي للكازيين (تريببتون)..... 5,0 غ

مستخلص الخميرة المجففة 2,5 غ

غلوكوز منزوع الماء 1,0 غ

مسحوق الحليب منزوع الزبدة (خال من المواد المثبطة) 10 غ

أو حليب منزوع الزبدة (خال من المواد المثبطة)..... 10 ملل

أغار - أغار من 12 إلى 18 غ

ماء مقطر 1000 ملل

2.3 التحضير

تذوب المكونات أو الوسط الكامل الجاف في الماء حتى الغليان وإذا اقتضى الأمر، يعدل العامل الهيدروجيني حيث يكون بعد التعقيم $7 \pm 0,1$ في 25°م .

يوزع بمقدار 100 ملل في أنابيب ذات سعة مناسبة أو من 12 إلى 15 ملل في أنابيب لـ 18x180 مم أو 20x 200 مم.

يعقم بواسطة جهاز التعقيم في $121^{\circ}\text{م} \pm 1$ لمدة 20 دقيقة. يمكن حفظ الوسط ثلاثة أشهر على الأكثر في وسط مظلم في 0°م إلى 5°م .

المادة 2 : من أجل المراقبة الميكروبيولوجية للحليب المبستر، تلزم مخابر مراقبة الجودة و قمع الغش و تلك المعتمدة لهذا الغرض باستعمال المنهج المبين في الملحق.

كما يجب أن يستعمل هذا المنهج من طرف المخبر عند الأمر بإجراء خبرة.

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

حرر بالجزائر في 26 رجب عام 1425 الموافق 11 سبتمبر سنة 2004.

نور الدين بوكروح

الملحق**منهج المراقبة الميكروبيولوجية للحليب المبستر
1 - تحضير العينة للتجربة**

من الضروري جعل العينة متجانسة قبل كل تحليل، على سبيل المثال رج الرزم بعناية و بسرعة، 25 مرة أو تطبق التقنيات المناسبة التي تعطي نتائج مطابقة.

فتح الرزم بصفة نظيفة، بعد تنظيف الفتحة بالإيتانول.

إجراء التحليل البكتيريولوجي في مدة لا تتعدى ثلاث دقائق.

تحفظ العينة في 6°م إلى حين إجراء التحليل.

2 - التخفيفات العشرية

تحضر التخفيفات العشرية بالمخفف التالي.

1.2 التركيب

بيبتون البنكرياسي للكازيين (تريببتون)..... 1 غ

كلورور الصوديوم 8,5 غ

ماء مقطر 1000 ملل

2.2 التحضير

تذوب المكونات في الماء بالتسخين الخفيف، وإذا اقتضى الأمر يعدل العامل الهيدروجيني pH، بحيث يكون بعد التعقيم $7 \pm 0,1$ في 25°م .

مثال على ذلك، يوزع بمقدار 100 ملل في قارورات ذات سعة مناسبة.

تعقم بواسطة جهاز التعقيم في $121^{\circ}\text{م} \pm 1$ لمدة 20 دقيقة.

العدد/ ملل :

$$28590 = \frac{629}{0,022} = \frac{28+33+290+278}{2^{-10} (2 \times 0,1 + 2)}$$

للتعبير عن عدد الأعضاء المجهرية، نكمل عدد صحيح إلى رقمين رمزيين.

إذا كان العدد المراد تكملته إلى عدد صحيح هو 5، يكتمل إلى عدد صحيح بطريقة تكون القيمة الموجودة في الجهة اليسرى زوجية.

في المثال المذكور، أعلاه، تقرب النتيجة إلى 29000 أو $2,9 \times 10^4$ إذا كانت العلب تحتوي على أقل من 10 مستعمرات، يعطى عدد الأعضاء المجهرية للملييلتر الواحد على شكل أقل من 10 ت حيث "ت" هو عكس عامل التخفيف الأكثر ضعفا.

إذا كانت العلب تحتوي على أكثر من 300 مستعمرة، نقوم بالتقدير انطلاقا من العلب التي تحتوي على عدد المستعمرات القريب من 300 مستعمرة. تعطى النتيجة بذكر (العدد المقدر للأعضاء المجهرية للملييلتر الواحد).

يمكن التعبير عن النتيجة بعدد يتراوح بين 1 و9,9 مضروب في 10^س حيث "س" هو القوة المناسبة لـ10.

إذا أظهرت التجربة، بأن النتيجة المرتفعة لاختبارين مستقلين أجريا على نفس العينة، تتجاوز في أغلب الأحيان النتيجة الأدنى بنسبة 30%، فإنه يتعين على المحلل توضيح طريقة عمله لتحديد مصدر الأخطاء.

4 - إحصاء الكوليفورم في 30م³ والكوليفورم البرازي

استعمال الهلام الذي يحتوي على لاكتوز وديزوكسيكولات الصوديوم بنسبة 0,5%.

1.4 التركيب

بيبتون.....10 غ
لاكتوز.....10 غ
ديزوكسيكولات الصوديوم.....0,5 غ
كلورور الصوديوم.....5 غ
سترات الصوديوم.....2 غ
أغار - أغار.....من 12 إلى 15 غ
أحمر عادي.....0,03 غ
ماء مقطر.....1000 ملل

3.3 طريقة العمل

ينقل مرتين 1 ملل من التخفيفات المتحصل عليها (3.2) في علب بيتري معقمة يبلغ قطرها 90 أو 100 مم. يصب من 12 إلى 15 ملل من الوسط مذوب مسبقا ومبرد في حمام مائي في 45م[±] 0,5 (يجب أن لا يتجاوز الحفظ في الحمام المائي 3 ساعات). يخلط الإينوكولوم في المركز بعناية.

يترك ليتجمد مع وضع العلب على سطح بارد وأفقي.

توضع علب بيتري مقلوبة في المجفف في 30م[±] 1 لمدة 72 ± 2 ساعة.

يجب أن لا تتجاوز المدة بين تحضير التخفيفات و إدخال الهلام في العلب 15 دقيقة.

4.3 التعبير عن النتائج

يحتفظ بعلب بيتري المحتوية على عدد المستعمرات التي تتراوح بين 10 و 300 و ذلك من أجل إحصائها. تستعمل، إذا اقتضى الأمر، عدسة ذات تكبير 1,5 على الأكثر.

5.3 طريقة الحساب

يحسب عدد الأعضاء المجهرية للملييلتر واحد من الحليب عن طريق الصيغة التالية :

$$\frac{\text{العدد الإجمالي للمستعمرات المحسوبة}}{\text{العدد / ملل :}} = \frac{\text{الحجم المزروع للعينة}}{\sum M}$$

أو

$$(1ع + 0,1ع 2) ت$$

بمعنى :

م : العدد الإجمالي للمستعمرات المحسوبة .

1ع : عدد العلب المحسوبة في التخفيف الأول .

2ع : عدد العلب المحسوبة في التخفيف الثاني.

ت : عامل التخفيف الذي انطلقا منه تم الحصول على الحسابات الأولى.

مثال : التخفيف 2-10 278 و 290 مستعمرة

التخفيف 3-10 33 و 28 مستعمرة

إذا كانت القيم متحصلا عليها انطلاقا من التخفيف العشري تضرب في عكس عامل التخفيف. يمكن التعبير عن النتيجة بعدد يتراوح بين 1 و 9,9 مضروب في 10^س حيث "س" هي القوة المناسبة لـ 10.

5 - إحصاء ستافيلوكوكس

استعمال هلام بيرد باركر.

1.5 التركيب

بيبتون البنكرياسي للكازيين (تربيتون).....10 غ
مستخلص الخميرة.....1 غ
مستخلص اللحم.....5 غ
الغليسين.....12 غ
كلورور الليتيوم.....5 غ
أغار-أغار.....من 12 إلى 20 غ
ماء.....1000 ملل

تذوب المكونات في الماء ثم تسخن حتى الغليان، وإذا اقتضى الأمر، يعدل العامل الهيدروجيني pH حيث يكون بعد التعقيم 7,2 ± 0,1 في 25°م.

يوزع الوسط بمقدار 90 ملل في قارورات ذات سعة مناسبة.

يعقم بواسطة جهاز التعقيم في 121°م ± 1 لمدة 15 دقيقة. يمكن حفظ الوسط لمدة شهر بين 0°م + 5°م.

2.5 الوسط الكامل و تحضير العلب

عند الاستعمال و بعد ذوبان الوسط الأساسي (1,5)، يبرد الوسط في حمام مائي في 50°م مع إضافة لـ 90 ملل :

- محلول مائي لتلوريت البوتاسيوم بنسبة 1 % : 1 ملل .

- محلول مائي لبيروفات الصوديوم بنسبة 20 % : 5 ملل.

- مستحلب صفار البيض، ذو تركيز يقدر بحوالي 20 % : 5 ملل.

الخلط بعناية عند كل إضافة ثم يصب الوسط بمقدار 28 ± 1 ملل في علب بيتري يبلغ قطرها 140 مم أو يصب 15 ملل أو 20 ملل في علب يبلغ قطرها 90 مم أو 100 مم على التوالي.

يترك ليتجمد، ثم تجفف (incuber) العلب مقلوبة ويغطاء مفتوح في المجفف من 45°م و 53°م لمدة 30 دقيقة .

2.4 التحضير

يتم التحضير فوريا. تحضر الكمية المناسبة مع عدم تعقيم في جهاز التعقيم.

تذوب المكونات أو الوسط الكامل الجاف في الماء و يترك يغلي.

يبرد الوسط بإبقائه في حمام مائي في 45°م ± 0,5.

اجتناب الإفراط في تسخين الوسط : إن التسخين المطول أو المكرر، يقلل من إنتقائيته ويضر بخاصية الاختبار .

3.4 طريقة العمل

ينقل على مرتين 1 ملل من الحليب و 1 ملل من التخفيف عند 1/10 (3.2) في علب بيتري معقمة يتراوح قطرها بين 90 أو 100 مم.

يصب 12 ملل من الهلام يحتوي على ديزو كسيكولات ثم يخلط الإينوكولوم مع الوسط . يترك ليتجمد بوضع العلب فوق سطح بارد وأفقي. عندما يتجمد الوسط، يصب حوالي 4 ملل من الوسط غير المزروع. يترك ليتجمد من جديد.

1.3.4 الكوليفورم في 30°م

توضع علب بيتري مقلوبة في مجفف في 30°م ± 1 لمدة 24 ± 2 ساعة.

2.3.4 الكوليفورم البرازي

توضع علب بيتري مقلوبة في مجفف في 44°م ± 1 لمدة 24 ± 2 ساعة.

4.4 التعبير عن النتائج

1.4.4 انتقاء العلب

من أجل الحساب، يحتفظ بعلب بيتري التي تحتوي على أقل من 150 مستعمرة مميزة حمراء، داكنة يبلغ قطرها أقل من 0,5 مم.

2.4.4 طريقة الحساب

تعطى نتيجة الكوليفورم للمليتر الواحد من الحليب، بعد إجراء المعدل الجبري للمستعمرات المحسوبة على علب مزروعة لنفس حجم العينة.

كما يمكن الحصول على النتيجة انطلاقا من المعدل الجبري بين القيم المتحصل عليها عن طريق اختبار 1 ملل من الحليب و التخفيف العشري إلا في حالة ما إذا كانت نسبة القيمة الضعيفة أكبر من 2، فهنا، تؤخذ كنتيجة القيمة الأكثر ضعفا.

و يحتفظ من أجل الحساب، بالعلب المحتوية على أقل من 250 مستعمرة مميزة أو غير المميزة لكل علبة 140 مم وبالعلب المحتوية على 150 مستعمرة مميزة و/ أو غير مميزة لكل علبة 90 مم أو 100 مم .

من أجل اختبار الكواقولاس، تقتطع خمس مستعمرات مميزة و/ أو غير مميزة كحد أقصى، يؤخذ بعين الاعتبار العدد الخاص لكل منها.

بنفس الطريقة، تقتطع عشر مستعمرات كحد أقصى بالنسبة لحجم موزع على ثلاث أقسام أو مضعف العدد .

3.3.5 اختبار الكواقولاس

تزرع المستعمرة في مرق القلب و تجفف في المجفف في 37°م لمدة 20 إلى 24 ساعة .

من أجل اختبار الكواقولاس، يستعمل بلازما الأرنب المحتوية على EDTA (حمض الأتيلين ثنائي أمين تيترا أستيك) في حالة عدم وجود هذه الأخيرة، يضاف محلول EDTA بشكل تكون نسبة التركيز النهائي في بلازما أعيد تمييها 0,1 % .

يعتبر الاختبار إيجابيا، عندما يغطي الكواقولوم أكثر من ثلاث أرباع الحجم الأولي .

4.5 التعبير عن النتائج

إذا كانت على الأقل 80 % من المستعمرات المختبرة ذات كواقولاس إيجابي، فتعتبر كل المستعمرات المحسوبة موافقة لاستافيلوكوكوس اوروس أو يعبر عن النتيجة الإجمالية بأخذ بعين الاعتبار النسب (مستعمرات مميزة و مستعمرات غير المميزة). يمكن التعبير عن النتيجة بعدد يتراوح بين 9,9 مضروب في 10 س حيث "س" هو القوة المناسبة لـ 10.

6 - البحث عن السالمونيلا

1.6 استعمال الأوساط الكاملة المنزوع منها الماء و الموافقة للبيانات المذكورة أدناه.

2.6 طريقة العمل

1.2.6 الاغتناء الأولي

لتسهيل طريقة العمل، تقتطع بصفة نظيفة 250 ملل من الحليب لكل وحدة من الوحدات الخمس و تجمّع في وعاء معقم تقدر سعته من 5,1 إلى 2 لتر .

يترك في درجة حرارة محيطية لمدة ساعة واحدة، يعدل العامل الهيدروجيني إذا اقتضى الأمر، إلى حوالي 6,8. ندخل بصفة نظيفة 2,25 ملل من محلول مائي إلى 1% من الأخضر اللامع. يخلط بعناية.

إجراء الزرع خلال 30 دقيقة الموالية لنهاية التجفيف (incubation)

يمكن استعمال العلب المحتوية على هلام بيرد باركر غير الجاف خلال 24 ساعة في 0°م و + 5°م .

في حالة الشك عن وجود البروتوس، ننصح بإضافة محلول سولفاميزاتين.

سولفاميزاتين.....0,2غ

محلول هيدروكسيد الصوديوم 0,1 مول/ل
10.....ملل

ماء (الكمية الكافية لـ).....100ملل

يذوب سولفاميزاتين في محلول هيدروكسيد الصوديوم، يكمل إلى 100ملل بإضافة الماء .

يعقم المحلول عن طريق الترشيح على غشاء .

عند الاستعمال، وبعد ذوبان الهلام، يضاف 27,5 ملل من هذا المحلول إلى 100ملل من الوسط الأساسي.

3.5 طريقة العمل

1.3.5 الزرع

يتم زرع 1ملل من الحليب حسب شكل علب بيتري بالطريقة التالية :

علب ذات 140مم : ينشر على سطح الوسط الحجم الإجمالي بواسطة ناشر زجاجي معقم.

علب ذات 90 مم أو 100 مم : توزيع 1ملل على سطح الوسط لثلاث علب بيتري على شكل ثلاثة أقسام متساوية تقريبا ثم تنشر بواسطة نفس الناشر للعلب الثلاثة.

بعد 15 دقيقة، توضع علب بيتري مقلوبة في المجفف في 37 ± 1°م لمدة 24 إلى 48 ساعة.

2.3.5 انتقاء العلب و اختيار المستعمرات

بعد التجفيف (incubation) لمدة 24 و 48 ساعة، نؤشر في قعر العلب على المستعمرات المميزة و/أو غير المميزة.

المستعمرات المميزة: مستعمرات سوداء، لامعة، محدبة محاطة بمنطقة شبه شفافة. يمكن أن يظهر في هذه المنطقة الشفافة بعد 24 ساعة، حلقة متألئة متصلة مباشرة مع المستعمرات.

المستعمرات غير المميزة: مستعمرات سوداء لامعة، محدبة أو رمادية سوداء لديها في بعض الأحيان مظهر جامد و نسيجها جاف لا تحتوي على منطقة شفافة (ماعدا بعض المستعمرات الرمادية السوداء).

– وبمقتضى القرار المؤرخ في 14 صفر عام 1415 الموافق 23 يوليو سنة 1994 والمتعلق بالموصفات 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 و المتمم والمذكور أعلاه ، يهدف هذا القرار إلى جعل منهج لإحصاء الكوليفورم في القشدة المثلجة و المثلجات بالحليب إجباريا .

المادة 2 : من أجل إحصاء الكوليفورم في القشدة المثلجة و المثلجات بالحليب ، فإن مخابر مراقبة الجودة وقمع الغش وتلك المعتمدة لهذا الغرض ملزمة باستعمال المنهج المبين في الملحق.

كما يجب أن يستعمل هذا المنهج من طرف المخبر عند الأمر بإجراء خبرة.

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

حرر بالجزائر، في 26 رجب عام 1425 الموافق 11 سبتمبر سنة 2004.

نور الدين بوكروح

الملحق

منهج لإحصاء الكوليفورم في القشدة المثلجة والمثلجات بالحليب.

1 – التعريف

تطلق تسمية " الكوليفورم " على البكتيريات ذات الشكل العصوي وغرام سلبي وهوائية ولا هوائية اختياريًا، غير مبوغة والتي تخمر اللاكتوز مع تشكل الغاز و الحمض.

2 – مبدأ الطريقة

2..1 – الطريقة المرجعية

تستعمل ثلاث سلاسل من التخفيفات الموازية المتحصل عليها انطلاقًا من عينة من المنتج، في زرع الوسط السائل المختار " الأخضر اللامع، اللاكتوز و الحويصل الصفراوي للبقرة" داخل أنابيب اختبار محتوية على أنبوبات دورهام Durham. تجفف الأنابيب لمدة 2 ± 48 ساعة في 30 ± 1 م°.

تخضع الأنابيب الإيجابية (تشكل الغاز في أنابيب دورهام) لاختبار الإثبات و ذلك بإعادة زرع

يجفف بالمجفف في 37 م° لمدة 20 ± 2 ساعة.

2.2.6 الاغتناء النهائي

إدخال 10 ملل من الحليب المغذي مسبقا في 100 ملل من مرق مولير- كوفمان يحتوي على تيترايونات والأخضر اللامع، يجفف في حمام مائي في 43 م° ± 1 لمدة 48 ساعة و في 100 ملل من مرق سيلينات - سيستين، يجفف في المجفف في 37 م° ± 1 لمدة 48 ساعة.

3.2.6 العزل

بعد التجفيف (incubation)، يجرى العزل انطلاقا من كل مرق. إجراء العزل على سطح وسطين مختارين صليبين يصبان من الأفضل في علب بيتري ذات 140م. استعمال الهلام المحتوي على الأخضر اللامع وأحمر الفينول والهلام المحتوي على سولفات بيسميث .

بسبب احتمال وجود سالمونيلا غير النموذجي ولاكتوز الموجب، نستطيع استبدال الهلام المحتوي على الأخضر اللامع وأحمر الفينول بوسط آخر مختار مثال على ذلك، هلام XLD، هلام هيكتوان.

إعادة العلب إلى المجفف في 37 م° لمدة 18 إلى 20 ساعة . إذا كانت مدة التجفيف غير كافية لنمو المستعمرات، نواصل التجفيف (incubation).

إخضاع عدد كاف من المستعمرات المميزة أو المشكوك فيها لاختبارات بيوكيميائية الكلاسيكية.



قرار مؤرخ في 26 رجب عام 1425 الموافق 11 سبتمبر سنة 2004، يجعل منهج إحصاء الكوليفورم في القشدة المثلجة و المثلجات بالحليب إجباريا.

إن وزير التجارة ،

– بمقتضى المرسوم التنفيذي رقم 90 – 39 المؤرخ في 3 رجب عام 1410 الموافق 30 يناير سنة 1990 والمتعلق بمراقبة 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 القرار الوزاري المشترك المؤرخ في 29 صفر عام 1414 الموافق 18 غشت سنة 1993 والمتعلق بالموصفات لبعض أنواع الحليب المعد للاستهلاك وعرضه،

2.3 - تحضير العينات**1.2.3 - قبل زرع الوسط، تسيل العينات بالطريقة الآتية :**

- بالنسبة للعينات المقتطعة وفق : 1.1.3 ينزع الرزم و توضع العينات في وعاء زجاجي معقم و مغلق.

- بالنسبة للعينات المقتطعة وفق 2.1.3، تترك في القارورات.

تسيل هاتان العينتان في أوعية أو قارورات بوضعها في حمام مائي أو مجفف في 45°م ± 1 المدة الكافية لذوبانها.

2.2.3 تخلط العينات المسيلة بعناية ثم تقتطع بصفة نظيفة 10غ (أو الوزن الأقرب بدقة) في قارورات أسطوانية و مخروطية الشكل محتوية على كريات زجاجية. يمكن استعمال ملعقة أو ماصة و هذا حسب صلابة المنتج.

3.2.3 يضاف لـ 10غ (أو الوزن الأقرب إلى 10غ) الموجود في القارورة المحتوية على الكريات الزجاجية، 90 ملل (أو 9 مرات الوزن الأقرب بدقة إلى 10غ) من محلول رينجر المخفف عند الربع و المسخن مسبقا في 45°م. بعد سد القارورة، ترج 20 مرة عن طريق حركات اهتزازية تقدر بحوالي 30 سم.

4 - التجهيزات و الأدوات الزجاجية**التجهيزات العادية للمخبر.****5 - وسط الزرع**

1.5 يتركب وسط الأخضر اللامع، اللاكتوز بالحويصل الصفراوي للبقرة من مائأتي:

بيبتون.....10.غ

لاكتوز.....10.غ

الحويصل الصفراوي للبقرة منزوع الماء20.غ

الأخضر اللامع.....0,0133.غ

ماء مقطر (في جهاز زجاجي)1000 ملل

2.5 لتحضير 1000 ملل من الوسط، يذوب بيبتون و اللاكتوز في حوالي 500 ملل من الماء المقطر.

يذوب 20غ من الحويصل الصفراوي للبقرة المنزوع الماء في 200 ملل من الماء المقطر. يجب أن يتراوح العامل الهيدروجيني لهذا المحلول بين 7,0 و 7,5. يخلط المحلولان، يعدل العامل الهيدروجيني

أوز (ose) في أنبوب جديد لنفس الوسط. انطلاقا من الأنابيب التي أعطت نتيجة إيجابية بعد اختبار الإثبات، يتم تحديد العدد الأكثر احتمالا لبكتيريات الكوليفورم لغرام من المنتج وذلك بالاستناد على جدول العدد الأكثر احتمالا (ع أ) لثلاث سلاسل موازية.

2..2 الطريقة الروتينية

يزرع الوسط الصلب "الأحمر البنفسجي- الحويصل الصفراوي - أغار " المصب في علب بيتري مع سلسلة من التخفيفات من عينة من المنتج.

بعد تجفيف (incubation) العلب لمدة 22 ± 2 ساعة في 30°م ± 1، تحسب عدد المستعمرات الحمراء المميزة.

يعبر هذا العدد عن عدد بكتيريات الكوليفورم لغرام من المنتج وذلك بعد ضربه في عامل التخفيف.

(يمكن استعمال طريقة الأخضر اللامع المبين في الفقرة 1.2، كطريقة روتينية، و ذلك بعد تغييرها، و في هذه الحالة، نهمل زرع السلاسل الموازية اللازمة لاستعمال جدول ع أ و كذا اختبار الإثبات للأنابيب الإيجابية).

3- المعايير**1.3- معايرة المخبر**

1.1.3 بالنسبة للقشدة المثلجة و الثلجات بالحليب الموجودة في رزم صغيرة، تقتطع وحدات كاملة مشحونة في رزمها الأصلية.

2.1.3 بالنسبة للقشدة المثلجة و الثلجات بالحليب غير المعبأة (الموجهة للبيع في قاعات الشاي و المطاعم، أو من طرف الموزعات الآلية للخدمة الذاتية... الخ)، تقتطع بصفة نظيفة من 30 إلى 50غ من المنتج الإجمالي في أماكن مختلفة بقدر الإمكان. تحفظ هذه العينات في 5°م في قارورات ذات عنق عريض مجهزة بأغطية لولبية.

3.1.3 يجب أن تحفظ العينات (1.1.3 و 2.1.3) مجمدة قبل التحليل. و يتم نقل العينات إلى المخبر لغرض التحليل في أوعية مبردة. من الأفضل إجراء التحليل فوريا، في حالة العكس، تحفظ العينات في مكان مبرد في -15°م كحد أقصى.

6 - المخفف

محلول رينجر المخفف عند الربع . يتركب المحلول المركز مما يأتي :

كلورور الصوديوم (NaCl) 9,00 غ

كلورور البوتاسيوم (KCl) 0,42 غ

كلورور الكالسيوم المجفف (CaCl₂) 0,24 غ

بكربونات الصوديوم (NaHCO₃) 0,20 غ

ماء مقطر (في جهاز زجاجي) 1000 ملل

للاستعمال، تضاف كمية من المحلول السابق إلى ثلاث كميات من الماء المقطر. يعقم المحلول المخفف عن طريق التسخين في 120°م لمدة 15 دقيقة.

يمكن أيضا استعمال محلول بيتون عند 0,1% عوض من محلول رينجر المخفف عند الربع.

كما نستطيع استعمال أقراص جاهزة للاستعمال تمثل جرعة محضرة.

يجب أن تكون الكواشف من النوعية التحليلية.

7 - طريقة العمل**1.7 تحضير التخفيفات****1.1.7 للزرع المباشر للوسط المغذي**

- بالنسبة للطريقة المنهجية (1.2)، ندخل 1 ملل من العينة في ثلاث أنابيب تحتوي على 10 ملل من الأخضر اللامع - اللاكتوز و الحويصل الصفراوي للبقرة منزوع الماء و أنبوب دورهام ثم تخلط العينة بعناية مع الوسط المغذي مع تجنب تشكل فقاعات هوائية في أنابيب دورهام.

- بالنسبة للطريقة الروتينية: (2.2) نعمل بنفس الطريقة المذكورة أعلاه ولكن بإضافة 1 ملل من العينة في أنبوب واحد (عوض ثلاث أنابيب). في حالة استعمال وسط "الأحمر البنفسجي - الحويصل الصفراوي - أغار"، ندخل مباشرة 1 ملل من العينة في علب بيتري.

2.1.7 بالنسبة للتخفيفات الأخرى، نعمل كما يأتي:

- يلحق 1 ملل من الخليط (3.2.3) مباشرة في الوسط المغذي أو في علب بيتري. وبذلك نتحصل على تخفيف 10⁻¹.

المقاس بواسطة قطب زجاجي إلى 7,4، يضاف 13,3 ملل من محلول مائي إلى 0,1% من الأخضر اللامع. يكمل الحجم إلى 1000 ملل بإضافة ماء مقطر.

3.5 يفرغ 10 ملل من الوسط (2.5) في أنابيب اختبار تكون مجهزة بأنابيب دورهام . بعد الملاء، تعقم الأنابيب في جهاز التعقيم المعدل في 121°م لمدة 15 دقيقة . يجب أن يكون العامل الهيدروجيني بعد التعقيم 7,2 ± 0,1.

لزرع 10 غ ، يتعين رفع مركبات الوسط بنسبة 100% وأن تستوعب أنابيب الاختبار المجهزة بأنابيب دورهام 10 ملل من الوسط.

4.5 يتركب الوسط الأحمر البنفسجي - الحويصل الصفراوي - « أغار » من ما يأتي:

مستخلص الخميرة 3 غ

بيتون 7 غ

أملاح الحويصل الصفراوي 1,5 غ

لاكتوز 10 غ

كلورور الصوديوم 5 غ

حمر عادي (neutre) 0,03 غ

البلور البنفسجي 0,002 غ

الهلام من 10 إلى 15 غ

(حسب خصائص التجميد للهلام المستعمل)

5.5 تذوب المكونات في الماء المقطر، تترك لترتاح لبضع دقائق ثم تخلط جيدا و يعدل العامل الهيدروجيني إلى 7,4 بقياسه بواسطة قطب زجاجي. تسخن حتى الغليان مع الرج من حين لآخر، ثم نتركه يغلي لمدة دقيقتين. يبرد الوسط في 45°م و يصب في 10 ملل في كل علب بيتري.

6.5 يجب تحضير الوسط قبل الاستعمال بقليل وأن لا يعقم في جهاز التعقيم مما قد يؤدي إلى التقليل من انتقائيته. يجب استعمال الوسط إذا أمكن الأمر، خلال الثلاث ساعات الموالية للتحضير.

7.5 يجب استعمال لهذه الأوساط (1.5 و 4.5) تحضيراً عديم الماء جاهز للاستعمال ، في هذه الحالات، يجب إتباع المواصفات التقنية بدقة كما ينبغي دائما تحضير شاهد.

2.3.7 تجفف علب بيتري المحضرة كما هو مبين في الفقرة 2.2.7 أعلاه، لمدة 22 ± 2 ساعة في 30 ± 1 م. يجب احترام مدة التجفيف بدقة.

4.7 إحصاء بكتيريات الكوليفورم

1.4.7 بالنسبة للطريقة المرجعية (1.2)

يعتبر الاختبار إيجابيا، عندما يكون هناك تشكل واضح للغاز في أنابيب دورهام. يعتبر عدد الأنابيب الإيجابية التي استجابت لاختبار الإثبات (1.2) مهما لقراءة العدد الأكثر احتمالا (ع أ إ) لبكتيريات الكوليفورم وفق الجدول المبين أدناه، في نهاية المنهج، لثلاث سلاسل موازية.

يحدد العدد الأكثر احتمالا، عدد بكتيريات الكوليفورم في حجم القشدة المثلجة أو المثلجات بالحليب، كقاعدة عامة، يتم إعداد المؤشر انطلاقا من 1 غ، أو 0,1 غ أو 0,01 غ و التي تم معها زرع بالموازاة الأنابيب الثلاث الأولى.

يعبر عن عدد بكتيريات الكوليفورم بعدد الأكثر احتمالا (ع أ إ) لغرام من القشدة المثلجة و المثلجات بالحليب.

إذا كانت جميع الأنابيب إيجابية، ينبغي إعادة التحليل باستعمال تخفيفات أكثر ارتفاعا (مثال 0,1 غ، أو 0,01 غ أو 0,001 غ أو أكثر). في حالة إيجاد عدد مؤشر غير وارد في الجدول، يمكن استنتاج بأن خطأ تم ارتكابه أثناء التحليل.

2.4.7 بالنسبة للطريقة الروتينية (2.2)

1.2.4.7 بعد مدة التجفيف المحددة أعلاه، يتم حساب المستعمرات الحمراء المميزة لبكتيريات الكوليفورم بالعين المجردة.

2.2.4.7 في حالة استعمال الطريقة المبسطة (الفقرة 2.2) التي تستدعي استعمال الأخضر اللامع- اللاكتوز و الحويصل الصفراوي للبقرة، فهنا ينبغي تحديد إلى أي تخفيف نستطيع اكتشاف تشكل للغاز في أنابيب دورهام. إن التشكل الإيجابي للغاز، يبين في أي كمية من العينة توجد بيكتيريات الكوليفورم. إذن، تسمح النتائج باكتشاف بيكتيريات الكوليفورم في 1 غ، أو 0,1 غ، أو 0,01 غ... إلخ.

- يضاف 10 ملل من الخليط (3.2.3) إلى 90 ملل من محلول رينجر المخفف عند الربع ثم يلقح 1 ملل من هذا الخليط في الأوساط المغذية أو علب بيتري. وبذلك نتحصل على تخفيف 10⁻³ بالنسبة للتخفيفات الأخرى، تتبع نفس الطريقة.

2.7 زرع الوسط

1.2.7 لزرع الأنابيب بـ "الأخضر اللامع اللاكتوز والحويصل الصفراوي للبقرة":

- تزرع الأنابيب بالكمية المطلوبة للعينة والتخفيفات المناسبة بواسطة ماصة معقمة. تخلط بعناية مع تجنب تسرب الفقاعات الهوائية في أنابيب دور هام.

- زرع بالموازاة في ثلاثة أنابيب كمية من كل عينة وكمية من كل تخفيف و نعمل على ثلاث تخفيفات على الأقل، مثال 1 غ، 0,1 غ و 0,01 غ.

و على العموم، ينبغي تحضير عدد كاف من التخفيفات، حتى تبقى الأنابيب الثلاث الموازية للتخفيف الأكثر ارتفاعا، سلبية.

لا تكون النتائج المتحصل عليها صحيحة، إلا باستعمال هذه الطريقة.

2.2.7 زرع علب بيتري

- يدخل في العلب 1 ملل من العينة و 1 ملل من التخفيفات المطلوبة.

- تفرغ في كل 10 ملل من الوسط "الأحمر البنفسجي - الحويصل الصفراوي- أغار" المذوب، الموجه إلى درجة حرارة 45 م°.

- مباشرة بعد تفريغ الوسط، يخلط مع الملقح عن طريق خمس حركات ذهابا وإيابا متبوعة بخمس حركات دائرية في اتجاه عقارب الساعة ثم بخمس حركات ذهابا وإيابا تكون عمودية في المرحلة الأولى و في الأخير خمس حركات دائرية في الاتجاه المعاكس لعقارب الساعة. بعد التجمد، يغطى سطح العلبة بـ 4 ملل من الوسط السائل و يترك يتجمد.

3.7 تجفيف الأنابيب و علب بيتري

1.3.7 تجفف الأنابيب (الفقرة 2.7) لمدة 48 ساعة 30 ± 1 م ساعة في 30 ± 1 م.

9 - التكرار

1.9 الطريقة المرجعية (1.2)

ينبغي أن لا يتعدى الفرق بين نتائج التحديد المنجزة مرتين (نتائج المتحصل عليها في وقت واحد أو بصفة سريعة، الواحدة تلوى الأخرى من طرف نفس المحلل)، 30 % من النتيجة الصغرى.

2.9 الطريقة الروتينية (2.3)

يكفي تحديد واحد فقط.

8 - التعبير عن النتائج

1.8 الطريقة المرجعية (1.2)

العدد الأكثر احتمالا لواحد غرام وفق الجدول المبين أدناه .

2.8 الطريقة الروتينية (2.2).

1.2.8 عدد المستعمرات لغرام واحد = عدد المستعمرات المبينة في (1.2.4.7) يضرب في عكس التخفيف.

2.2.8 في حالة استعمال الطريقة المبسطة (2.2)، ينبغي تحديد عدد الكوليفورم الإيجابية في 1 غ، و0,1 غ و0,01 غ... الخ.

الجدول : العدد الأكثر احتمالا (ع أ) لثلاث سلاسل موازية

ع أ (ل1 غ)	المؤشر الأنابيب الإيجابية لـ			ع أ (ل1 غ)	المؤشر الأنابيب الإيجابية لـ		
	0,01 غ	0,1 غ	1 غ		0,01 غ	0,1 غ	1 غ
4,0	3	2	2	0	0	0	0
3,0	0	3	2	0,3	1	0	0
3,5	1	3	2	0,3	0	1	0
4,0	2	3	2	0,6	1	1	0
2,5	0	0	3	0,6	0	2	0
4,0	1	0	3	0,4	0	0	1
6,5	2	0	3	0,7	1	0	1
4,5	0	1	3	1,1	3	0	1
7,5	1	1	3	0,7	0	1	1
11,5	2	1	3	1,1	1	1	1
16,0	3	1	3	1,1	0	2	1
9,5	0	2	3	1,5	1	2	1
15,0	1	2	3	1,6	0	3	1
20,0	2	2	3	0,9	0	0	2
30,0	3	2	3	1,4	1	0	2
25,0	0	3	3	2,0	2	0	2
45,0	1	3	3	1,5	0	1	2
110,0	2	3	3	2,0	1	1	2
				3,0	2	1	2
				2,0	0	2	2
				3,0	1	2	2
				3,5	2	2	2