

4.8 Incuber les boîtes retournées 24 h à $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

4.9 Soumettre au moins 3 colonies typiques à l'épreuve de la coagulase (4.12). Les colonies typiques de *staphylococcus aureus* sont noires, brillantes avec une mince bordure blanche et entourées d'une zone claire s'étendant dans le milieu opaque.

4.10 Si au bout de 24 h aucun développement ne s'est produit ou si l'on observe seulement des colonies atypiques, incuber 24 h supplémentaires à $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

4.11 Si des colonies se sont développées (d'après 4.10) en soumettre trois au moins à l'épreuve de la catalase. Pour cela prendre, avec un fil de platine une partie de chacune de ces colonies et la mélanger sur une lame à une goutte d'eau oxygénée à 3,0% (10 volumes). Si l'on observe une production de gaz, soumettre la colonie correspondante à l'épreuve de la coagulase (selon 4.12).

4.12 Epreuve de la coagulase

4.12.1 Inoculer chaque colonie dans un petit tube contenant 0,3 ml de bouillon cœur/cerveille stérile. Incuber 20-24 h à $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

4.12.2 Ajouter dans un petit tube 0,1 ml de cette culture à 0,3 ml de plasma de lapin additionné de 0,1 % d'E.D.T.A.

4.12.3 Incuber à $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ et examiner les tubes en vue de la formation d'un coagulum, chaque heure pendant 4 h, puis après 24 h.

5. Conclure à la présence de staphylocoques à coagulase positive dans l'échantillon de poudre de lait, si trois colonies au moins obtenues selon 4.9 ou 4.11 coagulent le plasma de lapin.



Arrêté du 4 Rabie Ethani 1425 correspondant au 24 mai 2004 rendant obligatoire une méthode de dénombrement des micro-organismes caractéristiques par une technique de comptage des colonies à 37°C dans le yaourt.

Le ministre du commerce,

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 16 Joumada Ethania 1419 correspondant au 7 octobre 1998 relatif aux spécifications techniques des yaourts et aux modalités de leur mise à la consommation ;

Vu l'arrêté du 14 Safar 1415 correspondant au 23 juillet 1994, modifié et complété, 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 micro-organismes caractéristiques par la technique de comptage des colonies à 37°C dans le yaourt.

Art. 2. — Pour le dénombrement des micro-organismes caractéristiques par la technique de comptage des colonies à 37°C dans le yaourt, 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 4 Rabie Ethani 1425 correspondant au 24 mai 2004.

Noureddine BOUKROUH.

ANNEXE

Méthode de dénombrement des micro-organismes caractéristiques par une technique de comptage des colonies à 37°C dans le yaourt

Objet et domaine d'application

La méthode est applicable aux yaourts dans lesquels deux micro-organismes caractéristiques sont présents et vivants.

1° Définition

1.1 *Lactobacillus bulgaricus* : micro-organisme thermophile formant des colonies lenticulaires souvent en forme d'étoile, de 1 à 3 mm de diamètre, sur milieu MRS acidifié (selon DeMan, Rogosa et Sharpe)

Aspect microscopique : bâtonnets généralement courts, mais quelquefois de forme allongée. Ils sont non sporulés, grampositifs, non mobiles, catalase négative.

1.2 *Streptococcus thermophilus* : micro-organisme thermophile formant des colonies lenticulaires de 1 à 2 mm de diamètre sur M 17. Aspect microscopique : cellule sphérique ou ovoïde (Cocci) (0,7 - 0,9 μm de diamètre), par paire ou en chaînes longues. Elles sont gram positives-catalase négatives.

2° Principe

2.1 Ensemencement des dilutions décimales de l'échantillon dans :

— milieu MRS acidifié, suivi d'une incubation en anaérobiose pendant 72 h à 37°C , pour le dénombrement de *L. bulgaricus*,

— milieu M 17, suivi d'une incubation en aérobiose pendant 48 h à 37 ° C, pour le dénombrement de **S. thermophilus**.

2.2 Comptage des colonies et confirmation par tests appropriés.

2.3 Calcul du nombre de micro-organismes

Calcul du nombre de micro-organismes caractéristiques par gramme d'échantillon à partir du nombre de colonies obtenu sur les boîtes sélectionnées à des dilutions permettant de donner un résultat significatif.

3°/ Diluants, milieux de culture et réactifs

3.1 Composants de base

Pour améliorer la reproductibilité des résultats, il est recommandé d'utiliser, pour la préparation du diluant, des composants de base déshydratés ou une préparation complète déshydratée.

Les prescriptions du fabricant doivent être suivies scrupuleusement.

Les réactifs chimiques doivent être de qualité analytique reconnue.

L'eau utilisée doit être de l'eau distillée dans le verre ou désionisée exempte de substances susceptibles d'influer sur la croissance des micro-organismes dans les conditions de l'essai :

— il convient de vérifier cet aspect périodiquement, particulièrement dans le cas de l'eau déminéralisée,

— il convient d'utiliser des solutions d'hydroxyde de sodium ou d'acide chlorhydrique (environ 0,1 mol/l) afin d'ajuster le pH des diluants, sauf indication contraire.

3.2 Diluant

Composition

Peptone 1 (hydrolysate tryptique de caséine)	0,5 g
Peptone 2 (hydrolysate tryptique de viande)	0,5 g
Eau	1000 ml

Préparation

Dissoudre les peptones dans l'eau. Répartir la solution par ml dans des flacons de 150 ml de capacité.
Stériliser à 121° C pendant 15 mn.

On peut employer des polypeptones qui sont des mélanges de peptone 1 et peptone 2.

3.3 Milieux de culture

3.3.1 Milieu MRS acidifié

Composition

Peptone 1	10 g
Extrait de viande	10 g
Extrait de levure déshydraté	5 g

Glucose (C ₆ H ₁₂ O ₆)	20 g
Tween 80 (sorbitane monoléate)	1 ml
Hydrogène-orthophosphate dipotassique (K ₂ HPO ₄)	2 g
Acétate de sodium, trihydraté (CH ₃ CO ₂ Na ₃ H ₂ O)	2 g
Citrate d'ammoniaque (C ₆ H ₆ O ₇ (NH ₄) ₂).....	2 g
Sulfate de magnésium heptahydraté (MnSO ₄ 7H ₂ O)	0,2 g
Sulfate de manganèse tétrahydraté (MnSO ₄ 4H ₂ O)	0,05 g
Agar-agar.....	9-18 g
Eau	1000 ml

Préparation

Dissoudre les composants dans l'eau en ébullition.

Laisser refroidir à 5 ° C et ajuster le pH à l'aide d'acide acétique (3.4.3) en contrôlant avec le pH-mètre (4.1.8) de sorte qu'après stérilisation il soit de 5,4 à 25° C.

Répartir le milieu par quantité de 100 ml dans des flacons de 150 ml ou par quantité de 200 ml dans des flacons de 250 ml. Stériliser à 121° C pendant 15 mn.

On peut également utiliser les milieux MRS prêts à l'emploi, dans ce cas, il faut les contrôler avec le milieu préparé d'après la présente méthode.

Avant de commencer l'examen bactériologique, faire fondre complètement la quantité nécessaire de milieu dans un bain-marie en ébullition ou en vapeur dans un récipient partiellement fermé. Refroidir le milieu fondu dans le bain-marie (4.1.7).

Pour contrôler la température de la gélose, il est recommandé de placer un thermomètre dans un même volume de solution de gélose à la même concentration que celle du milieu, contenue dans un récipient séparé, identique à celui utilisé pour le milieu. Cette solution servant au contrôle de la température doit être soumise aux mêmes conditions de chauffage et de refroidissement que le milieu proprement dit.

3.3.2 Milieu M17

3.3.2.1 Milieu de base

Composition

Peptone 1 (hydrolysate tryptique de caséine).....	2,50 g
Peptone 2 (hydrolysate pepsique de viande).....	2,50 g
Peptone 3 (hydrolysate papaénique de soja).....	5,00 g
Extrait de levure déshydratée.....	2,50 g
Extrait de viande.....	5,00 g

B-glycérophosphate (sel disodique) (C ₃ H ₇ O ₆ PNa ₂)	19,00 g
Sulfate de magnésium heptahydraté (MgSO ₄ 7H ₂ O)	0,25 g
Acide ascorbique (C ₆ H ₈ O ₆)	50 g
Agar-agar	9-18 g
Eau	950 ml

Préparation

Dissoudre les composants dans l'eau en ébullition. Laisser refroidir à 50 ° C et ajuster le pH à l'aide des réactifs (3.4) en contrôlant avec le pH-mètre (4.1.8), de sorte qu'après stérilisation, il soit de 7,1 à 7,2 à 25 ° C. Répartir le milieu par quantité de 95 ml dans des flacons de 150 ml. Stériliser à 121° C pendant 15mn.

On peut également utiliser des milieux complets M17 prêts à l'emploi qu'il convient de contrôler avec le milieu M17 préparé d'après la présente méthode.

3.3.2.2 Solution de lactose

Composition

Lactose (C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁)	10 g
Eau	100 ml

Préparation

Dissoudre le lactose dans l'eau, stériliser à 121 ° C pendant 15 mn.

3.3.2.3 Milieu complet

Composition

Milieu de base (3.3.2.1)	95 ml
Solution de lactose (3.3.2.2)	5 ml

Préparation

Immédiatement avant emploi, faire fondre le milieu de base (3.3.2.1) dans un bain-marie en ébullition et laisser refroidir à 48-50 ° C. Chauffer la solution de lactose (3.3.2.2) à 48-50° C.

Ajouter la solution de lactose au milieu de base et mélanger soigneusement par des mouvements rotatifs. Refroidir le milieu dans le bain-marie (4.1.7).

3.4 Réactifs pour ajuster le pH

3.4.1 Hydroxyde de sodium (NaOH), solution environ 0,1 mol/l.

3.4.2 Acide chlorhydrique (HCl), solution environ (0,1 mol/l).

3.4.3 Acide acétique (CH₃COOH), 100% (glacial).

4e/ Appareillage et verrerie

4.1 Le matériel de laboratoire microbiologique courant, matériel requis pour la préparation des échantillons et des dilutions.

4.1.1 Incubateur 37 ± 1°C.

4.1.2 Incubateur anaérobie, pouvant être réglé à 37 ± 1° C, ou récipients de culture anaérobie, fournissant une atmosphère de 90% d'azote et 10% de dioxyde de carbone.

4.1.3 Mélangeur, soit de type péristaltique avec récipients stériles en plastique, soit de type rotatif, pouvant fonctionner à une vitesse minimale de rotation de 20000 mn avec récipients en verre ou en métal de capacité appropriée.

4.1.4 Agitateur de tubes à essais (par exemple, agitateur vortex).

4.1.5 Matériel de comptage de colonies, comportant un système d'éclairage avec fond noir, muni d'une loupe grossissant 1,5 fois et d'un compteur numérique mécanique ou électronique.

4.1.6 Loupe grossissement 8-10 fois.

4.1.7 Bain-marie pouvant être réglé à 45 ± 1° C.

4.1.8 PH-mètre, avec compensation de température, d'une précision de ± 0,1 unité de pH à 25° C.

4.1.9 Fioles de dilution, de capacité de 150 - 250 ml et tubes à essais de 18 mm x 180 mm, munis de dispositifs de fermeture appropriés, capsules ou bouchons en caoutchouc ou en matière synthétique.

4.1.10 Pipettes graduées jusqu'à la pointe, pouvant délivrer 1 ml ± 0,02 ml ou 10 ml ± 0,2 ml ou 11 ml ± 0,2 ml.

4.1.11 Boîtes de Pétri à fond de diamètre intérieur d'environ 90 mm. La profondeur intérieure doit être de 10 mm minimum.

Le fond ne doit présenter aucune irrégularité susceptible d'influer sur le dénombrement des colonies.

4.1.12 Spatules en verre ou en métal.

5e/ Echantillonnage

L'échantillonnage se fait dans des conditions appropriées.

6e/ Mode opératoire

6.1 Préparation de l'échantillon et de la prise d'essai

Avant d'ouvrir le pot de yaourt, et afin d'éliminer toute source de contamination, prendre soin de nettoyer soigneusement la surface extérieure du récipient autour de la zone d'où sera prélevé l'échantillon. Le nettoyage peut être effectué avec de l'éthanol à 70% (VIV), afin d'éviter toute contamination supplémentaire. Ouvrir le pot aseptiquement.

Pendant cette étape, il est important d'obtenir non seulement une dilution homogène, mais aussi une fragmentation des chaînes de streptocoques et de lactobacilles en cellules isolées ou en chaînes courtes, de sorte que les résultats, exprimés en nombre total de micro-organismes vivants par gramme de produit soient reproductibles et représentatifs.

6.1.1 Yaourts sans fruits

Mélanger avec soin le contenu du pot de yaourt à l'aide d'une spatule stérile (4.1.12). Peser 10 ± 0,1 g de l'échantillon de yaourt dans un récipient approprié (par exemple un tube de centrifugeuse de 200 ml à fond rond en verre renforcé, ou le bol du mélangeur, ou encore le récipient en plastique du mélangeur péristaltique (4.1.3).

6.1.2 Yaourts aux fruits

Mélanger le contenu total du pot de yaourt pendant 1 minute à l'aide du mélangeur (4.1.3).

Peser $10 \pm 0,1$ g de l'échantillon de yaourt, comme, 6.1.1.

6.2 Examen microscopique

Effectuer un examen préliminaire de plusieurs champs microscopiques d'un frottis de l'échantillon de yaourt, préalablement coloré au bleu de méthylène (par exemple à l'aide d'une solution éthanolique de bleu de méthylène de 6 g/l) afin d'apprécier la densité des deux types de bactéries, coques et bâtonnets, et choisir ainsi la gamme appropriée de dilutions à utiliser pour le dénombrement de chaque type.

6.3 Préparation de la première dilution

Les opérations décrites aux paragraphes 6.3 à 6.5.4 ne doivent pas être réalisées à la lumière directe du soleil

Ajouter le diluant (3.2) à la prise d'essai (6.1.1) jusqu'à ce que la masse de la prise d'essai et du diluant soit de 50 g. Mélanger pendant 1 minute à l'aide du mélangeur (4.1.3). Compléter à 100 g avec le même diluant. Une dilution 10^{-1} est ainsi obtenue.

6.4 Préparation des dilutions décimales

Répartir le diluant (3.2) à l'aide d'une pipette graduée stérile. Transférer 1 ml de cette dilution dans un deuxième tube, etc.... en s'assurant qu'une nouvelle pipette est utilisée pour chaque dilution, jusqu'à ce que la série de dilutions nécessaires soit obtenue.

Ne pas plonger la pipette plus de 1 cm au-dessous de la surface du liquide. Eviter les bulles d'air en remplissant la pipette. Pendant le transfert ne pas plonger la pipette dans le nouveau diluant.

6.5 Ensemencement et incubation

6.5.1 En opérant en double (pour *L. buigaricus* et *S. thermophilus*), transférer à l'aide d'une pipette stérile 1 ml de chaque dilution dans les boîtes de Pétri (4.1.11).

6.5.2 Pour *L. bulgaricus*, verser 12 à 15 ml du milieu MRS acidifié (3.3.1) fondu et maintenu à $45 \pm 1^\circ \text{C}$ dans un bain-marie (4.1.7), dans chaque boîte de Pétri.

Le temps qui s'écoule entre l'ensemencement des dilutions et le remplissage des boîtes de Pétri avec la gélose ne doit pas être supérieur à 15 minutes (6.5.2 et 6.5.3).

6.5.3 Pour *S. thermophilus*, filtrer 12 - 15 ml du milieu M17 (3.3.2), fondu et maintenu à 45°C (4.1.7) dans chaque boîte de Pétri.

6.5.4 Immédiatement après l'avoir versé dans les boîtes, mélanger soigneusement l'inoculum avec le milieu par rotation des boîtes. Laisser le mélange se solidifier en laissant les boîtes sur une surface fraîche et horizontale.

6.5.5 Incuber les boîtes de Pétri retournées. Ne pas empiler plus de 6 boîtes. Les piles de boîtes ne doivent pas se toucher ni être en contact avec les parois ou la partie supérieure de l'incubateur.

6.5.5.1 Incuber les boîtes pour le dénombrement de *L. bulgaricus* pendant 72 h à 37°C dans l'incubateur anaérobie ou le récipient de culture en anaérobiose (4.1.2).

6.5.5.2 Incuber les boîtes pour le dénombrement de *S. thermophilus* pendant 48 h à $37 \pm 1^\circ \text{C}$.

6.6 Comptage des colonies

A l'issue de la période d'incubation spécifiée (6.5.5.1) et (6.5.5.2), compter les colonies montrant les caractéristiques de chacun des 2 micro-organismes (1.1 et 1.2) sur les boîtes contenant entre 10 et 300 colonies. Examiner les boîtes en lumière tamisée. Pour faciliter le comptage, on peut utiliser un compteur approprié (4.1.5). Eviter de confondre des particules non dissoutes d'échantillon ou des matières précipitées avec des colonies de la taille d'une pointe d'épingle. Examiner les colonies douteuses avec soin, à l'aide d'une loupe de grossissement plus fort si nécessaire, afin de distinguer les colonies des particules étrangères. Procéder à des dilutions dans le cas où le nombre de colonies dépasse 300.

6.7 Confirmation

Sélectionner des colonies à partir des boîtes utilisées pour le dénombrement de telle façon que le nombre retenu soit égal à la racine carrée du nombre total de colonies.

Réaliser une coloration de Gram sur ces colonies et confirmer qu'elles se présentent sous forme de bâtonnets non sporulés, Gram positif, catalase-négative dans les cas des cultures sur milieu MRS, et qu'elles forment des chaînes de coques ou de diplocoques Gram-positif, catalase-négative, dans le cas des cultures sur milieu M17.

7°/ Expression des résultats

7.1 Méthode de calcul

7.1.1 Retenir les dénombrements de boîtes contenant entre 10 et 300 colonies, obtenues en 6.6.

7.1.2 Pour chaque micro-organisme caractéristique, le nombre de micro-organismes par gramme d'échantillon est égal à :

$$\frac{\sum C}{(n_1 + 0,1 + n_2) d}$$

$\sum C$ est la somme des colonies comptées sur les boîtes en 7.1.1 ;

n_1 est le nombre de boîtes comptées à la dilution la plus faible ;

n_2 est le nombre de boîtes comptées à la dilution la plus élevée ;

d est la valeur correspondant à la dilution à partir de laquelle les premiers dénombrements ont été retenus.

S'il y a plus de deux dilutions à compter, la formule doit être modifiée pour prendre en compte la dilution suivante :

Ainsi pour trois dilutions :

$$\frac{\sum C}{(n_1 + 0,1n_2 + 0,01) d}$$

7.1.3 Arrondir les résultats obtenus en 7.1.2 à deux chiffres significatifs. Pour un nombre de 3 chiffres, arrondir le 3ème chiffre au zéro le plus proche. Si le 3ème chiffre est 5, arrondir au chiffre inférieur dans le cas où les 2 premiers chiffres forment un nombre pair, et au chiffre supérieur dans le cas où les 2 premiers chiffres forment un nombre impair.

par exemple :

pour 234 arrondir à 230

235 240

225 220

245 240

7.1.4 Si tous les dénombrements sont inférieurs à 10, indiquer que le nombre de micro-organismes par gramme est inférieur à $10 \times 1/d$, "d" étant la valeur correspondant à la dilution la plus faible.

7.1.5 Si tous les dénombrements sont supérieurs à 300, calculer un nombre estimé à partir des boîtes ayant un nombre de colonies le plus proche de 300 et le multiplier par l'inverse de la valeur correspondant à la dilution la plus élevée. Donner le résultat sous la forme : "Nombre estimé de micro-organismes par gramme" dans le cas le plus faible.

7.1.6 Le résultat est exprimé par un nombre compris entre 1,0 et 9,9 multiplié par 10^x , x étant la puissance appropriée de 10.

7.1.7 Le nombre total de micro-organismes caractéristiques par gramme de yaourt est égal à :

$$N_L + N_S$$

où :

N_L : est le nombre de *L. bulgaricus* par gramme, calculé selon 7.1.2.

N_S : est le nombre de *S. thermophilus* par gramme, calculé selon 7.1.2.

7.2 Exemple de calcul

Pour un échantillon donné de yaourt, les numérations de *L. bulgaricus* donnent le résultat suivant (2 boîtes de Pétri par dilution, ont été incubées).

Dilution 10^5 : 295 et 245 colonies ;

10^{-6} : 33 et 40 colonies ;

$$\frac{\sum C}{(n_1 + 0,1 n_2) d} = \frac{295 + 245 + 33 + 40}{(2 + 0,1 \times 2) 10^{-5}} = \frac{613}{2,2 \times 10^{-5}} = 278,6 \times 10^{-5}$$

Selon 7.1.3 cela correspondant à 280×10^5

Le nombre estimé de *L.bulgaricus* présents dans l'échantillon de yaourt est donc $2,8 \times 10^7/g$.

De même pour *S.thermophilus*, le nombre estimé est de $4,9 \times 10^8/g$ de yaourt.

Ainsi le nombre total de micro-organismes caractéristiques par gramme de yaourt est égal à :

$$(2,80 \times 10^7) + (4,90 \times 10^8) = 5,18 \times 10^8$$

qui, arrondi selon 7.1.3, donne :

$$5,20 \times 10^8 /g \text{ de yaourt.}$$

7.3 Précision

L'expérience montre que si sur deux essais indépendants, réalisés sur le même échantillon, celui donnant les résultats les plus élevés dépasse fréquemment de 30% celui donnant les résultats les plus faibles, l'analyste devra revoir ses conditions opératoires pour déterminer les sources d'erreurs.

8°/ Notes sur le mode opératoire

Sélectivité des milieux de culture

— Aucun des deux milieux de culture recommandés (MRS acidifié et M17) n'est entièrement sélectif. La plupart des souches de *S.thermophilus* ne forment pas de colonies visibles sur milieu MRS acidifié aux dilutions normalement utilisées pour le dénombrement de *L. bulgaricus*. Toutefois, lorsque le nombre de lactobacilles dans l'échantillon de yaourt est considérablement plus faible que le nombre de streptocoques des dilutions faibles doivent être réalisées pour le dénombrement de *L.bulgaricus*.

— Dans ces conditions, quelques *S.thermophilus* peuvent former de très petites colonies ou des colonies de la taille d'une pointe d'épingle sur les boîtes de milieu MRS acidifié; ces colonies sont faciles à distinguer à l'œil nu des colonies de *L.bulgaricus* qui sont de taille plus grande.

— Par ailleurs, la plupart des souches de *L. bulgaricus* ne forment pas de colonies visibles sur le milieu M17 aux dilutions normalement utilisées pour le dénombrement de *S.thermophilus*.

— Des souches de *L.bulgaricus* peuvent cependant former de petites colonies de la taille d'une pointe d'épingle sur le milieu M17, généralement avec des échantillons de yaourt ayant un nombre beaucoup plus élevé de lactobacilles que de streptocoques.

— Ces petites colonies rugueuses ont généralement un aspect laineux ou cotonneux et peuvent facilement être distinguées à l'œil nu (et encore mieux à la loupe) des colonies lisses et lenticulaires de *S.thermophilus* qui sont plus grandes.