

- وبمقتضى المرسوم التنفيذي رقم 90-39 المؤرخ في 3 رجب عام 1410 الموافق 30 يناير سنة 1990 والمتعلق بمراقبة الجودة وقمع الغش، لا سيما المادة 19 منه، المعدل والمتّم،

- 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 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 المرسوم التنفيذي رقم 15-172 المؤرخ في 8 رمضان عام 1436 الموافق 25 يونيو سنة 2015 الذي يحدد الشروط والكيفيات المطبقة في مجال الخصائص الميكروبيولوجية للمواد الغذائية،

- وبمقتضى القرار الوزاري المشترك المؤرخ في 2 محرم عام 1438 الموافق 4 أكتوبر سنة 2016 الذي يحدد المعايير الميكروبيولوجية للمواد الغذائية،

- وبمقتضى القرار المؤرخ في 28 رجب عام 1435 الموافق 28 مايو سنة 2014 الذي يجعل منهج تحضير العينات والمحلول الأم والتخفيفات العشرية قصد الفحص الميكروبيولوجي، إجباريا،

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 والمذكور أعلاه، يهدف هذا القرار إلى جعل المنهج الأفقي لإحصاء الأجسام الدقيقة بحساب المستعمرات في 30م بتقنية الزرع في العمق، إجباريا.

المادة 2 : من أجل إحصاء الأجسام الدقيقة بحساب المستعمرات في 30م بتقنية الزرع في العمق، تلزم مخابر مراقبة الجودة وقمع الغش والمخابر المعتمدة لهذا الغرض باستعمال المنهج المبين في الملحق المرفق بهذا القرار.

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

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

حرّر بالجزائر في 11 محرم عام 1441 الموافق 11 سبتمبر سنة 2019.

سعيد جلاب

وزارة التجارة

قرار مؤرخ في 11 محرم عام 1441 الموافق 11 سبتمبر سنة 2019، يجعل المنهج الأفقي لإحصاء الأجسام الدقيقة بحساب المستعمرات في 30م بتقنية الزرع في العمق، إجباريا.

إنّ وزير التجارة،

- بمقتضى المرسوم الرئاسي رقم 19-111 المؤرخ في 24 رجب عام 1440 الموافق 31 مارس سنة 2019 والمتضمن تعيين أعضاء الحكومة، المعدل،

يحسب عدد الأجسام العضوية الدقيقة في الغرام من العينة أو عدد الأجسام العضوية الدقيقة في المليمتر من العينة انطلاقاً من عدد المستعمرات المتحصل عليها من العلب التي تحتوي على أقل من 300 مستعمرة.

4. أوساط الزرع والمخففات :

1.4 المخففات

من الأحسن تحضير المخففات طبقاً للتوصيات المحددة في المناهج المتعلقة بتحضير عينات التجربة والمحلل الأم والتخفيفات العشرية قصد الفحص الميكروبيولوجي، المحددة في التنظيم المعمول به.

2.4 وسط هلامي : هلام للإحصاء (PCA)

1.2.4 التركيب :

عصارة أنزيمية للكازيين	5غ
مستخلص الخميرة	2,5غ
غلوكوز منزوع الماء (C ₆ H ₁₂ O ₆)	1غ
هلام*	9غ إلى 18غ
ماء	1000 ملل
* حسب قدرة تصلب الهلام.	

في حالة تحليل منتجات الحليب، يضاف غرام واحد من مسحوق الحليب منزوع الزبدة في لتر واحد من وسط الزرع. يجب أن يكون مسحوق الحليب المنزوع الزبدة خالياً من المواد المثبطة.

2.2.4 التحضير :

- تذاب المكونات أو الوسط الكامل المجفف في الماء، بالتسخين، إذا اقتضى الأمر،

- تمزج بعناية وتترك لترتاح عدة دقائق،

- يضبط العامل الهيدروجيني PH (4.5) إذا اقتضى الأمر، بحيث يصبح بعد التعقيم يساوي $7 \pm 0,2$ في 25م°،

- يوزع الوسط في أنابيب أو حوجلات أو قارورات (8.5) ذات سعة ملائمة،

- تعقم في جهاز التعقيم (1.5) في 121م° لمدة 15 دقيقة،

- إذا استعمل الوسط مباشرة، يبرّد في حمام مائي (3.5)

الملحق

منهج أفقي لإحصاء الأجسام الدقيقة بحساب المستعمرات في 30م° بتقنية الزرع في العمق

1. مجال التطبيق :

يحدد هذا المنهج تقنية أفقية لإحصاء الأجسام العضوية الدقيقة القادرة على النمو وتشكيل مستعمرات في وسط صلب بعد التحضين في 30م° في شروط هوائية.

يطبق هذا المنهج :

- (1) على المواد الموجهة للاستهلاك البشري أو الحيواني،
- (2) على عينات البيئة في مجال إنتاج الأغذية الموجهة للاستهلاك البشري أو الحيواني وتحضير الأغذية.

يتكفل هذا المنهج بالمواد :

(1) التي تتطلب إحصاء دقيقاً عندما يحدد الحد الأدنى للكشف (أقل من 10² / غ أو 10² / ملل بالنسبة للعينات السائلة أو أقل من 10³ / غ بالنسبة للعينات الصلبة)،

(2) التي من المفترض أن تحتوي على مستعمرات مجتاحة و التي تخفي مستعمرات لأجسام عضوية دقيقة أخرى، مثل الحليب ومشتقاته التي يمكن أن تحتوي على مختلف أنواع الباسيلوس (bacillus) المجتاحة.

ملاحظة :

بالنسبة لبعض المواد، يمكن أن تعطي التقنية المحددة في هذا المنهج نتائج مختلفة عن تلك المتحصل عليها في التقنية المحددة في المنهج الأفقي لإحصاء الأجسام العضوية الدقيقة في 30م° بتقنية الزرع في السطح.

2. التعريف :

أجسام عضوية دقيقة : كائنات حية ذات حجم مجهري، تضم البكتيريا والفطريات (الخمائر والعفنيات) والحيوانات الأولية (protozoaires) والفيروسات.

3. المبدأ :

توضع كمية محددة من عينة التجربة بالنسبة للمواد السائلة أو كمية محددة من المحلول الأم في حالة مواد أخرى، في علبه بتري فارغة، وتخلط مع وسط زرع هلامي محدد ومذوب، مشكلة بذلك علبه هلام مزروعة في العمق.

تحضر علب أخرى في نفس الشروط، انطلاقاً من التخفيفات العشرية لعينة التجربة أو للمحلل الأم.

تحضن العلب في شروط هوائية في 30م° لمدة 72 ساعة.

- يُضبط العامل الهيدروجيني (4.5)، إذا اقتضى الأمر، بحيث يصبح بعد التعقيم $7 \pm 0,2$ في 25°م .

- يُوزع الوسط في أنابيب أو حوجلات أو قارورات (8.5) ذات ساعات مناسبة.

- يعقّم داخل جهاز التعقيم في 121°م لمدة 15 دقيقة.

- إذا استعمل الوسط في الحين، يبرّد قبل الاستعمال في حمام مائي (3.5) مضبوط بين 44°م و 47°م ، وإلا يُخزّن في الظلام لمدة 3 أشهر، على الأكثر، في درجة حرارة $(3 \pm 5)^\circ\text{م}$ ، في شروط لا تؤثر على تركيبه وخصائصه.

- يُذوّب الوسط كاملا قبل الشروع في الفحص الميكروبيولوجي، ثمّ يبرّد بين 44°م و 47°م في حمام مائي (3.5) قبل الاستعمال.

5. التجهيزات :

تقبل الأدوات ذات الاستعمال الوحيد بنفس الطريقة كالأدوات الزجاجية والبلاستيكية المعاد استعمالها، إذا كانت مواصفاتها مناسبة.

الأجهزة المتداولة في مخبر الميكروبيولوجيا، لا سيما ما يأتي :

1.5 فرن للتعقيم بالحرارة الجافة أو جهاز التعقيم بالحرارة الرطبة،

2.5 جهاز التحضين يمكن ضبطه في درجة حرارة (1 ± 30)

3.5 حمام مائي قادر على حفظ درجة حرارة مضبوطة بين 44°م و 47°م .

4.5 جهاز قياس العامل الهيدروجيني (pH) بدقة قراءة $0,1 \pm$ وحدة pH في 25°م .

5.5 علب بتري من الزجاج أو البلاستيك قطرها من 90 ملم إلى 100 ملم،

6.5 ماصة مدرجة ذات تدفق تام سعتها ميلتر واحد، ذات تدريجات 0,1 ملل أو ماصات أو توماتيكية مع استعمال مخروطات معقمة.

7.5 جهاز لحساب المستعمرات (اختياري)، مكوّن من قاعدة مضاءة وعداد ميكانيكي أو إلكتروني مع شاشة رقمية.

8.5 أنابيب أو حوجلات أو قارورات ذات سعة مناسبة ولا تتجاوز 500 ملل.

مضبوط بين 44°م و 47°م ، قبل الاستعمال، وإلا يُخزّن في الظلام لمدة 3 أشهر، على الأكثر، في درجة حرارة $(3 \pm 5)^\circ\text{م}$ ، وفي شروط لا تغير تركيبته وخصائصه،

- قبل بداية التحليل الميكروبيولوجي، يذوّب الوسط كليا، ثم يبرد بين 44°م و 47°م في حمام مائي (3.5) قبل الاستعمال.

- يستعمل الهلام المذوّب في أقرب وقت ممكن، وينصح بعدم الاحتفاظ به أكثر من 4 ساعات.

3.2.4 تجربة فعالية وسط الزرع :

1.3.2.4 عموميات :

إنّ الوسط الهلامي للإحصاء (PCA) غير انتقائي، يستعمل في هذا المنهج كوسط مزرع في العمق.

2.3.2.4 الإنتاجية :

التحضين	(3±72) ساعة في $(1 \pm 30)^\circ\text{م}$.
السلالات الشاهدة	باسيلوس سوبتيليس سببيزوني ستافيلوكوكوس أوريوس
الوسط المرجعي	هلام تريبتون صويا
منهج المراقبة	كمي
المعيار	تقرير الإنتاجية $\geq 0,7$ (RP)

3.4 وسط طبقة ثانية (7.2.8) :

1.3.4 التركيب :

هلام*	12 غ إلى 18 غ
ماء	1 000 ملل
* حسب قدرة تصلب الهلام.	

2.3.4 التحضير :

- يُضاف الهلام في الماء ويوضع للغليان مع الخلط بصفة متكررة، بحيث يذوب الهلام كليا، أو يُوضع في تدفق البخار لمدة حوالي 30 دقيقة.

6. اقتطاع العينة :

يجب أن يجري اقتطاع العينات طبقا للشروط المحددة في التنظيم المعمول به، أو إذا اقتضى الأمر للمواصفات المعترف بها.

يجب أن تكون العينة ممثلة غير متلفة أو تغيرت أثناء النقل والتخزين.

7. تحضير عينة التجربة :

يجب أن تحضر عينة التجربة طبقا لمناهج التحاليل المحددة في التنظيم المعمول به.

8- طريقة العمل :

1.8 العينة المقتطعة للتجربة والمحلل الأم والتخفيفات :

يجب أن يحضر المحلول الأم والتخفيفات طبقا للمناهج المتعلقة بتحضير عينات التجربة والمحلل الأم والتخفيفات العشرية قصد الفحص الميكروبيولوجي المحددة عن طريق التنظيم المعمول به.

2.8 الزرع والتحصين :

1.2.8 تؤخذ علبتا بيتري معقمتين (5.5)، تنقل بواسطة ماصة معقمة (6.5)، في كل علبة مليونيتر واحد من عينة التجربة إذا كانت المادة سائلة أو مليونيتر واحد من المحلول الأم في حالة المواد الأخرى (تخفيف 1-10).

إذا حُضرت العلب انطلاقا من أكثر من تخفيف واحد، يمكن تقليص عدد العلب إلى علبة واحدة لكل تخفيف.

2.2.8 تؤخذ علبة بيتري معقمة أخرى (5.5)، تستعمل ماصة أخرى معقمة (6.5) لوضع 1 ملل من التخفيف 1-10 (مادة سائلة) أو 1 ملل من التخفيف 2-10 (مواد أخرى).

3.2.8 إذا اقتضى الأمر، تعاد طريقة العمل المذكورة أعلاه بالتخفيفات التي تلي، بواسطة ماصة معقمة جديدة لكل تخفيف عشري.

4.2.8 تختار فقط التخفيفات الحساسة (تخفيفا عشريا متتاليا على الأقل) لزرع علب بيتري التي يمكن أن تحصى فيها بين 10 و 300 مستعمرة في علبة واحدة.

5.2.8 يسكب في كل علبة بتري حوالي 12 ملل إلى 15 ملل من الهلام للإحصاء (2.4) في درجة حرارة محصورة بين 44°م و 47°م. يجب أن لا تتعدى المدة بين نهاية تحضير المحلول الأم (أو التخفيف 1-10 في حالة المادة السائلة) والوقت الذي يسكب فيه الوسط (2.4) في العلب 45 دقيقة.

6.2.8 يمزج الأنوكولوم بعناية مع وسط الزرع بتدوير علب بيتري ويترك الخليط ليتصلب بوضع علب بيتري فوق سطح أفقي وبارد.

7.2.8 بعد التصلب الكامل، يسكب حوالي 4 ملل من الوسط لطبقة ثانية (3.4) أو الهلام للإحصاء (2.4) في درجة حرارة محصورة بين 44°م و 47°م في سطح الوسط المزروع وذلك فقط عندما يشتبه أن المادة المحللة تحتوي على أجسام عضوية دقيقة، حيث تجتاح المستعمرات مساحة الوسط. يترك ليتصلب كما هو محدد في (6.2.8).

8.2.8 تقلب العلب المحضرة بهذه الطريقة وتوضع في جهاز التحضين (2.5) مضبوط في (30±1)°م. مدة الاحتضان (72 ± 3) ساعة.

3.8 إحصاء المستعمرات :

1.3.8 بعد فترة التحضين المحددة (8.2.8)، تختار علب بيتري التي تحتوي على أقل من 300 مستعمرة. تحسب جميع المستعمرات فوق العلب بواسطة جهاز لحساب المستعمرات (7.5) إذا اقتضى الأمر، تفحص العلب تحت ضوء منتشر.

من المهم إدراج المستعمرات التي لها حجم رأس الدبوس في حساب المستعمرات، لكن من الضروري أن يتجنب المحلل الخلط بين الجزيئات غير المذابة أو المواد الموجودة على شكل راسب مع تلك المستعمرات ذات حجم رأس الدبوس.

تفحص بحذر العناصر المشكوك فيها باستعمال تكبير أقوى، إذا اقتضى الأمر، لتمييز المستعمرات من الجزيئات الغريبة.

2.3.8 يجب أن تعتبر المستعمرات المجتاحة كمستعمرة واحدة، إذا اجتاحت هذه المستعمرات أقل من ربع العلبة، تحسب المستعمرات التي توجد في الجهة غير المجتاحة من العلبة، ويحسب عدد المستعمرات الموافقة للعلبة بأكملها. إذا غطت المستعمرات المجتاحة أكثر من ربع العلبة لا تؤخذ هذه العلبة بعين الاعتبار في حساب المستعمرات.

9. التعبير عن النتائج :

1.9 طريقة الحساب :

لكي تكون النتيجة صحيحة، يقدر على العموم ضرورة حساب المستعمرات الموجودة في علبة واحدة على الأقل والتي تحتوي، على الأقل، على 10 مستعمرات.

يُحسب العدد N للأجسام العضوية الدقيقة الموجودة في عينة التجربة، كمعدل مرجح انطلاقا من تخفيفين متتاليين بواسطة المعادلة الآتية :

$$N = \frac{\sum C}{V \times 1,1 \times d}$$

حيث :

$\sum C$: مجموع المستعمرات المحصاة في العلبتين (2) المأخوذتين بعين الاعتبار لتخفيفين متتاليين، حيث تكون علبة واحدة على الأقل، تحتوي على 10 مستعمرات، على الأقل،

V : حجم اللقاح (inoculum) الموضوع في كل علبة، في المليلتر،

d : التخفيف الموافق للتخفيف الأول المأخوذ بعين الاعتبار [$d = 1$ بالنسبة للمادة السائلة غير المخففة (عيّنة التجربة)].

إذا استعمل أكثر من تخفيف واحد، يُتوقع أن تكون النسبة بين حساب مستعمرات التخفيف d_2 وحساب مستعمرات التخفيف d_1 تساوي 10%. من الأحسن أن تكون المجالات العليا والسفلى محددة من طرف المخبر لحساب مستعمرات التخفيف d_2 .

مثال : إذا كان حساب مستعمرات التخفيف d_1 هو 250، من الأحسن ألا يكون حساب مستعمرات التخفيف d_2 أصغر من 13 (5,2%) و لا أكبر من 39 (15,6%).

تدور النتيجة المحسوبة إلى رقمين ممثلين. لهذا إذا كان الرقم الثالث أقل من 5، لا يغير الرقم الذي يسبق وإذا كان الرقم الثالث أكبر أو يساوي 5، يرفع الرقم الذي يسبق بوحدة.

من الأفضل أن يُعبّر عن النتيجة بعدد يتراوح بين 1 و 9,9 مضروب في القوة المناسبة لـ 10 أو في عدد كامل متكوّن من رقمين ممثلين.

يُعبّر عن النتيجة بالعدد N للأجسام العضوية الدقيقة في المليلتر (مواد سائلة) أو بالغم (مواد أخرى).

مثال : أعطى الحساب النتائج الآتية :

- في التخفيف الأول المأخوذ بعين الاعتبار (10-2) : 168 مستعمرة،

- في التخفيف الثاني المأخوذ بعين الاعتبار (10-3) : 14 مستعمرة،

$$N = \frac{\sum C}{V \times 1,1 \times d} = \frac{168+14}{1 \times 1,1 \times 10^{-2}} = \frac{182}{0,011} = 16545$$

تدور النتيجة كما هو محدد أعلاه، يصبح عدد الأجسام العضوية الدقيقة 17 000 أو $1,7 \times 10^4$ في المليلتر أو في الغرام من المادة.

2.9 الثقة :**1.2.9 عموميات :**

تمّ حساب معطيات الثقة للعب التي تحتوي على أكثر من 15 وأقل من 300 مستعمرة. تتعلق معطيات الثقة بنوع البكتيريا المرافقة ونوع العيّنة.

2.2.9 التكرارية :

لا يتجاوز الفرق المطلق بين نتيجة تجربتين منفردتين، متحصل عليهما عن طريق نفس المنهج على نفس المادة في نفس المخبر ومن طرف نفس المحلل وباستعمال نفس التجهيزات في وقت زمني قصير، حد التكرارية $r = 0,25$ ، والمعبر عنها بـ $\log_{10} N$ ، حيث N هو عدد الأجسام العضوية الدقيقة في المليلتر (موافق لمعامل 1,8 لعدد طبيعي من الأجسام العضوية الدقيقة في المليلتر).

3.2.9 إعادة التجربة :

لا يتجاوز الفرق المطلق بين نتيجة تجربتين متحصل عليهما عن طريق نفس المنهج على نفس مادة التجربة في مخابر مختلفة ومن طرف محلّلين مختلفين باستعمال تجهيزات مختلفة، حد إعادة التجربة ما بين المخابر $R = 0,45$ ، والمعبر عنه $\log_{10} N$ ، حيث N هو عدد الأجسام العضوية الدقيقة في المليلتر (موافق لمعامل 2,8 لعدد طبيعي من الأجسام العضوية الدقيقة في المليلتر).

3.9 التعبير عن نتائج التجربة :**1.3.9 عموميات :**

في المثالين (2.3.9 و 3.3.9) فإن معدلي معطيات الثقة ومستوى الاحتمال لـ 95% و تحليل عينة واحدة أخذت بعين الاعتبار. تجدر الإشارة أنّه من الناحية العملية غالباً ما يستعمل معدل عدة عيّنات. يعبر عن الأرقام بعدد الأجسام العضوية الدقيقة في المليلتر.

2.3.9 شروط التكرارية :

النتيجة الأولى : $10^5 = 100\ 000$

من المناسب ألا يتجاوز الفرق بين النتيجة الأولى و النتيجة الثانية $\log_{10} N$ 0,25.

النتيجة الثانية :

الحد الأدنى : $10^{4,75} = 56\ 000$

حيث :

r : هو حد التكرارية.

R : هو حد إعادة التجربة.

يكون الفرق بين النتائج المتحصل عليها من طرف
المخبرين مقبولا إذا تحصل المخبر الثاني على نتيجة
لا تكون لا :

أصغر من $10^{4,59} = 39000$ و لا أكبر من $10^{5,41} = 257000$.**مقارنة مع حد (اختبار من جانب واحد) :**الحد: $10^5 = 100\ 000$.

من الضروري مقارنة الفرق بين الحد ونتيجة المخبر
(معدل n تحديداً، في هذا المثال، $2=n$) مع حد الفرق الحرج
: d_{cL}

$$d_{cL} = \frac{0,84}{\sqrt{2}} \times \sqrt{R^2 - r^2 \left(1 - \frac{1}{n}\right)} = \frac{0,84}{\sqrt{2}} \times \sqrt{R^2 - \frac{r^2}{2}} = 0,24$$

نتائج التجربة حتى $10^{5,24} = 174000$ مقبولة بالنسبة
للحد.

الحد الأقصى : $10^{5,25} = 178\ 000$.

يكون الفرق بين النتيجة الأولى والنتيجة الثانية مقبولا
إذا لم تكن النتيجة الثانية أصغر من 56 000 أو أكبر من
178 000.

3.3.9 شروط إعادة التجربة :

النتائج المتحصل عليها في المخبر الأول (معدل التحديدات
مضاعفة) : $10^5 = 100\ 000$

من المناسب ألا يتجاوز الفرق بين النتيجة الأولى
والنتيجة الثانية المتحصل عليهما في المخبر الثاني 0,45
وحدة $\log_{10}N$.

النتيجة الثانية :الحد الأدنى : $10^{4,55} = 36\ 000$ الحد الأقصى : $10^{5,45} = 280\ 000$.

يكون الفرق بين النتيجتين المتحصل عليهما من طرف
المخبر الأول والثاني مقبولا، إذا تحصل المخبر الثاني على
نتيجة لا تكون أقل من 36 000 ولا أكبر من 280 000.

إن الفرق الحرج (CD) المستعمل للتفسير عن النتائج
المبينة كما يأتي :

استعمال الفرق الحرج للتفسير عن النتائج :**عموميات :**

في الأمثلة المبينة أدناه، يؤخذ بعين الاعتبار معدل
معطيات الثقة ومستوى الاحتمالات لـ 95 % و تحليل عينة
واحدة.

تجدر الإشارة أنه من الناحية العملية غالباً ما يستعمل
معدل عدة عينات. يعبر عن الأرقام بعدد الأجسام العضوية
الدقيقة في المليلتر.

شروط إعادة التجربة :

النتائج المتحصل عليها في المخبر الأول (معدل
التحديدات مضاعفة) : $10^5 = 100\ 000$.

يقبل الفرق بين هذه النتيجة والنتيجة المتحصل عليها
من طرف المخبر الثاني (معدل n تحديداً، في هذا المثال
 $n=2$) إذا لم تكن القيمة أكبر من الفرق الحرج،
: $d_C \log_{10}N$

$$d_C = \sqrt{R^2 - r^2 \left(1 - \frac{1}{n}\right)} = \sqrt{R^2 - \frac{r^2}{2}} = \sqrt{0,45^2 - \frac{0,25^2}{2}} = 0,41$$