

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 19 شوال عام 1436 الموافق 4 غشت سنة 2015.

بختي بلعاب

الملحق

المنهج الأفقي لإحصاء الخمائر والعفنات

بعدُ المستعمرات في المنتجات ذات نشاط مائي أصغر أو يساوي 0,95

1. مجال التطبيق

يحدد هذا المنهج طريقة أفقية لإحصاء الخمائر المحبة للماء و العفنات المحبة للجفاف الموجودة في المنتجات الموجهة للاستهلاك البشري أو الحيواني، حيث يكون نشاط الماء أصغر أو يساوي 0,95 (الفواكه الجافة، الحلويات، المعجون، اللحم المجفف، السمك المملح، البذور، الحبوب ومشتقاتها، الطحين، الجوز، التوابل والبهارات، إلخ....)، بواسطة تقنية إحصاء المستعمرات في درجة حرارة 25 ± 1 م°.

لا يطبق هذا المنهج على المنتجات المجففة حيث يكون نشاط الماء أصغر أو يساوي 0,60 (الحبوب المجففة، المنتجات الزيتية، التوابل، البقول، البذور، مسحوق المشروبات الفورية، المنتجات المجففة الموجهة للحيوانات الأليفة، إلخ....) ولا يسمح بإحصاء أبواغ العفنات. كما لا يطبق هذا المنهج في تحديد المجموعة الفطرية أو في اختبار الأغذية للبحث على السموم الفطرية (الميكوتوكسين)، كما أنه لا يتلاءم مع إحصاء الفطريات المحبة للملح و المحبة للجفاف (بوليباسيليوم بيسي Polypaecilum pisce) وبازيبيتوسبورا أوفيليا (Basipetospora halophila)، الممكن وجودها في الأسماك المجففة على وجه الخصوص.

2. مصطلحات وتعريفات

لاحتياجات هذا المنهج، تطبق المصطلحات والتعاريف الآتية :

1.2 الخمائر: جسم دقيق هوائي، محب للحرارة المعتدلة، يتطور على سطح الوسط على شكل

وزارة التجارة

قرار مؤرخ في 19 شوال عام 1436 الموافق 4 غشت سنة 2015، يجعل المنهج الأفقي لإحصاء الخمائر والعفنات بعدُ المستعمرات في المنتجات ذات نشاط مائي أصغر أو يساوي 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، المعدل،

- 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 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 والمتمم والمذكور أعلاه، يهدف هذا القرار إلى جعل المنهج الأفقي لإحصاء الخمائر والعفنات بعدُ المستعمرات في المنتجات ذات نشاط مائي أصغر أو يساوي 0,95، إجباريا.

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

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

4.3 يحسب عدد الخمائر والعفنيات بالغرام أو بالميليلتر من العينة انطلاقاً من عدد المستعمرات أو الخلايا البرعمية أو الجراثيم المتحصل عليها في علب البيتري المختارة بنسب تخفيفات تسمح بالحصول على مستعمرات يمكن إحصاؤها. وإذا اقتضى الأمر، تحصى العفنيات والخمائر على حدة.

4. المخفف ووسط الزرع

1.4 المخفف

1.1.4 عموميات

عند إجراء سلسلة تخفيفات قبل الزرع، يوصى باستعمال مخفف يحتوي على كمية كافية من المذاب [على سبيل المثال محلول بـ 20% إلى 35% (تركيز في الكتلة) من الغليسروول أو D- غلوكوز] وهذا لتفادي الصدمة الحولية للعفنيات المحبة للجفاف والخمائر المحبة للماء.

ملاحظة : لتقليل التحام أبواغ العفنيات والفطريات (conidies) يمكن أن تضاف عوامل منشطة للضغط الحولي (tensioactifs) كمتعدد الأوكسيتيلان سوربتون مونولييات بـ 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	1 غ
الماء	1000 ملل

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

الكتلة)

تذاب المركبات في الماء، مع التسخين إذا اقتضى الأمر، يعدل العامل الهيدروجيني (pH) (4.5) عند $0,2 \pm 7$ في درجة حرارة 25°C بعد التعقيم إذا اقتضى الأمر.

مستعمرات (4.2) باستعمال وسط هلامي في الشروط الموصوفة في هذا المنهج وفي درجة حرارة 25°C ، غالباً ما يشكل محيطاً منتظماً و سطحاً محدباً نوعاً ما.

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، حسب الشروط المحددة في هذا المنهج، خلايا برعمية أو جراثيم (3.2) مسطحة أو زغبية أو مستعمرات (4.2) تمثل غالباً أثماراً ملونة وأشكالاً ذات أبواغ.

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

ملاحظة : هناك أشكال متقاربة من الأجسام

الدقيقة ويمكن أن يكون التمييز بين الخمائر (1.2) والعفنيات (2.2) اعتباطياً.

3.2 خلايا برعمية أو جراثيم : أجسام قابلة للحياة

قادرة على النمو في وسط مغذٍ.

مثلاً : خلية منبثية، مجموعة من الخلايا، بوغ، مجموعة من الأبواغ أو قطعة من المشيجة الفطرية.

4.2 المستعمرة : هي تراكم ملحوظ لمركز لكتلة من

الأجسام الدقيقة المتطورة فوق أو داخل وسط مغذٍ صلب انطلاقاً من خلية قابلة للحياة.

5.2 خمائر محبة للماء وعفنيات محبة للجفاف

فطريات قادرة على النمو مع نشاط مائي أصغر أو يساوي 0,95.

3. المبدأ

1.3 تزرع علب بيتري محضرة باستعمال وسط

زرع انتقائي محدد. حسب عدد المستعمرات المرتقبة، تستعمل كمية معينة من عينة التجربة (إذا كان المنتج سائلاً) أو من المحلول الأم (في حالة المنتجات الأخرى) أو من التخفيفات العشرية لعينة التجربة أو للمحلول الأم.

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

2.3 تحضن بعد ذلك علب البيتري في شروط

هوائية في درجة حرارة $25^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ لمدة خمسة (5) إلى سبعة (7) أيام. ثم تترك علب الهلام لترتاح في ضوء النهار لمدة يوم (1) إلى يومين (2) إذا اقتضى الأمر.

تنبيه : يجب تفادي تعرض الوسط للضوء لأن المواد الناتجة من تحلل السموم الفطرية يمكن أن تسبب سوء تقييم المجموعات الفطرية في العينات.

2.2.1.2.4 إضافة اختيارية لكورهدرات الكلور

تيتراسيكلين

عندما يمكن أن يحدث التكاثر البيكتيري مشكلا، يوصى باستعمال الكلورام فينيكول (50 مغ/ل) والكلور تيتراسيكلين (50 مغ/ل). في هذه الحالة، يحضر الوسط الأساسي كما هو مبين أعلاه (2.1.2.4) مع 50 مغ من الكلورام فينيكول فقط، ثم يوزع بكميات 100 ملل ويعقم. يحضر كذلك محلول تيتراسيكلين بـ 0,1 % (تركيز في الكتلة) من كلورهدرات الكلور تيتراسيكلين في الماء (يجب أن يحضر فوراً لعدم استقراره في المحلول) ويعقم بالترشيح. مباشرة قبل الاستعمال، يضاف 5 ملل من هذا المحلول إلى 100 ملل من الوسط الأساسي بطريقة معقمة ويسكب في علب البيتري. لا ينصح باستعمال الجنتاميسين لأنه بإمكانه تثبيط بعض أصناف الخمائر.

3.2.1.2.4 إضافة اختيارية للعناصر المؤشرة

تحتاج العفنات للعناصر المؤشرة غير الموجودة في DG 18 (1.2.4) لكي يظهر شكلها، ولا سيما الصبغ الذي تنتجها عادةً.

للكشف عن العفنات الموجودة في هذا الوسط، يضاف إلى كل 1 لتر منه 1 ملل من المحلول المحتوي على العناصر المؤشرة، قبل إدخاله في جهاز التعقيم :



- 100 ملل من ماء معقم أو منزوع الأيونات.

3.1.2.4 تجارب الفعالية لضمان نوعية وسط الزرع

1.3.1.2.4 عموميات

وسط DG18 (1.2.4) هو وسط صلب. يجب أن تخضع كل من الإنتاجية والانتقائية إلى تجربة حسب المواصفات الآتية :

2.3.1.2.4 الإنتاجية

التمضين : خمسة (5) أيام في درجة 25 م ± 1 م.

السلالات :

- سكارومييساس سيريفيزيا ATCC 9763

- واليمياسيبى ATCC 42694

2.4 وسط الزرع

1.2.4 هلام ديكلوران بـ 18 % (تركيز في الكتلة) من الغليسيرول (DG 18)

1.1.2.4 التركيب

عصارة أنزيمية من الكازيين	5 غ
D - غلوكوز (C ₆ H ₁₂ O ₆)	10 غ
فوسفات أحادي البوتاسيوم (KH ₂ PO ₄)	1 غ
سولفات المغنيزيوم (MgSO ₄ ·H ₂ O)	0,5 غ
ديكلوران (2,6 ثنائي كلور -4- نيترو أنيلين) (Dichloran 2,6-dichloro -4- nitroaniline)	0,002 غ
غليسيرول خال من الماء	220 غ
هلام	12 غ إلى 15 غ أ
كلوروم فينيكول	0,1 غ
ماء مقطر أو منزوع الأيونات	1000 ملل
(أ) : حسب قدرة تهلم الهلام	

2.1.2.4 التحضير

1.2.1.2.4 عموميات

توضع كل المكونات عدا الكلورام فينيكول في الماء ثم تغلى لإذابتها كلياً. إذا 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 كلورام فينيكول بـ 1 % (تركيز في الكتلة) ويمزج. يوزع الوسط على أوعية ملائمة (5.5). ثم يعقم في جهاز التعقيم عند 121 م° خلال 15 دقيقة.

يبرد الوسط مباشرة في حمام مائي (3.5) مضبوط في درجة حرارة محصورة بين 44 م° و 47 م°. يوزع هذا الوسط على حصص ذات 15 ملل في علب بيتري معقمة (6.5).

يترك الوسط ليتجمد و يجف سطح علب البيتري، إذ اقتضى الأمر. يستعمل الوسط مباشرة أو يحفظ في الظلام إلى حين استعماله.

5.5 قارورات، حوجلات وأنايب، لجليان وحفظ
أوساط الزرع ولإجراء التخفيفات.

6.5 ملب 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 250 x إلى 1000 x).

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

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

6. اقتطاع العينة

من الأحسن أن يتلقى المخبر عينة ممثلة، غير
متلفة أو تغيرت أثناء النقل والتخزين، ويجب ألا
تكون مجمدة.

7. الطريقة العملية لتحضير عينة التجربة

1.7 العينة المأخوذة للتجربة، المحلول الأم
والتخفيفات

تحضر العينة المأخوذة للتجربة و المحلول الأم
(التخفيف الأول) و التخفيفات الموالية حسب متطلبات
التنظيمات والمقاييس الخاصة والمناسبة للمادة المعنية.

ماعدا في حالة تحضير خاص لعينة التجربة،
يوصى باستعمال ماء بيتوني (3.1.4) بـ 0,1% (تركيز
في الكتلة) كمخفف. يفضل استعمال جهاز مجانسة ذي
حركة تموجية بدلا من الخلاط أو جهاز الرج.

عندما تملأ الماصة (2.5) بالكمية المناسبة من
المحلول الأم أو التخفيفات، يفضل إبقاؤها أفقيا وهذا
بسبب الترسيب السريع للأبواغ بداخلها.

يرج المحلول الأم و التخفيفات لتفادي ترسيب
الجزئيات التي تحتوي على أجسام دقيقة.

2.7 الزرع والتحضين

1.2.7 بواسطة ماصة (2.5) معقمة ينقل إلى علبه
بيتري تحتوي على هلام DG18 (1.2.4) 0,1 ملل من عينة
التجربة (في حالة المواد السائلة) أو 0,1 ملل من المحلول
الأم (في حالة المواد الأخرى).

– أسبرجيلوس ريستريكتوس ATCC 42693

– أوروتيوم روبروم ATCC 42690

– أو سلالات مسجلة كمكافئة في مجموعة فطرية
أخرى.

الوسط المرجعي : وسط زرع SDA

(Sabouraud Dextrose Agar)

منهج المراقبة : كمي.

المعايير: نسبة الإنتاجية $P_R \geq 0,5$

التفاملات المميزة : مستعمرات أو خلايا برعمية
أو جراثيم مميزة حسب كل نوع.

3.3.1.2.4 الانتقائية

التحضين : خمسة (5) أيام في درجة $25 \pm 1^\circ \text{م}$

السلالات :

– إشيريشياكولي ATCC 25922

– أو باسيلوس سوبتيليس ATCC 6633

– أو سلالات مسجلة كمكافئة في مجموعات
فطرية أخرى.

منهج المراقبة : نوعي.

المعايير : توقف كلي.

5. الأجهزة والأدوات الزجاجية

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

الأجهزة المتداولة في مخابر الميكروبيولوجيا،
ولا سيما ما يأتي :

1.5 جهاز التحضين، بإمكانه العمل في درجة
حرارة $25 \pm 1^\circ \text{م}$.

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 $\pm 0,1$ وحدة من العامل الهيدروجيني (pH) في
درجة حرارة 25°م .

3.7 إحصاء وانتقاء المستعمرات للإثبات

بعد المدة المخصصة للتحضين، تنتقى العلب (3.2.7) التي تحتوي على أقل من 150 مستعمرة أو خلايا برعمية أو جراثيم وتحصى هذه المستعمرات أو الخلايا البرعمية أو الجراثيم.

إذا لوحظ اجتياح سريع في العلب، تحصى المستعمرات أو الخلايا البرعمية أو الجراثيم بعد يومين (2) ويعاد إحصاؤها من جديد بعد خمسة (5) إلى سبعة (7) 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

انطلاقا من تخفيفات عشرية، أي أن تخفيفا واحدا للعبنة ذا عامل 10 لا يؤدي عموما إلى تخفيض العامل 10 لعدد المستعمرات على سطح علب بيتري. وهذا ناتج عن انقسام الميسيليوم وانتشار الأبواغ أثناء التخفيف وكذلك إلى المنافسة بين الفصائل في حالة وجود عدد كبير من المستعمرات في علب بيتري.

تنبيه: تنتشر أبواغ العفنيات في الهواء

بسهولة، لذلك تعالج علب البيتري بحذر لتفادي تكاثر أبواغ العفنيات الذي يمكن أن يؤدي إلى تقدير مبالغ فيه لعدد المستعمرات في العبنة.

يجرى إذا اقتضى الأمر، اختبار بواسطة مكبرة بعدستين (9.5) أو مجهر (7.5) للتمييز بين خلايا الخمائر أو العفنيات ومستعمرات البكتيريا.

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

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

8. التعبير من النتائج وحدود الثقة

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

بواسطة ماصة معقمة جديدة ينقل إلى علب بيتري ثانية تحتوي على هلام DG18 (1.2.4) 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).

لتسهيل إحصاء المستعمرات الضعيفة للخمائر والعفنيات، يمكن توزيع كميات تصل إلى 0,3 ملل من التخفيف (10⁻¹) من العبنة أو عبنة التجربة من المواد السائلة على ثلاث (3) علب بيتري.

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

يوصى بالزرع المباشر بالنسبة للأغذية الصلبة أو الجزيئية مثل الجوز أو البذور.

يعقم سطح عبنة هذا النوع من المواد في محلول إيبيوكلوريت الصوديوم بـ 0,35% (1000 µغ/غ) لمدة دقيقتين، ثم تغسل بماء مقطر معقم، تجفف فوق ورق معقم وتوضع فوق وسط هلامي.

2.2.7 يوزع السائل على سطح علب الهلام بواسطة ناشر (8.5 غ) معقم إلى غاية امتصاصه كليا من الوسط.

يمكن كذلك استعمال طريقة زرع العلب بالدمج غير أنه في هذه الحالة، يجب التصديق على معادلة النتائج بالنسبة للزرع كما أن التمييز والتفريق بين العفنيات والخمائر في هذه الحالة غير ممكن. يمكن أن يعطي منهج الزرع على السطح إحصاءات أعلى. تسهل تقنية الزرع بالتطعيم على السطح تعرضا أقصى للخلايا للأكسجين الجوي وتجنب تعطيل النشاط الحراري للخلايا البرعمية الفطرية. تتوقف النتائج على نوع الفطريات.

3.2.7 تحضن العلب المحضرة (2.2.7) في شروط هوائية، الأغذية نحو الأعلى وفي وضعية مستقيمة، داخل جهاز التحضين (1.5) في درجة حرارة 25 ± 1°م خلال خمسة (5) إلى سبعة (7) أيام. إذ اقتضى الأمر، تترك العلب لضوء النهار خلال يوم (1) إلى يومين (2).

إذا وقع الشك في وجود كسيروميساس بيسبوروس (*Xeromyces bisporus*) تحضن العلب لمدة عشرة (10) أيام.

ينصح بتحضين علب البيتري داخل كيس بلاستيكي مفتوح لتفادي تلوث جهاز التحضين في حالة انتشار العفنيات خارج العلب.