

مخابر مراقبة الجودة وقمع الغش وتلك 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 21 محرم عام 1434 الموافق 5 ديسمبر سنة 2012.

مصطفى بن بادة

الملحق

منهج كشف وإحصاء بسودوموناس أيروجينوزا في الماء بالترشيح فوق الغشاء

يصف هذا المنهج تقنية عزل وإحصاء بسودوموناس أيروجينوزا في عينات الماء المعبأ، بالترشيح فوق الغشاء.

يمكن أن يطبق هذا المنهج على أنواع أخرى من المياه تحتوي على مجموعة قليلة من الكائنات الحية الدقيقة المتداخلة، على سبيل المثال مياه المسبح والمياه الموجهة للاستهلاك البشري.

1. التعاريف

لتطلبات هذا المنهج، يطبق التعريف الآتي :

1-1 بسودوموناس أيروجينوزا

هي أجسام دقيقة تنمو في أوساط انتقائية تحتوي على الستريميد وتشكل البيوسيانين، أو أجسام دقيقة تنمو في أوساط انتقائية تحتوي على الستريميد وأكسيدان إيجابية، وتعطي استنشعاعا تحت تأثير الأشعة فوق البنفسجية (20 ± 360) نانومتر وقادرة كذلك على تشكيل الأمونياك انطلاقا من الأستيميد.

2. المبدأ

1.2 الترشيح

يرشح حجم مقدر من عينة الماء أو محلول مخفف من هذه العينة فوق غشاء الترشيح قطر مساماته 0,45 ميكرومتر.

ويوضع غشاء الترشيح فوق الوسط الانتقائي ويحضن في الشروط المحددة للوسط.

قرار مؤرخ في 21 محرم عام 1434 الموافق 5 ديسمبر سنة 2012، يجعل منهج كشف وإحصاء بسودوموناس أيروجينوزا في الماء بالترشيح فوق الغشاء، 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 و المتعلق 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،

- 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 والمتمم والمذكور أعلاه، يهدف هذا القرار إلى جعل منهج كشف وإحصاء بسودوموناس أيروجينوزا في الماء بالترشيح فوق الغشاء، إجباريا.

المادة 2 : من أجل كشف وإحصاء بسودوموناس أيروجينوزا في الماء بالترشيح فوق الغشاء، فإن

سولفات البوتاسيوم خال من
الماء (K₂SO₄) 10,0 غ
كلورور المغنزيوم خال من الماء
(MgCl₂) 1,4 غ
غليسيرول 10 ملل
هلام 11,0 إلى 18,0 غ
ماء (مقطر أو مكافئ) 1000 ملل
ملاحظة - تتوقف كمية الهلام اللازمة على قدرة
التجمد، تتبع تعليمات مصنع الهلام المستعمل.

المضاد (CN)

برومور هيكلزاديسيل ثلاثي مثيل الأمونيوم
(ستريميد) 0,2 غ
حمض نليديكسيك 0,015 غ

2.1.1.3 التحضير

يمزج كل من البيبتون وحملة الكازيين وسولفات
البوتاسيوم وكلورور المغنزيوم والهلام في 1000 ملل
من الماء المقطر (أو مكافئ)، يضاف 10 ملل من
الغليسيرول، يغلى المزيج حتى الذوبان الكلي ويعقم في
جهاز التعقيم لمدة 15 دقيقة في درجة (121 ± 3) م°،
يترك الوسط ليبرد في (45 إلى 50) م°.

يضاف المضاد (CN) المعاد تمييزه في 2 ملل من
الماء المقطر المعقم، يخلط جيدا ويضاف إلى وسط
الأساس معقم ومذوب. يمزج من جديد ويسكب في علب
بتري معقمة بحيث يكون السمك الأدنى للهلام 5 ملم.
من الأحسن أن يكون العامل الهيدروجيني (pH)
النهائي للوسط المتجمد مساو لـ 7,1 ± 0,2 في 25 م°،
تحفظ العلب المحضرة بعيدا عن الضوء في درجة حرارة
(3 ± 5) م°، مع اجتناب كل تجفف، وتستعمل في أجل
شهر واحد. يجب ألا يحفظ الهلام المذاب لأكثر من 4
ساعات، وألا يعاد تذيوبه من جديد.

2.3 أوساط التأكيد والكواشف

1.2.3 وسط كينغ (B)

1.1.2.3 التركيب

ببتون 20,0 غ
غليسيرول 10 ملل
هيدروجينوفوسفات البوتاسيوم
(K₂HPO₄) 1,5 غ

2.2 الإحصاء

عدد بسودوموناس أيروجينوزا المفترضة يتحصل
عليه بإحصاء عدد المستعمرات المميزة المتشكلة فوق
غشاء الترشيح بعد التحضين وتعتبر كـ "بسودوموناس
أيروجينوزا" مؤكدة المستعمرات التي شكلت
البيوسيانين إلا أن المستعمرات التي شكلت استشعاعا
أو تلك التي لها لون أسمر محمر تتطلب تأكيدا.

3.2 التأكيد

يعاد زرع المستعمرات المراد تأكيدها انطلاقا من
الغشاء فوق علب تحتوي على وسط هلامي مغذ
(الملاحظة ب). بعد التحضين يجرى اختبار البحث عن
الأكسيدان على المزارع التي لم تظهر في البداية
استشعاعا، ثم يجرى اختبار تشكيل الفليورسين على
مزارع أكسيدان إيجابية وتفحص للكشف عن قدرتها
المحتملة على تشكيل الأمونياك انطلاقا من الأستמיד.

تفحص المزارع التي شكلت في البداية استشعاعا
للكشف عن قدرتها المحتملة على تشكيل الأمونياك
انطلاقا من الأستמיד.

3. المخففات وأوساط الزرع والكواشف :

عدا تحديدات مخالفة، تستعمل لتحضير أوساط
الزرع والمخففات، كواشف ذات نوعية تحليلية. يحضر
الوسط كما يأتي وتضاف عوامل الانتقاء بالتراكيز
المعطاة أو تستعمل الأوساط والكواشف المتوفرة في
الأسواق ومحضرة طبقا لتعليمات المصنع. تحضر
الأوساط والكواشف باستعمال ماء مقطر أو ماء ذي
نقاوة مكافئة وخال من المواد القادرة على منع التكاثر
في شروط التجربة.

1.3 وسط الزرع

لتحديد بسودوموناس أيروجينوزا، يستعمل
الوسط الآتي :

1.1.3 أساس هلامي لبسودوموناس / هلام (CN)

1.1.1.3 التركيب

ببتون الجيلاتين 16,0 غ
حملة الكازيين 10,0 غ

2.2.2.3 التحضير

لتحضير مرق الأستميذ، يضاف 1 ملل من محلول (B) لـ 900 ملل من محلول (A) حديث التحضير (2.2.3). يضاف الماء مع رج مستمر حتى الحصول على حجم كلي يساوي 1 لتر.

يوزع هذا الخليط على أقسام تساوي 5 ملل في أنابيب الزرع. تسد الأنابيب وتعقم في جهاز التعقيم في (121 ± 3) °م لمدة 15 دقيقة. يحفظ بعيدا عن الضوء في (5 ± 3) °م ويستعمل في مدة ثلاثة (3) أشهر.

3.2.3 هلام مغذ

1.3.2.3 التركيب

ببتون 5,0 غ
مستخلص اللحم 1,0 غ
مستخلص الخميرة 2,0 غ
كلورور الصوديوم (NaCl) 5,0 غ
هلام 15,0 غ
ماء 1000 ملل

2.3.2.3 التحضير

تذوب المكونات في الماء بالتسخين. يعقم في جهاز التعقيم في (121 ± 3) °م لمدة 15 دقيقة. من الأحسن أن يكون العامل الهيدروجيني (pH) للوسط المحضر بهذه الطريقة والمجمد يساوي 7,4 ± 0,2 في 25 °م. تجفف العلب قبل الاستعمال لنزع الرطوبة الزائدة للسطح، تحفظ العلب المحضرة بهذه الطريقة بعيدا عن الضوء في (5 ± 3) °م وتستعمل في أجل شهر.

4.2.3 كاشف للبحث عن الأكسيدان

1.4.2.3 التركيب

ثنائي كلوريدات رباعي المثيل - p - فنيلان ثنائي.
الأمين 1,0 غ
ماء 10 ملل

2.4.2.3 التحضير

مباشرة قبل الاستعمال، يذوب ثنائي كلوريدات رباعي المثيل - P - فنيلان ثنائي الأمين في الماء ويحفظ بعيدا عن الضوء. بما أن هذا الكاشف غير مستقر فيجب تحضير كميات قليلة منه مباشرة قبل استعماله.

سولفات المغنيزيوم سباعي التمييه (MgSO₄·7H₂O) 1,5 غ

هلام 15,0 غ

ماء (مقطر أو مكافئ) 1000 ملل

2.1.2.3 التحضير

تذاب المكونات في الماء بالتسخين يترك ليبرد في درجة حرارة (45 إلى 50) °م ويضبط العامل الهيدروجيني (pH) في 7,2 ± 0,2 في 25 °م، باستعمال حمض الكلوريدريك أو هيدروكسيد الصوديوم.

يوزع الوسط بأجزاء تساوي 5 ملل في أنابيب زرع مسدودة ومعقمة في (121 ± 3) °م لمدة 15 دقيقة. تترك الأنابيب تبرد وتتجمد في وضعية مائلة.

تحفظ بعيدا عن الضوء في (5 ± 3) °م وتستعمل في مدة ثلاثة (3) أشهر.

2.2.3 مرق الأستميذ

1.2.2.3 التركيب

(A) محلول

ثنائي هيدروجينوفوسفات البوتاسيوم (KH₂PO₄) 1,0 غ

سولفات المغنيزيوم (خال من الماء) (MgSO₄) 0,2 غ

أستميذ 2,0 غ

كلورور الصوديوم (NaCl) 0,2 غ

ماء (مقطر أو مكافئ)، خال من الأمونياك) 900 ملل

تذاب المكونات في الماء ويضبط بعد ذلك العامل الهيدروجيني (pH) باستعمال إما حمض الكلوريدريك أو هيدروكسيد الصوديوم في 7,0 ± 0,5 في 25 °م.

ملاحظة: الأستميذ مسبب للسرطان ومهيج، فيجب اتخاذ احتياطات خاصة أثناء الوزن والتحضير وعند التخلص من الوسط.

(B) محلول

مولبيدات الصوديوم

(Na₂MoO₄·2H₂O) 0,5 غ

سولفات الحديد سباعي التمييه (FeSO₄·7H₂O) 0,05 غ

ماء 100 ملل

تطبيق تقنية الترشيح فوق الغشاء المبينة في منهج الخطوط التوجيهية العامة لإحصاء الأجسام الدقيقة في وسط الزرع.

2.6 الترشيح فوق الغشاء

ترشح أحجام من عينات الماء أو أجزاء من التخفيف فوق غشاء ترشيح معقم من أستر السيليلوز قطر مساماته 0,45 ميكرومتر. كما هو مبين في منهج الخطوط التوجيهية العامة لإحصاء الأجسام الدقيقة في وسط الزرع، يوضع كل غشاء فوق علبة بتري تحتوي على هلام مع مضاف (CN) (3 . 1) مع الحرص على عدم احتباس هواء تحت الغشاء.

3.6 تحضين العلب

تحضن علب البتري في (2 ± 36) م° لمدة (4 ± 44) سا في أوعية وتحفظ من كل تجفف.

4.6 فحص الأغشية

تفحص الأغشية للتأكد من نمو المزارع بعد (2 ± 22) سا و (4 ± 44) سا.

تعد ك "بسودوموناس أيروجينوزا" مؤكدة جميع المستعمرات التي شكلت صبغ أزرق - مخضر (بيوسيانين).

تفحص الأغشية تحت الأشعة فوق البنفسجية. من الأحسن تجنب كل تعرض مطول للأشعة فوق البنفسجية لأن ذلك يؤدي إلى موت المستعمرات، ما يعني عدم نموها فوق أوساط التأكيد. تعد ك "بسودوموناس أيروجينوزا" مفترضة المستعمرات التي لا تشكل البيوسيانين وتعطي استشعاعا وتؤكد هويتها باستعمال مرق الأستيميد المبين لاحقا.

تعد ك "بسودوموناس أيروجينوزا" مفترضة جميع المستعمرات الأخرى التي شكلت صبغا أسمر محمر ولم تشكل استشعاعا وتؤكد هويتها باستعمال اختبار الأكسيداز و مرق الأستيميد ووسط كينغ (B) المبين لاحقا. تجرى القراءة بعد (2 ± 22) سا في حالة المستعمرات المجتاحة والتي تستطيع أن تظهر في مدة (4 ± 44) سا. ينصح الأخذ بعين الاعتبار الإحصاء الأكبر لحساب عدد "بسودوموناس أيروجينوزا" المبينة في (7).

يمكن كذلك استعمال اختبارات الأكسيداز المتوفرة في الأسواق.

5.2.3 كاشف نسلر

1.5.2.3 التركيب

كلورور زئبقي ($HgCl_2$) 10 غ
إيودور البوتاسيوم (KI) 7 غ
هيدروكسيد الصوديوم ($NaOH$) 16 غ
ماء (خال من الأمونيак) حتى 100 ملل
تذوب 10 غ من $HgCl_2$ و 7 غ من KI في كمية قليلة من الماء، ثم يضاف هذا الخليط ببطء مع الرج إلى محلول من الماء البارد يحتوي على 16 غ من $NaOH$ مذوب في 50 ملل من الماء، يخفف إلى 100 ملل، يحفظ في أدوات زجاجية من نوع "بوروسيليكاتي" مغلقة بسدادة من المطاط بعيدا عن ضوء الشمس لمدة أقصاها سنة.

ملاحظة : الكلورور الزئبقي ($HgCl_2$) سام، يجب

تجنب بلعه.

4. التجهيزات والأدوات الزجاجية :

تستعمل الأجهزة المتداولة في مخابر الميكروبيولوجيا.

1.4 الأدوات الزجاجية :

قبل الاستعمال، تعقم جميع الأدوات الزجاجية في الفرن بدرجة (5 ± 170) م° لمدة ساعة، أو في جهاز التعقيم بدرجة حرارة (3 ± 121) م° لمدة 15 دقيقة.

2.4 جهاز التحضين، يمكن ضبطه في (2 ± 36) م°.

3.4 مصباح ذو إشعاع فوق البنفسجي، يمكنه أن

يصدر إشعاعا طول موجته (20 ± 360) نانومتر.

4.4 أغشية الترشيح معمة، قطر مساماتها 0,45

ميكرومتر.

5. اقتطاع العينة

يجرى اقتطاع العينة في الشروط الملائمة.

6. طريقة العمل

1.6 عموميات

كروم أو من البلاستيك أو بواسطة عود أو ماصة من زجاج. يعتبر التفاعل إيجابي عند ظهور لون أزرق بنفسجي داكن في 10 ثوان. من الممكن استعمال اختبارات الأكسيدان المتوفرة في الأسواق بإتباع تعليمات المصنع.

3.5.6 وسط كينغ (B)

يعاد زرع المستعمرات السمراء المحمّرة أكسيدان إيجابية المتحصل عليها في (1.5.6) فوق وسط كينغ (B) وتحضن لخمسة (5) أيام على الأكثر في درجة $2 + 36$ م°.

يفحص الزرع يوميا تحت الأشعة فوق البنفسجية ويسجل وجود استنشعاع محتمل. تسجل كإيجابية كل استنشعاع ظهر في 5 أيام.

4.5.6 مرق الأستيميد

يزرع أنبوب بواسطة الزرع المتحصل عليه في (1.5.6) ويحضن في $2 + 36$ م° لمدة (2 + 22) سا. تضاف قطرة أو قطرتان من كاشف نسلر (3.2.3) وتفحص الأنابيب للكشف عن تشكل محتمل للأمونيكا الذي يظهر على شكل لون يتغير من الأصفر إلى الأحمر الأجوري حسب التركيز.

5.5.6 الإحصاء

تعد ك "بسودوموناس أيروجينوزا" مؤكدة جميع المستعمرات التي شكلت البيوسيانين (صبغ أزرق - مخضر) أو أكسيدان إيجابية، تعطي استنشعاعا تحت الأشعة فوق البنفسجية (4.6) أو (3.5.6) وقدرة على تشكيل الأمونيكا انطلاقا من الأستيميد (4.5.6).

ملاحظة - المستعمرات التي أظهرت استنشعاعا فوق الغشاء الأول تكون دائما أكسيدان إيجابية لذلك لا تحتاج أن تخضع إلى اختبار الأكسيدان (أنظر جدول 1).

7. التعبير من النتائج

يحسب عدد "بسودوموناس أيروجينوزا" المؤكدة الموجودة في حجم معين من الماء انطلاقا من عدد المستعمرات المميزة المحصاة فوق الأغشية مع الأخذ بعين الاعتبار عدد تجارب التأكيد المنجزة. بالنسبة للماء المعدني وماء المنبع والمياه المعبأة، يكون الحجم 250 ملل، بالنسبة للمياه الأخرى يكون الحجم عموما 100 ملل.

يحسب عدد "بسودوموناس أيروجينوزا" في حجم عينة مختبرة من الماء كالاتي :

يلخص الجدول 1 انتقاء المستعمرات ومراحل التأكيد.

جدول 1 - المراحل اللازمة لتأكيد المستعمرات التي تنمو فوق هلام (CN).

وصف المستعمرات فوق هلام (CN)	الأمونياك انطلاقا من الأستيميد	تشكيل الأكسيدان	استنشعاع فوق وسط كينغ (B)	بسودوموناس أيروجينوزا مؤكدة
أزرق - مخضر	غ م أ	غ م	غ م	نعم
استنشعاع	+	غ م	غ م	نعم
غير أزرق - مخضر				
أسمر محمر	+	+	+	نعم
نماذج أخرى	غ م	غ م	غ م	لا
أغ م : غير مختبر				

5.6 التأكيد

1.5.6 هلام مغذ

يعاد زرع جميع المستعمرات التي تستوجب التأكيد انطلاقا من الغشاء وإذا تعذر ذلك، يعاد زرع أكبر قدر من المستعمرات (منهج الخطوط التوجيهية العامة لإحصاء الأجسام الدقيقة في وسط الزرع) وتحضن لمدة $2 + 22$ سا في $2 + 36$ م°. تفحص نقاوة المزارع وتخضع المستعمرات التي كانت في البداية سمراء محمّرة لاختبار الأكسيدان (2.5.6).

2.5.6 اختبار الأكسيدان

للكشف عن الأكسيدان (4.2.3) تسكب 2 أو 3 قطرات من الكاشف المخضر جديدا فوق قطعة ورق ترشيح موضوعة فوق علبة بتري.

يوزع جزء من الزرع فوق ورق ترشيح محضر بواسطة مقبض معدني من البلاتين وليس من النيكل

P+F (C^F/M^F) + R (C^R/M^R)

P : عدد المستعمرات الزرقاء - المخضرة، كلها محصاة كأهداف مؤكدة،

F : عدد المستعمرات المستشعة،

R : عدد المستعمرات السمراء المحمّرة،

M^F : عدد المستعمرات المستشعة التي كانت محل للكشف عن تشكيل الأمونياك،

C^F : عدد المستعمرات المستشعة التي شكلت الأمونياك،

M^R : عدد المستعمرات السمراء المحمّرة التي كانت محلا للكشف عن تشكل الأمونياك والبحث عن الأكسידاز والاستشعاع فوق وسط كينغ (B)،

C^R : عدد المستعمرات السمراء المحمّرة التي شكلت الأمونياك وأكسידاز إيجابية ومستشعة فوق وسط كينغ (B)،

يمكن كذلك التعبير عن النتائج نوعيا بإظهار وجود أو غياب "بسودوموناس أيروجينوزا" في حجم الماء المدروس.

ملاحظة أ**(معلومات إضافية من بسودوموناس أيروجينوزا)**

بسودوموناس أيروجينوزا هي النوع النموذجي لجنس البسودوموناس.

وهي عبارة عن بكتيريا غرام سلبي، غير متبوغة وذات أكسידاز وكتلاز إيجابي. تظهر استقلاب تأكسدي كما هو مبين في تجربة هوق (Hugh) وليفسن (Leifson)، ترجع بصفة عامة النتريات من النتريت وتشكل الأمونياك نتيجة انحلال الأستמיד.

تشكل معظم الأصناف (98%) صبغ مستشع ينحل في الماء، كما أن معظم أصولها قادرة على النمو في 42°م لكن ليس في 4°م، وهذا ما يميز بسودوموناس أيروجينوزا عن بسودوموناس فليوريسانس التي تنمو في 4°م وليس في 42°م.

تميّع الهلام وتحلل الكازيين لكن لا تحلل النشاء. تشكل أكثر من 90% من الأصناف صبغ البيوسيانين (أزرق - مخضر)

ملاحظة ب**أوساط أخرى**

يمكن استعمال أوساط أخرى غير الهلام المغذي بشرط ألا تكون انتقائية ولا تحتوي على هيدرات الكربون الذي يتخمر.