وزارة التجـارة

قرار مؤرخ في 14 شعبان عام 1436 الموافـق 2 يونيو سنـة 2015، يجعل المنهج الأفقي لإحصاء الخمائر والعفنيات بِعدٌ المستعمرات في المنتجات ذات نشاط مائي أكبر من 0,95، إجباريا.

إن وزير التجارة،

– بمقتضى المرسوم الرئاسي رقم 15–125 المؤرخ في 25 رجب عام 1436 الموافق 14 مايو سنة 2015 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 المرسوم التنفيذي رقم 13–328 المؤرخ في 20 ذي القعدة عام 1434 الموافق 26 سبتمبر سنة 2013 الذي يحدد شروط وكيفيات اعتماد المخابر قصد حماية المستهلك وقمع الغش،

– وبمقتضى القرار المؤرخ في 14 صفر عام 1415 الموافق 23 يوليو سنة 1994 المتعلق 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 والمتمم والمذكور أعلاه، يهدف هذا القرار إلى جعل المنهج الأفقي لإحصاء الخمائر والعفنيات بِعدٌ المستعمرات في المنتجات ذات نشاط مائي أكبر من 0,95، إجباريا.

المادة 2 : من أجل إحصاء الخمائر والعفنيات بِعدٌ المستعمرات في المنتجات ذات نشاط مائي أكبر من 0,95، فإن مخابر مراقبة الجودة وقمع الغش والمخابر المعتمدة لهذا الغرض، ملزمة باستعمال المنهج المبين في الملحق المرفق بهذا القرار.

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 14 شعبان عام 1436 الموافق 2 يونيو سنة 2015.

عمارة بن يونس

الملحق

المنهج الأفقي لإحصاء الخمائر والعفنيات بِعدٌ المستعمرات في المنتجات ذات نشاط مائي أكبر من 0,95

1. مجال التطبيق

يحدد هذا المنهج طريقة أفقية لإحصاء الخمائر والعفنيات القابلة للحياة الموجودة في المنتجات الموجهة للاستهلاك البشري أو الحيواني، حيث يكون نشاط الماء أكبر من 0,95 [بيض، لحم، منتوجات الحليب (ما عدا مسحوق الحليب)، الفواكه، الخضروات، عجائن طرية...إلخ] ، بواسطة تقنية إحصاء المستعمرات في درجة حرارة 25 °م ± 1 ° م.

لا يسمح هذا المنهج بإحصاء أبواغ العفنيات ولا يطبق لتحديد المجموعة الفطرية أو لاختبار الأغذية للبحث عن السموم الفطرية.

لا يتلاءم هذا المنهج لإحصاء الفطريات المقاومة للحرارة مثل بيسوكلاميس فولفا (Byssochlamys fulva) أو بيسوكلاميس نيفيا (Byssochlamys nivea) المتواجدة في الفواكه و الخضروات المعلبة أو المعبأة في قارورات.

2. مصطلحات و تعاريف

لاحتياجات هذا المنهج، تطبق المصطلحات والتعاريف الآتية :

1.2 الخمائر:

جسم دقيق هوائي محب للحرارة المعتدلة، يتطور على سطح الوسط على شكل مستعمرات (4.2) غالبا ما تشكل محيطا منتظما و سطحا محدبا نوعا ما، باستعمال وسط هلامي في الشروط الموصوفة في هذا المنهج وفي درجة حرارة 25 °م.

هناك خمائر تتطور بالأحرى في العمق أكثر منه على سطح الوسط والتي بإمكانها تشكيل مستعمرات دائرية أو عدسية الشكل.

2.2 العفنيات :

جسم دقيق هوائي محب للحرارة المعتدلة، ليفي، يطور عادة على سطح وسط هلامي، و في الشروط المحددة في هذا المنهج، خلايا برعمية أو جراثيم (3.2) مسطحة أو زغبية أو مستعمرات (4.2) تمثل غالبا أثمارا ملونة وأشكالا ذات أبواغ.

هناك عفنيات تتطور بالأحرى في العمق أكثر منه على سطح الوسط، بإمكانها تشكيل مستعمرات دائرية وعدسية الشكل.

ملاحظة : هناك أشكال متقاربة من الأجسام الدقيقة، ويمكن أن يكون التمييز بين الخمائر (1.2) والعفنيات (2.2) اعتباطيا.

3.2 خلايا برعمية أو جراثيم :

أجسام قابلة للحياة قادرة على النمو في وسط مغذ.

مثلا : خلية منبتية، مجموعة من الخلايا، بوغ، مجموعة من الأبواغ أو قطعة من المشيجة الفطرية.

4.2 المستعمرة :

هي تراكم ملحوظ ممركز لكتلة من الأجسام الدقيقة المتطورة فوق أو داخل وسط مغذ صلب انطلاقا من خلية قابلة للحياة.

3. المبدأ

1.3 تزرع علب بيتري محضرة باستعمال وسط زرع انتقائي محدد.

تستعمل كمية معينة من عينة التجربة (إذا كانت المادة سائلة) أو من المحلول الأم (في حالة المواد الأخرى) أو تخفيفات عشرية للعينة أو المحلول الأم، حسب عدد المستعمرات المرتقبة.

يمكن زرع علب إضافية في نفس الشروط باستعمال تخفيفات عشرية متحصل عليها انطلاقا من عينة التجربة أو المحلول الأم.

2.3 تحضن بعد ذلك العلب في شروط هوائية في درجة حرارة 25 °م ± 1 °م خلال خمسة (5) أيام، ثم تترك علب الهلام لترتاح في ضوء النهار من يوم (1) إلى يومين (2) إذا اقتضى الأمر.

3.3 تحصى إذن المستعمرات أو الخلايا البرعمية، (ومن أجل التمييز بين مستعمرات الخمائر والبكتيريا) تفحص المستعمرات المشكوك فيها، إذا اقتضى الأمر، بواسطة مكبرة بعدستين أو مجهر للتأكد من هويتها.

4.3 يحسب عدد الخمائر والعفنيات بالغرام أو بالميليلتر من العيّنة، انطلاقا من عدد المستعمرات أو الخلايا البرعمية أو الجراثيم المتحصل عليها في العلب المختارة بنسب تخفيفات تسمح بالحصول على مستعمرات يمكن إحصاؤها. وإذا اقتضى الأمر، تحصى العفنيات و الخمائر على حدة.

4. المخفف ووسط الزرع

1.4 المخفف

1.1.4 عموميات

لتقليل التحام أبواغ العفنيات والفطريات (conidies) يمكن أن تضاف عوامل منشطة للضغط الحلولي (tensioactifs) كمتعدد الأوكسيتيلان سوربتون مونوليات [على سبيل المثال Tween 80*]. (0,05 % تركيز في الكتلة).

يوصى باستعمال ماء بيبتوني بـ 0,1 % (تركيز في الكتلة) كمخفف، إلا في حالة تحضير خاص للعينة المأخوذة للتجربة.

2.1.4 تركيب الماء البيبتوني بـ 0,1 % (تركيز في الكتلة)

عصارة أنزيمية من نسيج حيواني و نباتي	1غ
الماء	1000 ملل

3.1.4 تحضير ماء بيبتوني بـ 0,1 % (تركيز في الكتلة)

تذاب المركبات في الماء مع التسخين إذا اقتضى الأمر.

وإذا اقتضى الأمر، يعدل العامل الهيدروجيني (pH)(4.5) عند 7 ± 0,2 في درجة حرارة 25 °م بعد التعقيم.

2.4 وسط الزرع

1.2.4 ديكلوران الوردي بانغال كلورام فينيكول أغار (DRBC)

1.1.2.4 التركيب

عصارة أنزيمية من نسيج حيواني و نباتي	5غ
D – غلوكوز ($C_6H_{12}O_6$)	10غ
فوسفات أحادي البوتاسيوم (KH_2PO_4)	1غ
سولفيت المغنزيوم ($MgSO_4,H_2O$)	0,5 غ
ديكلوران (6,2 ثنائي كلورو –4– نيتروأنيلين) (Dichloran 2,6-dichloro -4- nitroaniline)	0,002 غ
بانغال وردي	0,025 غ
هلام	12غ إلى 15غ أ
كلوروم فينيكول	0,1غ
ماء مقطر أو منزوع الشوارد	1000 ملل
أ) : حسب قدرة تهلم الهلام	

* يمكن استعمال مواد أخرى مماثلة إذا ثبت أنها تعطي نفس النتائج.

2.1.2.4 التحضير

1.2.1.2.4 عموميات

توضع كل المكونات عدا الكلورام فينيكول معلقة في الماء ثم تغلّى لإذابتها كليا، وإذا اقتضى الأمر، يعدل العامل الهيدروجيني (pH) (4.5) عند 5,6 ± 0,2 في درجة حرارة 25 °م بعد التعقيم.

يضاف إلى الإيثانول 10 ملل من محلول الكلورام فينيكول بـ 1 % (تركيز في الكتلة) ويمزج. يوزع الوسط في أوعية ملائمة (5.5) ثم يعقم في جهاز التعقيم في 121 °م خلال 15 دقيقة.

يبرد الوسط مباشرة في حمام مائي (3.5) مضبوط في درجة حرارة محصورة بين 44 °م و47 °م. يوزع هذا الوسط على شكل حصص بـ 15 ملل في علب بيتري معقمة (6.5).

يترك الوسط ليتجمد ويجف.

يستعمل مباشرة أو يحفظ في الظلام إلى حين استعماله.

ملاحظة – يجب تفادي تعرض الوسط للضوء لأن المواد الناتجة عن تحلل السموم الفطرية يمكن أن تتسبب في سوء تقييم المجموعات الفطرية في العينات.

2.2.1.2.4 إضافة اختيارية لكلورهيدرات الكلورتيتراسيكلين

بما أنه يمكن للتكاثر البكتيري أن يحدث مشكلا (في اللحوم النّيئة على سبيل المثال)، يوصى باستعمال الكلورام فينيكول (50 مغ/ل) والكلور تيتراسيكلين (50 مغ/ل).

في هذه الحالة، يحضّر الوسط الأساسي (2.1.2.4)، كما هو مبين أعلاه، مع 50 مغ من الكلورام فينيكول فقط ثم يوزع بكميات 100 ملل ويعقم.

يحضّر كذلك في الماء محلول بـ 0,1 % (تركيز في الكتلة) من كلورهيدرات الكلورتيتراسيكلين (لعدم استقراره النسبي في المحلول ، يجب أن يحضّر فورا) ويعقّم بالترشيح مباشرة قبل الاستعمال، يضاف بطريقة معقمة 5 ملل من هذا المحلول إلى 100 ملل من الوسط الأساسي، ويسكب في العلب. لا ينصح باستعمال الجونتاميسين لأنه بإمكانه تثبيط بعض أصناف الخمائر.

3.2.1.2.4 إضافة اختيارية لعناصر مؤشرة

حتى تبيّن العفنيات جميع أشكالها و خاصة جميع الصباغ التي تنتجها في العادة، تحتاج إلى عناصر مؤشرة غير موجودة في **DRBC**.

للكشف عن العفنيات في هذا الوسط، يضاف محلول العناصر المؤشرة التالي إلى 1 ملل/ل من هذا الوسط وذلك قبل وضعه في جهاز التعقيم :

– 1 غ، $ZnSO_4,7H_2O$

– 0,5 غ، $CuSO_4,5H_2O$

– 100 ملل من الماء المقطر أو منزوع الشوارد.

4.2.1.2.4 إضافة اختيارية للترجيتول* (Tergitol)

لتفادي تكاثر ميكوراسي (Mucoraceae) داخل علب الهلام ، يوصى بإضافة الترجيتول (Tergitol) 1 ملل/ل) إلى وسط الزرع.

3.1.2.4 تجارب الفعالية لضمان نوعية وسط الزرع

1.3.1.2.4 عموميات

وسط **DRBC** هو وسط صلب. يجب أن تخضع الإنتاجية والانتقائية فيه إلى تجربة حسب المواصفات الآتية :

2.3.1.2.4 الإنتاجية

– التحضين : خمسة (5) أيام في درجة حرارة 25 °م ± 1°م.

– السلالات :

– سكارو ميساس سيريفيسي ATCC 9763

– كونديدا ألبيكانس ATCC 10231

– أسبرجيلوس نيجر ATCC 16404

– موكور راسموسوس ATCC 42647

أو سلالات مسجلة كمكافئة في مجموعة فطرية أخرى.

* يمكن استعمال مواد أخرى مماثلة إذا ثبت أنها تعطي نفس النتائج.

– الوسط المرجعي : وسط زرع

(SDA) «Sabouraud Dextrose Agar»

– منهج المراقبة : كمي.

– المعايير: تقدير الإنتاجية $P_R \geq 0,5$

– التفاعلات الخاصة : مستعمرات أو خلايا برعمية أو جراثيم مميّزة حسب كل نوع.

3.3.1.2.4 الإنتقائية

– التحضين : خمسة (5) أيام في درجة حرارة 25°م ± 1°م

– السلالات :

إشيريشيا كولي ATCC 25922

أو باسيلوس سوبتيلوس ATCC 6633

أو سلالات مسجلة كمكافئة في مجموعة بكتيرية أخرى.

– منهج المراقبة : نوعي.

– المعايير : تثبيط تام.

5. الأجهزة و الأدوات الزجاجية

يسمح باستعمال الأجهزة ذات الاستعمال الوحيد بدلا من الأدوات الزجاجية المستعملة لأكثر من مرة، شرط أن توافق المتطلبات المحددة.

الأجهـزة المتداولـة في مخبر الميكروبيولوجيا ولا سيما ما يأتي :

1.5 جهاز التحضين، بإمكانه العمل في درجة حرارة 25 ° م ± 1 ° م.

2.5 ماصات ذات سيلان تام، معقمة، سعتها 1 ملل ومدرجة بـ 0,1 ملل.

3.5 حمام مائي، أو جهاز مماثل، بإمكانه العمل في درجة حرارة تتراوح من 44 °م إلى 47 °م.

4.5 جهاز قياس العامل الهيدروجيني (pH – متر)، بتدقيق ± 0,1 وحدة من العامل الهيدروجيني (pH) في درجة حرارة 25 °م.

5.5 قارورات، حوجلات وأنابيب، لتغلية وحفظ أوساط الزرع لإجراء التخفيفات.

6.5 علب بيتري، معقمة، من الزجاج أو من البلاستيك، يتراوح قطرها من 90 ملم إلى 100 ملم.

7.5 مجهر، لتمييز الخمائر عن الخلايا البكتيرية (قاع فاتح، تكبير من x 250 إلى x 1000).

8.5 نواشر، من الزجاج أو من البلاستيك (قطرها أقل من 2 ملم وطولها 80 ملم). من الأحسن ألاّ يتجاوز قطر النواشر 2 ملم للتقليل من كمية العيّنة الملتصقة بها عند نهاية نشرها.

9.5 مكبرة بعدستين، (تكبيرها x 6,5 إلى x 50) للتمييز وللتفريق بين المستعمرات أو خلايا الخمائر والعفنيات.

6. اقتطاع العيّنة

من الأحسن أن يتلقى المخبر عيّنة ممثلة حقا، غير متلفة أو تغيرت أثناء النقل والتخزين. يجب عدم تجميد عيّنة المخبر.

يجرى اقتطاع و تحضير العينة للتجربة في ظروف ملائمة.

7. طريقة العمل

1.7 العيّنة المأخوذة للتجربة، المحلول الأم والتخفيفات :

يتم تحضير العينة المأخوذة للتجربة والمحلول الأم (التخفيف الأول) والتخفيفات الموالية حسب متطلبات التنظيمات والمقاييس الخاصة والمناسبة للمادة المعنية. ما عدا حالة تحضير خاص لعيّنة التجربة، يوصى باستعمال ماء بيبتوني بـ 0,1 % (تركيز في الكتلة) (3.1.4) كمخفف.

يفضل استعمال جهاز مجانسة ذي حركة تموجية بدلا من الخلاط أو جهاز الرج.

عندما تملأ الماصة (2.5) بالكمية المناسبة من المحلول الأم والتخفيفات، يفضل إبقاؤها أفقيا (وليس عموديا) وهذا بسبب الترسب السريع للأبواغ بداخلها.

يرج المحلول الأم والتخفيفات لتفادي ترسب الجزيئات التي تحتوي على أحياء دقيقة.

2.7 الزرع و التحضين

1.2.7 بواسطة ماصة (2.5) معقمة، يوضع 0,1 ملل من عينة التجربة في حالة المواد السائلة أو 0,1 ملل من المحلول الأم في حالة المواد الأخرى، في علبة بيتري تحتوي على هلام **DRBC** (1.2.4).

بواسطة ماصة معقمة جديدة يوضع 0,1 ملل من التخفيف العشري الأول (10^{-1}) (في حالة المواد السائلة) أو 0,1 ملل من التخفيف (10^{-2}) (في حالة المواد الأخرى) في علبة بيتري ثانية تحتوي على هلام **DRBC** (1.2.4).

لتسهيل إحصاء المستعمرات الضعيفة للخمائر والعفنيات، يمكن توزيع كميات تصل إلى 0,3 ملل من التخفيف (10^{-1}) من العيّنة أو عينة التجربة من المواد السائلة على ثلاث علب.

تجرى العملية بنفس الطريقة مع التخفيفات الموالية باستعمال ماصة جديدة معقمة (2.5) لكل تخفيف عشري.

ملاحظة : إذا وقع الشك في وجود عفنيات سريعة النمو، يستند إلى المنهج الأفقي لإحصاء الخمائر والعفنيات بعدِّ المستعمرات في المنتجات ذات نشاط مائي أصغر أو يساوي 0,95.

2.2.7 يوزع التطعيم على سطح علبة الوسط الهلامي بواسطة ناشر (8.5) معقم إلى غاية امتصاصه كليا من الوسط.

يمكن كذلك استعمال طريقة الزرع بالدمج، لكن في هذه الحالة يجب المصادقة على معادلة النتائج بالنسبة للزرع على السطح كما أن التمييز والتفريق بين العفنيات والخمائر غير ممكن.

يمكن أن يعطي منهج الزرع على السطح إحصاءات أعلى. تسهل تقنية الزرع بالتطعيم على السطح، تعرض أقصى للخلايا للأكسجين الجوي وتجنب تعطيل النشاط الحراري للخلايا البرعمية الفطرية.

ترتبط النتائج بنوع الفطريات.

3.2.7 تحضن العلب المحضرة (2.2.7) في شروط هوائية، الأغطية نحو الأعلى، في وضعية مستقيمة داخل جهاز التحضين (1.5) في درجة حرارة 25 °م ± 1 °م خلال خمسة (5) أيام. إذا اقتضى الأمر، تترك علب الهلام لضوء النهار لمدة يوم (1) إلى يومين (2).

يوصى بتحضين العلب (6.5) داخل كيس بلاستيكي مفتوح لتفادي تلوث جهاز التحضين في حالة انتشار العفنيات خارج العلب.

3.7 إحصاء وانتقاء المستعمرات للإثبات

تجرى قراءة العلب بين يومين (2) وخمسة أيام (5) من التحضين، تنتقى العلب (3.2.7) المحتوية على أقل من 150 مستعمرة أو خلايا برعمية أو جراثيم وتحسب هذه المستعمرة أو الخلايا البرعمية أو الجراثيم.

إذا لوحظ اجتياح سريع في العلب، يحتفظ بالإحصاءات المتحصل عليها بعد يومين (2) ثم من جديد بعد خمسة (5) أيام من التحضين.

ملاحظة 1 : تعتبر مناهج إحصاء الخمائر والعفنيات على وجه الخصوص غير دقيقة بسبب احتوائها على خليط من الميسيليوم، والأبواغ الجنسية وعديمة الجنس. يرتبط عدد الوحدات المشكلة للمستعمرات بدرجة انقسام الميسيلوم وبنسبة الأبواغ القادرة على النمو فوق الوسط.

ملاحظة 2 : تحدث غالبا إحصاءات غير خطية إنطلاقا من تخفيفات عشرية، أي أن تخفيفا واحدا للعيّنة ذا عامل 10 لا يؤدي عموما إلى تخفيض العامل 10 لعدد المستعمرات على سطح علبة بيتري. وهذا ناتج عن انقسام الميسيليوم وانتشار الأبواغ أثناء التخفيف وكذلك إلى المنافسة بين الفصائل في حالة وجود عدد كبير من المستعمرات في علبة بيتري.

تنبيه – تنتشر أبواغ العفنيات في الهواء بسهولة، لذلك تعالج علب بيتري بحذر لتفادي تكاثر أبواغ العفنيات الذي يمكن أن يؤدي إلى تقدير مبالغ فيه لعدد المستعمرات في العيّنة.

يجرى، إذا اقتضى الأمر، اختبار بواسطة مكبرة بعدستين (9.5) أو مجهر (7.5) للتفريق بين خلايا الخمائر أو العفنيات والمستعمرات البكتيرية.

تحسب مستعمرات الخمائر والمستعمرات أو الخلايا البرعمية للعفنيات، كل على حدة، إذا اقتضى الأمر.

لتعيين الخمائر والعفنيات، يتم انتقاء مناطق تكاثر الفطريات ويجرى اقتطاع عينة لاختبار مجهري معمق أو زرع في أوساط العزل أو التعيين الملائمين.

8. التعبير عن النتائج وحدود الثقة

يجب التعبير عن النتائج وحدود الثقة حسب المتطلبات العامة والتوصيات المتعلقة بميكروبيولوجيا الأغذية.

إذا اقتضى الأمر، تُعدُّ مستعمرات الخمائر والمستعمرات أو الخلايا البرعمية للعفنيات، كل على حدة.