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 موليير- كوفمان يحتوي على تيتراتيونات 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 صلبين يصبان من الأفضل في علب بيتري ذات 140مم.

استعمال الهلام المحتوي على الأخضر اللامع وأحمر الفينول والهلام المحتوي على سولفات بيسميث .

بسبب احتمال وجود سالمونيلا غير النموذجي ولاكتوزالموجب، نستطيع استبدال الهلام المحتوى على الأخضر اللامع وأحمر الفينول بوسط أخر 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 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 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 اختياريا، 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 انطلاقا من عينة من المنتوج، في زرع الوسط السائل المختار " الأخضر اللامع، اللاكتوز و الحويصل الصفراوي للبقرة" داخل أنابيب اختبار محتوية على أنبوبات دورهام Durham. تجفف الأنابيب لمدة 48 ± 2 ساعة في30 °م ± 1 .

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

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 المنتوج وذلك بالاستناد على جدول العدد الأكثر احتمالا (ع أ إ) 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 المنتوج.

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 المنتوج 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 إ و كذا اختبار الإثبات للأنابيب الإيجابية).

3– المعايرة

1.3– معايرة المخبر

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

2.1.3 بالنسبة للقشدة المثلجة و المثلجات بالحليب غير المعبأة (الموجهة للبيع في قاعات الشاي والمطاعم، أو من طرف الموزعات الآلية للخدمة الذاتية ...الخ)، تقتطع بصفة نظيفة من 30 إلى 50غ من المنتوج 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.

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 المنتوج.

3.2.3 يضاف لـ 10غ (أو الوزن الأقرب إلى 10غ) الموجود في القارورة المحتوية على الكريات الزجاجية، 90 ملل (أو9 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 مايأتي:

بيبتون.....10غ

لاكتوز 10غ

الحويصل الصفراوي للبقرة منزوع الماء 20غ

الأخضر اللامع.....0,0133غ

ماء مقطر (في جهاز زجاجي) .....،..... 1000ملل

2.5 لتحضير1000 ملل من الوسط، يذوب بيبتون و اللاكتوز في حوالي 500 ملل من الماء المقطر.

يذوب 20غ من الحويصل الصفراوي للبقرة المنزوع الماء في200 ملل من الماء المقطر. يجب أن يتراوح العامل الهيدروجيني لهذا المحلول بين 7,0 و7,5. يخلط المحلولان، يعدل العامل الهيدروجيني

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 الملأ ، 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

بيبتون.....7 غ

أملاح الحويصل الصفراوي .....1,5 غ

لاكتوز.....10 غ

كلورور الصوديوم .....5 غ

حمر عادي (neutre) .....0,03 غ

البلور البنفسجي..... 0,002غ

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 لأخر، ثم نتركه يغلي لمدة دقيقتين. يبرد الوسط في 45°م ويصب في 10 ملل في كل علبة 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) تحضيرا عديم الماء جاهز للاستعمال ، في هذه الحالات، يجب إتباع المواصفات التقنية بدقة كما ينبغي دائما تحضير شاهد.

6 – المخفف

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

كلورور الصوديوم (NaCl) 9,00غ

كلورور البوتاسيوم(KCl).....0,42غ

كلورور الكالسيوم المجفف (CaCl2).....0,24غ

بكربونات الصوديوم (NaHCO3) 0,20غ

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 بيبتون عند0,1 % 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 10ملل 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 مباشرة1 ملل من العينة في علبة بيتري.

2.1.7 بالنسبة للتخفيفات الأخرى، نعمل كما يأتي:

– يلقح 1 ملل من الخليط (3.2.3) مباشرة في الوسط المغذي أو في علب بيتري. وبذلك نتحصل على تخفيف 10^{-1}.

– 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 زرع 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 1غ ، 0,1غ و 0,01غ .

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 العلب1 ملل من العينة و1 ملل من التخفيفات المطلوبة.

– تفرغ في كل 10ملل 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 و إيابا متبوعة بخمس حركات دائرية في اتجاه عقارب الساعة ثم بخمس حركات ذهابا و إيابا 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 (الفقرة2.7) لمدة48 ساعة ± 2 ساعة في 30° م ± 1 .

2.3.7 تجفف علب بيتري المحضرة كما هو مبين في الفقرة 2.2.7 أعلاه، لمدة 22 ± 2 ساعة في 30°م ± 1.

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 أد ناه، 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 1غ، أو0,1غ أو0,01غ 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 0,1غ، أو0,01غ أو 0,001غ 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 1غ، أو0,1غ، أو 0,01غ...إلخ.

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 في1 غ، و0,1غ و0,01غ....الخ.

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.

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

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