

ARRETES, DECISIONS ET AVIS

MINISTERE DU COMMERCE

Arrêté du 26 Rajab 1425 correspondant au 11 septembre 2004 rendant obligatoire une méthode de préparation des échantillons pour essai et dilutions en vue de l'examen microbiologique.

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 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, 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 préparation des échantillons pour essai et dilutions en vue de l'examen microbiologique.

Art. 2. — Pour la préparation des échantillons pour l'essai et les dilutions en vue de l'examen microbiologique, les laboratoires du contrôle de la qualité et de la répression des fraudes et les laboratoires agréés à cet effet doivent employer la méthode 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 26 Rajab 1425 correspondant au 11 septembre 2004.

Noureddine BOUKROUH.

ANNEXE

METHODE DE PREPARATION DES ECHANTILLONS POUR ESSAI ET DILUTIONS EN VUE DE L'EXAMEN MICROBIOLOGIQUE

1. Définition

Pour les besoins de la présente méthode, les définitions suivantes s'appliquent.

1.1 Dilution primaire (suspension mère) Suspension, solution ou émulsion obtenue après qu'une quantité pesée ou mesurée du produit à analyser (ou de l'échantillon pour essai préparé à partir de ce produit) ait été mélangée, si nécessaire en utilisant un homogénéisateur et en observant des précautions appropriées (6), avec neuf fois la même quantité de diluant (3), en laissant les grosses particules se déposer, si elles existent.

Il peut être nécessaire dans certains cas notamment pour les produits donnant une suspension mère 1 + 9 visqueuse ou trop épaisse, d'ajouter davantage de diluant. Dans d'autres cas, pour les résultats d'essai en rapport avec certains critères de spécification, une dilution primaire plus concentrée que 1 + 9 peut être demandée. Il devra être tenu compte de ce facteur dans la suite des opérations et/ou dans l'expression des résultats.

1.2 Dilutions décimales suivantes : Suspensions, émulsions ou solutions obtenues en mélangeant un volume déterminé de la dilution primaire (1.1), avec neuf fois le même volume de diluant approprié et en répétant cette opération sur chaque dilution ainsi préparée jusqu'à obtention d'une gamme de dilutions décimales appropriée pour l'ensemencement des milieux de culture.

2. Principe

Préparation de la dilution primaire (suspension mère) (1.1) et, si nécessaire, des dilutions décimales suivantes (1.2) en vue de réduire le nombre de micro-organismes par unité de volume, pour faciliter l'examen microbiologique.

3. Diluants

3.1 Composants de base

Pour améliorer la fidélité des résultats, il est recommandé d'utiliser, pour la préparation du diluant, des composants de base déshydratés ou une préparation complète déshydratée. Les prescriptions techniques doivent être suivies scrupuleusement.

Les produits chimiques doivent être de qualité analytique reconnue.

L'eau utilisée doit être de l'eau distillée avec un appareillage en verre, ou de l'eau déminéralisée. Elle doit être exempte de substances susceptibles d'inhiber la croissance des micro-organismes dans les conditions de l'essai. Ceci doit être contrôlé périodiquement en particulier dans le cas de l'eau déminéralisée.

Des solutions d'hydroxyde de sodium ou d'acide chlorhydrique (à 0,1 mol/l environ) doivent être utilisées pour ajuster le pH des diluants, sauf spécifications contraires.

3.2 Diluants pour emploi général

3.2.1 Solution peptone - sel

Composition

Peptone.....	1,0 g
Chlorure de sodium (NaCl).....	8,5 g
Eau.....	1000 ml

Préparation

Dissoudre les composants dans l'eau, en chauffant, si nécessaire.

Ajuster le pH de sorte qu'après stérilisation, il soit de $7,0 \pm 0,1$ à 25°C.

3.2.2 Solution de Ringer diluée au quart

Composition

Chlorure de sodium (NaCl).....	2,25 g
Chlorure de potassium (KCl).....	0,105 g
Chlorure de calcium anhydre (CaCl ₂).....	0,06 g
Hydrogénocarbonate de sodium (NaHCO ₃).....	0,05 g
Eau.....	1000 ml

Préparation

Dissoudre les sels dans l'eau.

Ajuster le pH de sorte qu'après stérilisation, il soit de $6,9 \pm 0,1$ à 25°C.

3.2.3 Solution de peptone

Composition

Peptone.....	1,0 g
Eau.....	1000 ml

Préparation

Dissoudre la peptone dans l'eau.

Ajuster le pH de sorte qu'après stérilisation, il soit $7,0 \pm 0,1$ à 25°C.

3.2.4 Solution tampon de phosphate

Composition de la solution mère

Dihydrogénophosphate de potassium (KH ₂ PO ₄).....	42,5 g
Eau.....	1000 ml

Préparation

Dissoudre le sel dans 500 ml d'eau. Ajuster le pH de sorte qu'après stérilisation, il soit de $7,2 \pm 0,1$ à 25 °C, à l'aide d'une solution d'hydroxyde de sodium ou d'acide chlorhydrique à 1 mol/l.

Diluer à 1000 ml avec de l'eau. Conserver cette solution mère au réfrigérateur.

Avant emploi, ajouter 1 ml de cette solution mère (à 20°C) à 1000 ml d'eau pour l'utiliser en tant que diluant.

3.3 Diluants pour emplois particuliers

3.3.1 Solution de citrate de sodium (pour fromage, fromage fondu et lait sec Hatmaker)

Composition

Citrate trisodique dihydraté (Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇ ·2H ₂ O).....	20,0 g
Eau.....	1000 ml

Préparation

Dissoudre le sel dans l'eau en chauffant entre 45 °C et 50°C.

Ajuster le pH de sorte qu'après stérilisation, il soit de $7,5 \pm 0,1$ à 25°C.

3.3.2 Solution de monohydrogéo-phosphate de potassium (pour le fromage, le fromage fondu, la caséine acide, les poudres de caséine lactique, les caséinates, les poudres de lactosérum acides et les acides et la crème aigre).

Composition

Monohydrogéo-phosphate de potassium K ₂ HPO ₄	20,0 g
Eau.....	1000 ml

Préparation

Dissoudre le sel dans l'eau en chauffant entre 45 °C et 50°C.

Ajuster le pH. Pour la dilution primaire de la caséine acide, de la caséine lactique et de la poudre de lactosérum acide, le pH après stérilisation doit être de $8,4 \pm 0,1$ à 25°C. Pour les caséinates, les fromages, les fromages fondus et la crème aigre, il doit être de $7,5 \pm 0,1$.

3.4 Répartition, stérilisation et conservation du diluant

Répartir le diluant (3.2 ou 3.3) dans des fioles (4.4) pour la dilution primaire et dans des tubes à essai (4.5) pour les dilutions décimales (3.2) en quantités telles qu'après stérilisation, chaque fiole (4.4) contienne 9,0 ml (ou d'autres quantités demandées) et chaque tube à essai (4.5) contienne 9,0 ml de diluant ou un multiple de 9,0 ml (ou autres quantités demandées).

Boucher les tubes et les fioles.

Stériliser à l'autoclave à 121 °C±1 pendant 15 minutes (un temps plus long peut être nécessaire pour des volumes plus importants).

Si le diluant n'est pas utilisé extemporanément le conserver à l'obscurité entre 0 °C et 5 °C, pendant 1 mois au maximum dans des conditions évitant toute modification de son volume ou de sa composition.

Si l'on doit dénombrer plusieurs groupes de micro-organismes en utilisant des milieux de cultures différents, il peut-être nécessaire de répartir tous les diluants (ou quelques-uns) en quantité supérieure à 9,0 ml. La dimension des tubes à essai et des fioles (4.5 et 4.4) doit être prévue en conséquence.

4. APPAREILLAGE ET VERRERIE

Le matériel à usage unique est acceptable au même titre que la verrerie réutilisable, si ses spécifications sont similaires. La verrerie doit pouvoir résister à des stérilisations répétées et être chimiquement inerte.

Matériel courant de laboratoire de microbiologie, notamment :

4.1 **Appareils pour la stérilisation en chaleur sèche** (four) ou en chaleur humide (autoclave) (autoclave isolé ou intégré dans un système de préparation et de répartition de milieux).

Le matériel destiné à entrer en contact avec le diluant, l'échantillon pour essai, les dilutions, sauf s'il est livré stérile (appareillage en plastique) doit être stérilisé.

a) soit au four, en le maintenant à une température de 170°C à 175°C pendant au moins 1 heure.

b) soit à l'autoclave, en le maintenant à une température de 121°C ± 1 pendant au moins 20 minutes.

Cependant, les pipettes ne doivent pas être stérilisées à l'autoclave, car l'humidité se condense sur les parois internes lors du refroidissement et affecte la précision du volume délivré.

4.2 Appareillage pour l'homogénéisation

Un des appareils suivants doit être utilisé :

a) homogénéisateur rotatif, dont la fréquence de rotation est comprise entre 8000 min⁻¹ et 45000 min⁻¹, avec bols en verre ou en métal, muni de préférence de couvercles, et résistant aux conditions de stérilisation ;

b) homogénéisateur de type péristaltique (stomacher), avec des sacs stériles en matière plastique.

Les bols, les sacs en plastique (type sac stomacher) doivent avoir une capacité suffisante pour permettre de mélanger correctement l'échantillon avec la quantité appropriée de diluant. En général, le volume du récipient doit être égal à environ deux fois le volume de l'échantillon pour l'essai avec le diluant.

4.3 **Agitateur**, capable de mélanger 1 ml ou 2 ml de l'échantillon pour essai (cas des produits liquides) ou des dilutions décimales dans un tube de dimensions suffisantes, avec 9 ml ou 18 ml de diluant, afin d'obtenir une suspension homogène et dont le principe est basé sur un mouvement de rotation excentré du contenu des tubes à essai (par exemple, agitateur Vortex).

4.4 **Fioles**, ayant une capacité suffisante pour contenir en laissant un espace libre suffisant pour permettre l'agitation 90 ml de diluant utilisé pour la suspension mère, ou des multiples de 90 ml.

4.5 **Tubes à essai**, ayant une capacité suffisante pour contenir, en laissant un espace libre suffisant pour permettre l'agitation, 10 ml (ou un multiple de 10 ml, si nécessaire) de l'échantillon pour essai (s'il est liquide) ou de la dilution primaire (autres cas), ou des dilutions décimales suivantes.

4.6 **Pipettes** (bouchées avec du coton), ayant une capacité nominale de 1 ml et une ouverture d'écoulement de 1,75 mm à 3 mm de diamètre.

N'utiliser que des pipettes non ébréchées et, quand cela est nécessaire, avec des graduations bien marquées pour les distinguer nettement du contenu.

4.7 **Pipettes graduées** (bouchées avec du coton), de relativement grande capacité, par exemple de 10 ml ou 20 ml.

4.8 **Billes de verre**, d'environ 6 mm de diamètre.

4.9 **pH-mètre**, à compensation de température, précis à 0,1 unité de pH.

4.10 **Balance**, de portée suffisante et précise à 1 % de la masse nette pesée.

4.11 Bain d'eau, réglable à 45 °C ± 1.

4.12 Bain d'eau, réglable à 37 °C ± 1.

5. ECHANTILLONNAGE

L'échantillonnage se fait dans des conditions appropriées.

6. MODE OPERATOIRE

Pour certaines recherches spécifiques (par exemple, Salmonella), des techniques spéciales ou des précautions peuvent être nécessaires. Pour ces cas des techniques particulières sont mentionnées dans la méthode en question.

Les opérations décrites en 6.1.1 et 6.1.2 ne doivent pas être effectuées à la lumière directe du soleil.

Il convient de prendre les précautions normales d'asepsie.

6.1 Préparation de l'échantillon pour essai et de la dilution primaire

Pour éviter d'endommager les micro-organismes par de brusques changements de température, la température du diluant, pendant les opérations décrites ci-dessous, doit être du même ordre que celle de l'échantillon pour essai, sauf spécifications contraires.

6.1.1 Lait et produits laitiers liquides

Agiter vigoureusement l'échantillon pour essai afin d'assurer une répartition aussi uniforme que possible des micro-organismes, en inversant rapidement 25 fois le récipient contenant l'échantillon. Il faut éviter la formation de mousse ou bien la laisser se disperser. L'intervalle entre le mélange et le prélèvement de la prise d'essai ne doit pas dépasser 3 minutes.

Prélever 1 ml de l'échantillon pour essai à l'aide d'une pipette stérile (4.6) et rajouter à 9 ml de diluant (3.2) (ou 10 ml d'échantillon pour essai à 90 ml de diluant ou 11 ml à 99 ml).

Agiter cette dilution primaire (par exemple, 25 fois avec un mouvement de 300 mm en 7 secondes). On obtient alors la dilution 10-1.

Préparer les dilutions suivantes selon 6.2.

6.1.2 Lait sec, poudre de lactosérum, babeurre en poudre et lactose

Mélanger soigneusement le contenu du récipient fermé en le secouant de façon répétée par inversion.

Si l'échantillon pour essai enfermé dans son emballage d'origine est trop plein pour permettre un mélange vigoureux, le transférer dans un récipient plus grand. Mélanger. Ouvrir le récipient, prélever la prise d'essai demandée à l'aide d'une spatule en procédant comme indiqué ci-dessous.

Refermer immédiatement le récipient.

Chauffer au bain d'eau (4.11) une fiole contenant 90 ml d'un diluant adéquat (3.2) ou, si nécessaire, pour la poudre de lait Hatmaker (3.3.1) à un pH $7,5 \pm 0,1$ à $45^{\circ}\text{C} \pm 1$.

Peser 10 g de d'échantillon pour essai dans un récipient de verre approprié (par exemple, un bécher) et verser lentement la poudre dans la fiole de dilution contenant le diluant choisi. Sinon, peser 10 g de l'échantillon pour essai directement dans la fiole avec le diluant.

Afin de dissoudre, tourner lentement pour hydrater la poudre, puis agiter 25 fois la fiole pendant environ 10 secondes avec un mouvement d'environ 300 mm. On peut utiliser un homogénéisateur de type péristaltique (4.2 b) comme autre moyen d'agitation.

Replacer la fiole dans le bain d'eau pendant 5 minutes agiter occasionnellement.

Préparer les dilutions suivantes selon 6.2.

Dans le but d'avoir une meilleure reconstitution, en particulier pour la poudre de lait hatmaker, il peut être utile de se servir de billes de verre (4.8). Dans ce cas, il conviendra de les mettre dans les fioles avant stérilisation.

6.1.3 Fromage et fromage fondu

Soit peser 10 g de l'échantillon pour essai dans une capsule et les placer dans le récipient de l'homogénéisateur rotatif (4.2 a) ou de l'homogénéisateur de type péristaltique (4.2 b), soit peser directement 10 g d'échantillon pour essai dans le récipient.

Lors de l'utilisation de l'homogénéisateur rotatif ou de l'homogénéisateur de type péristaltique, ajouter 90 ml de diluant (3.2), (3.3.1) ou (3.3.2) à pH $7,5 \pm 0,1$.

Mélanger jusqu'à ce que le produit soit complètement dispersé (1 minute à 3 minutes). Dans le cas de l'homogénéisateur rotatif, opérer pendant un temps suffisant pour obtenir un total de 15 000 révolutions à 20 000 révolutions.

Même avec l'homogénéisateur rotatif le plus lent, ce temps ne doit pas excéder 2,5 minutes. L' idéal est que la température de dispersion ne dépasse pas 40°C , et en aucun cas elle ne doit être supérieure à 45°C . Laisser la mousse se disperser.

Préparer les dilutions suivantes selon 6.2.

6.1.4 Caséine acide, caséine lactique et poudre acide de lactosérum

Peser 10 g d'échantillon pour essai dans une capsule.

Les placer dans une fiole de dilution munie de billes de verre (4.8) contenant 90 ml de diluant d'hydrogénophosphate dipotassique (3.3.2) à pH $8,4 \pm 0,1$ pour les caséines acide et lactique.

Laisser pendant 15 minutes à température ambiante, puis élever la température à $37^{\circ}\text{C} \pm 1$ au bain d'eau (4.12).

Garder les fioles à 37°C pendant 15 minutes et secouer vigoureusement par intervalles.

Eviter l'emploi d'un homogénéisateur rotatif (4.2 a) ou d'un homogénéisateur de type péristaltique (4.2 b) à cause de la formation de mousse.

Préparer les dilutions suivantes selon 6.2.

6.1.5 Caséinates

Soit peser 10 g d'échantillon pour essai dans une capsule et les placer dans le récipient de l'homogénéisateur rotatif (4.2a) ou de l'homogénéisateur de type péristaltique (4.2b), soit peser 10 g d'échantillon pour essai directement dans le récipient. Ajouter 90 ml de diluant d'hydrogénophosphate dipotassique (3.3.2) à pH $7,5 \pm 0,1$ à température ambiante.

Mélanger pendant environ 2 minutes. Dans le cas de l'homogénéisateur rotatif, opérer pendant un temps suffisant pour obtenir un total de 15000 révolutions à 20000 révolutions. Même avec l'homogénéisateur rotatif le plus lent, ce temps ne doit pas excéder 2,5 minutes.

Elever la température à $37^{\circ}\text{C} \pm 1$ au bain d'eau (4.12).

Transférer dans une fiole à dilution stérile, dans le cas de l'homogénéisateur rotatif.

Garder à $37^{\circ}\text{C} \pm 1$ pendant 15 minutes.

Laisser la mousse se disperser avant de poursuivre.

Préparer les dilutions suivantes selon 6.2.