

ARRETES, DECISIONS ET AVIS

MINISTERE DU COMMERCE

Arrêté du 5 Safar 1425 correspondant au 27 mars 2004 rendant obligatoire la méthode de dénombrement des germes totaux à 30 °C pour les poudres de lait et de lactosérum.

Le ministre du commerce,

Vu le décret présidentiel n° 03-215 du 7 Rabie El Aouel 1424 correspondant au 9 mai 2003, modifié, portant nomination des membres du Gouvernement ;

Vu le décret exécutif n° 90-39 du 30 janvier 1990, modifié et complété, relatif au contrôle de la qualité et à la répression des fraudes ;

Vu le décret exécutif n° 02-453 du 17 Chaoual 1423 correspondant au 21 décembre 2002 fixant les attributions du ministre du commerce ;

Vu l'arrêté interministériel du 29 Safar 1414 correspondant au 18 août 1993 relatif aux spécifications et à la présentation de certains laits de consommation ;

Vu l'arrêté du 14 Safar 1415 correspondant au 23 juillet 1994, modifié et complété par l'arrêté interministériel du 25 Ramadhan 1418 correspondant au 24 janvier 1998 relatif aux spécifications microbiologiques de certaines denrées alimentaires ;

Arrête :

Article 1er. — En application des dispositions de l'article 19 du décret exécutif n° 90-39 du 30 janvier 1990, modifié et complété, susvisé, le présent arrêté a pour objet de rendre obligatoire une méthode de dénombrement des germes totaux à 30 °C dans les poudres de lait et de lactosérum.

Art. 2. — Pour le dénombrement des germes totaux à 30 °C dans les poudres de lait et de lactosérum, les laboratoires du contrôle de la qualité et de la répression des fraudes et les laboratoires agréés à cet effet doivent employer la méthode d'analyse microbiologique décrite en annexe.

Cette méthode doit être également utilisée par le laboratoire lorsqu'une expertise est ordonnée.

Art. 3. — Le présent arrêté sera publié au *Journal officiel* de la République algérienne démocratique et populaire.

Fait à Alger, le 5 Safar 1425 correspondant au 27 mars 2004.

Noureddine BOUKROUH.

ANNEXE

Méthode de dénombrement des germes totaux à 30 °C pour les poudres de lait et de lactosérum

1° Définition :

On appelle « germes totaux », les germes microbiens dénombrés par la présente méthode. Le résultat du dénombrement est exprimé en nombre de germes totaux par gramme de poudre.

2° Principe :

On procède à une série de dilution de l'échantillon reconstitué à 47 ± 2 °C, que l'on mélange avec le milieu prescrit dans des boîtes de Pétri. Après incubation à 30 °C pendant 72 heures, on compte des colonies.

3° Appareillage et verrerie :

3.1 Appareils

3.1.1 Autoclave fonctionnant à 120 °C

3.1.2 Four à air chaud fonctionnant jusqu'à 170 °C.

3.1.3 Etuve bactériologique réglée à une température uniforme de 30 ± 1 °C

3.1.4 PH-mètre, avec compensation de température.

3.1.5 Loupe, grossissement 2,5.

3.1.6 Appareil de comptage lumineux.

3.1.7 Compteur - enregistreur.

3.1.8 Bain-marie à 47 ± 2 °C.

3.1.9 Balance.

3.2. Verrerie :

Toute la verrerie doit être stérilisable.

3.2.1 Récipient en verre pour la pesée du lait en poudre.

3.2.2 Flacons de dilution d'une contenance de 150 à 200 ml, avec bouchons ou capsules à vis appropriés.

3.2.3 Grands flacons (1000 ml ou plus) pour la préparation du milieu de culture.

3.2.4 Tubes à essai, de 151/15 mm environ, destinés à contenir le milieu culture.

3.2.5 Pipettes graduées (1 et 10 ml)

3.2.6 Boîte de Pétri en verre transparent et incolore de 90 mm environ de diamètre intérieur et de 15 à 20 mm de hauteur la profondeur intérieure doit être de 12 mm minimum. Le fond de cette boîte doit être plat et ne présenter ni irrégularités ni renflements. Les couvercles doivent s'adapter à la boîte.

— On peut utiliser des boîtes de Pétri en matière plastique et des pipettes pré-stérilisées destinées à n'être utilisées qu'une seule fois.

3.2.7 Perles de verres (voir 6.2.1.4).

3.3. Matériels divers :

3.3.1 Entonnoirs de filtration pour la préparation des milieux.

3.3.2 Papiers-filtres rapides s'adaptant aux entonnoirs (3.3.1).

3.3.3 Coton non absorbant, non toxique après stérilisation.

3.3.4 Réactifs pour ajuster le pH.

3.3.4.1 NaOH environ 1 N.

3.3.4.2 HCl environ 1 N.

4°/ Milieu de culture :

4.1 Composition

Extrait de levure..... 2,5 g
Tryptone..... 5,0 g
Glucose..... 1,0 g
Lait écrémé en poudre..... 1,0 g
Gélose..... 10 à15 g
selon les propriétés gélifiantes de la gélose utilisée.

Eau distillée..... 1000 ml
(dans un appareil à distiller en verre).
pH $6,9 \pm 0,1$.

L'extrait de levure, la tryptone, le glucose, le lait écrémé en poudre et la gélose doivent être de qualité bactériologique.

Le lait écrémé en poudre ne contiendra pas de substances inhibitrices.

4.2 Préparation

4.2.1 Préparation à partir de milieux en poudre.

4.2.1.1 Suivre les instructions du fabriquant mais ajouter du lait écrémé en poudre (cf. 4.1).

4.2.1.2 Si nécessaire, ajuster le pH à 7,0 - 7,1 en utilisant NaOH (1 N) ou HCL (1N).

4.2.2 Préparation à partir d'ingrédients séparés.

4.2.2.1 Dissoudre successivement l'extrait de levure, la tryptone, le glucose et le lait écrémé en poudre dans l'eau, en chauffant si nécessaire.

4.2.2.2 Ajouter la gélose et porter à ébullition jusqu'à ce que la gélose soit complètement fondue ou chauffer à la vapeur pendant environ 30 minutes.

4.2.2.3 Filtrer sur papier filtre.

4.2.2.4 Ajuster le milieu à un pH de 7,0 - 7,1 en utilisant NaOH (1N) ou HCl (1N).

4.2.3 Répartir par quantités de 10 à 12 ml dans les tubes à essais.

4.2.4 Stériliser pendant 15 minutes dans l'autoclave à 120 °C;

4.2.5 Vérifier le pH du milieu à 45 °C (ce pH doit être de $6,9 \pm 0,1$).

4.2.6 Le milieu doit être conservé dans l'obscurité, à une température ne dépassant pas 5 °C Prendre soin d'éviter l'évaporation.

5°/ Diluant :

Tous les produits doivent être de qualité analytique.

5.1 Solution de Ringer non diluée.

Composition :

NaCl.....9,00 g
KCl.....0,42 g
Ca Cl 2 (anhydre).....0,24 g
NaHCO₃.....0,20 g
Eau distillée.....1000 ml
(dans un appareil à distiller en verre)

— On peut utiliser un tampon au citrate (à raison de 15 g de citrate tri-sodique anhydre par 1000 ml) pour les poudres à faible solubilité.

— On peut également employer une solution de peptone à 0,1 % en lieu et place de la solution de Ringer diluée au quart.

5.2 Préparation :

5.2.1 Préparer la solution non diluée de Ringer en dissolvant les sels (5.1) dans l'eau et, avant usage, diluer une partie de cette solution avec trois parties d'eau distillée dans un appareil à distiller en verre pour obtenir une solution de Ringer diluée au quart.

5.2.2 Répartir la solution diluée de façon à obtenir après stérilisation des quantités de 90 ± 2 ml dans les flacons de dilution.

On peut préparer le diluant à partir de tablettes prêtes à l'emploi.

5.2.3 Stériliser pendant 15 minutes dans l'autoclave à 120 °C.

6°/ Méthode :

6.1 Préparation de la verrerie

6.1.1 Toute la verrerie doit être nettoyée soigneusement avant emploi.

6.1.2 Les tubes à essais, les pipettes et les flacons doivent être bouchés avec du coton avant leur stérilisation.

Pour la stérilisation, on peut également envelopper les pipettes dans du papier aluminium ou dans tout autre matériau approprié.

6.1.3 La stérilisation des pipettes et des boîtes de Pétri s'effectuera de préférence dans un four à air chaud pendant une heure et à une température comprise entre 165 et 170 °C, mais il est également possible de stériliser ce matériel à l'autoclave pendant 120 °C.

Dans ce dernier cas, ne pas fermer les récipients dans lesquels le matériel est stérilisé.

Sécher la verrerie ainsi stérilisée dans l'autoclave ou dans un four à air chaud.

6.2. Préparation des dilutions

6.2.1 Préparation de dilution au 1/10 (reconstitution de la poudre).

6.2.1.1 Réchauffer un flacon contenant 90 ml de diluant à 47 ± 2 °C au bain-marie.

6.2.1.2 Peser 10 g de lait en poudre dans un récipient en verre stérilisé en procédant de façon aseptique.

6.2.1.3 Introduire la poudre dans le flacon de dilution contenant le diluant à 47 ± 2 °C.

6.2.1.4 Pour dissoudre la poudre, la mouiller en faisant tourner lentement puis en secouant doucement le flacon pendant 10 secondes environ, 25 fois avec un mouvement d'une amplitude de 30 cm environ.

Des perles en verre peuvent contribuer à une meilleure reconstitution. Si l'on y recourt, les ajouter au flacon avant stérilisation.

6.2.1.5 Remettre le flacon au bain-marie et le maintenir pendant 5 minutes en agitant de temps à autre le contenu.

6.2.1.6 Agiter une fois et effectuer le dénombrement.

Le volume final du lait reconstitué est d'environ 97,5 ml et non de 100 ml, mais cet écart est négligeable.

6.2.2. Préparation des dilutions au 1/100 et plus.

6.2.2.1 A l'aide d'une pipette stérile transférer 10 ml de lait reconstitué dans 90 ml de diluant stérile en veillant à ne pas enfoncer l'extrémité de la pipette de plus d'un centimètre au-dessous de la surface. On obtient ainsi la dilution au 1/100.

6.2.2.2 Mélanger en agitant 25 fois avec un mouvement d'une amplitude de 50 cm environ.

6.2.2.3 On peut poursuivre les dilutions décimales en utilisant chaque fois une nouvelle pipette pour passer d'une dilution à l'autre comme prévue au 6.2.2.1.

6.3. Ensemencement des boîtes de Pétri.

6.3.1 Préparer au moins deux boîtes à partir de chaque dilution choisie de façon à obtenir au moins deux boîtes comprenant de 20 à 300 colonies.

Normalement il suffit de choisir deux dilutions parmi les dilutions au 1/10, au 1/100 ou au 1/1000, mais si l'on prévoit une énumération très élevée, il faudra procéder à d'autres dilutions.

6.3.2 Utiliser une nouvelle pipette stérile de 1 ml pour ensemercer 1 ml de chaque dilution dans les boîtes de Pétri.

6.4. Répartition de la gélose dans les boîtes de Pétri

6.4.1 Faire bouillir le milieu et le refroidir aussi vite que possible à une température de 45 à 47 °C.

6.4.2 Verser dans chaque boîte 10 à 12 ml du milieu fondu, refroidir à une température de 45 à 47 °C

6.4.3 Immédiatement après avoir versé le milieu, le mélanger par cinq mouvements de va-et-vient, suivis de cinq mouvements circulaires dans le sens des aiguilles d'une montre suivis de cinq mouvements de va-et-vient exécutés perpendiculairement aux premiers et suivis enfin de cinq mouvements circulaires dans le sens contraire des aiguilles d'une montre.

6.4.4 Laisser reposer les boîtes jusqu'à la solidification du milieu, les retourner et les placer dans l'étuve. Le temps qui s'écoule entre la préparation des dilutions, et la répartition de la gélose dans les boîtes ne doit pas dépasser 15 minutes.

Il importe que les opérations décrites aux points 6.2, 6.3 et 6.4 soient exécutées à l'abri de la lumière.

6.5 Incubation des boîtes de Pétri.

Les boîtes sont mises à incuber, leur fond étant tourné vers le haut à 30 ± 1 °C pendant 72 ± 2 heures ; il est préférable de ne pas les empiler à plus de quatre (maximum six).

Les piles de boîtes ne doivent pas se toucher, ni être en contact avec les parois ou la partie supérieure de l'étuve.

6.6 Numération des colonies

6.6.1 Les colonies doivent être comptées dans les 4 heures qui suivent la fin de la période d'incubation pour faciliter la numération. Il est recommandé d'utiliser un appareil de comptage lumineux muni d'une loupe et d'un compteur-enregistreur.

6.6.2 Ne tenir compte, pour exprimer les résultats, que des boîtes dans lesquelles se sont développées de 20 à 300 colonies.

6.6.3 Calculer la moyenne arithmétique à partir des chiffres obtenus dans les boîtes ensemençées avec la même dilution.

6.6.4 Si les boîtes correspondant à plusieurs dilutions donnent des résultats compris entre ces limites, ne tenir compte que de la moyenne des résultats.

6.6.5 Si une numération dépasse à peine 300 colonies et si la dilution suivante est à peine inférieure à 20 colonies, prendre la moyenne.

6.6.6 Si l'écart est important, recommencer l'épreuve.