

**Arrêté du 13 Dhou El Hidja 1425 correspondant au 23 janvier 2005 rendant obligatoire une méthode d'analyse microbiologique du beurre.**

Le ministre du commerce ;

Vu le décret présidentiel n° 04-138 du 6 Rabie El Aouel 1425 correspondant au 26 avril 2004 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 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 ;

Vu l'arrêté du 21 Chaâbane 1419 correspondant au 10 décembre 1998 relatif aux spécifications techniques des beurres et modalités de leur mise à la consommation ;

**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 d'analyse microbiologique du beurre.

Art. 2. — Pour l'analyse microbiologique du beurre, 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 13 Dhou El Hidja 1425 correspondant au 23 janvier 2005.

Noureddine BOUKROUH.

ANNEXE

**Méthode d'analyse microbiologique du beurre**

**1- Echantillonnage**

Le contrôle doit porter sur 5 préemballages issus d'un lot de même fabrication.

Selon la masse conditionnée dans un préemballage, le prélèvement sera constitué de la manière suivante :

- Poids unitaire inférieur à 1 kg : 5 préemballages intacts de 125 g à 250 g.

- Poids unitaire supérieur à 1 kg : à partir de 5 préemballages, prélever chacun 5 morceaux de 200 g environ. Le prélèvement sera réalisé au moyen d'une sonde à beurre. Ou prélever d'une manière aseptique par préemballage, 1 morceau de 300 g à 400 g de produit de forme pyramidale.

Ce nombre de préemballages à examiner concerne les beurres et les corps gras à base de matière grasse butyrique.

Pour le beurre concentré, le contrôle sera effectué sur un échantillon représentatif de l'unité de fabrication, le prélèvement sera pratiqué selon les modes décrits.

Les prélèvements seront transportés et conservés jusqu'au moment de l'analyse à une température positive n'excédant pas + 6° C.

**2- Préparation de l'échantillon pour essai**

**2.1 Unité préemballée :**

Développer soigneusement le papier d'emballage et d'une manière aseptique sans éliminer la couche superficielle, transférer 50 g de produit dans un godet de centrifugation à capsule vissée stérile.

**2.2 Prélèvement opéré par sonde à beurre**

Transférer d'une manière aseptique 50 g de produit dans le godet de centrifugation.

**2.3 Prélèvement sous forme d'une masse pyramidale**

A l'aide d'un couteau nettoyé à l'alcool et flambé, enlever la couche superficielle sur 1cm environ d'épaisseur et introduire aseptiquement 50 g de produit dans le godet de centrifugation.

Conservation au réfrigérateur entre 0 °C et + 5 °C, jusqu'au moment de la préparation de la phase aqueuse.

**3 - Préparation de la phase aqueuse, dilution primaire**

**3.1 Beurre cru et beurre pasteurisé :**

Dans le godet de centrifugation contenant 50 g de beurre, transférer 42 ml de solution à 2% de phosphate dipotassique, pH 7,5 ± 0,1 stérile (4).

Faire fondre dans un bain-marie n'excédant pas 45° C.

Dès la fusion du beurre, centrifuger à 1000-2000 t/min. pendant 1 à 2 minutes. Disposer le godet sur un portoir.

Éliminer la matière grasse par aspiration, pour cela utiliser une pipette courte ou un embout en matière synthétique stérile fixée à l'extrémité d'un tube de caoutchouc relié à un ballon à deux tubulures communiquant à une fiole à vide (piège), elle-même reliée à une trompe à eau.

Changer de pipette ou d'embout entre chaque échantillon. Effectuer l'analyse bactériologique sans tarder.

**3.2 Corps gras à base de matière grasse butyrique :**

Le mode de préparation de la dilution primaire est semblable à celui décrit en (3.1); toutefois, la quantité de solution à 2% de phosphate dipotassique à pH 7,5 ± 0,1 sera calculée selon la teneur en lipides du produit, par exemple :

— Produit dont la teneur en lipides est comprise entre 38 g % et 41 g % utiliser 20 ml de diluant.

— Produit dont la teneur en lipides est supérieure ou inférieure à 38 g % et 41 g % : pour 50 g de produit, utiliser un volume de diluant égal à la moitié de la quantité des lipides présents dans 100 g de produit.

### 3.3 Beurre concentré

Le mode de préparation de la dilution primaire est semblable à celui décrit en (3.1). mais utiliser comme diluant la solution de tryptone-sel (se reporter à 4) à raison de 50 ml.

En se basant sur la composition type de chaque produit, admettre de manière conventionnelle que 1 ml de la phase aqueuse, dilution primaire, représente 1 g. de produit.

## 4 - Diluants et préparation des dilutions décimales

### 4.1 Diluants

Deux diluants sont utilisés, pour des raisons pratiques, distribuer les diluants, solution à 2% de phosphate dipotassique pH 7,5 ± 0,1 et solution de tryptone sel (ou solution de Ringer) de telle sorte qu'après stérilisation, le volume soit de 50 ml.

### 4.2 Dilutions décimales

Au moment de l'emploi, distribuer la solution de tryptone-sel (ou solution de Ringer) à raison de 9 ml dans des tubes de 20 mm x 200 mm stériles.

Mélanger convenablement la dilution primaire par aspiration et refoulement une dizaine de fois à l'aide d'une pipette de 1 ml stérile, puis introduire 1 ml dans un tube contenant 9 ml de solution de tryptone-sel stérile afin d'obtenir une dilution au 1/10.

Mélanger soigneusement pendant 5 à 10 secondes au moyen d'un agitateur à mouvement de rotation excentré.

De manière identique, préparer une dilution au 1/100 et une dilution au 1/1000.

## 5 - Expression des résultats

Afin que les résultats de l'analyse bactériologique puissent permettre une évaluation significative de la qualité hygiénique des fabrications de beurres crus, beurres pasteurisés, corps gras à base de matière grasse butyrique et beurres concentrés, il y a lieu de se conformer au protocole décrit afin de restreindre à un minimum les divergences d'ordre technique.

— **Durée de l'examen bactériologique** : le temps qui s'écoule entre la fin de la préparation de la dilution primaire et celui du mélange des dilutions avec le milieu de culture ne doit pas excéder 15 minutes.

— **Température d'incubation et refroidissement des milieux** : tous les appareils utilisés, étuves, bains-marie, doivent être vérifiés périodiquement (au moins deux fois par mois).

— **Lecture des résultats** : selon les indications données. Cependant, lorsque les résultats ne peuvent être exprimés correctement, recommencer l'analyse en examinant une gamme plus étendue de dilutions. Si l'examen se situe au-delà des délais de consommation (limite ou optimale), le mentionner sur le bulletin d'analyse.

— **Qualité des milieux de culture** : d'une manière générale, il est recommandé d'utiliser des milieux complets déshydratés.

## 5.1 Micro-organismes aérobies à 30 ° C dits de contamination

Ce dénombrement est appliqué aux beurres pasteurisés et concerne les micro-organismes provenant de contaminations diverses qui peuvent se produire au cours de la fabrication du beurre. La flore lactique qui a pu êtreensemencée dans la crème selon la technologie employée, doit être exclue de ce dénombrement.

### 5.1.1 Milieu utilisé

#### Composition :

Gelysate.....	7,5 g
Trypticase ou Tryptone .....	7,5 g
Chlorure de sodium.....	5 g
Gélose (exempte d'hydrates de carbone).....	4 g
Eau distillée.....	1000 ml

Ajuster le pH de sorte, qu'après stérilisation, il soit de 7,6 ± 0,1 à 25° C.

Stériliser à l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes.

Conserver au réfrigérateur pendant 1 mois au maximum.

### 5.1.2 Ensemencement :

Déposer en double dans des boîtes de Pétri 1ml de la dilution 10<sup>-1</sup>, 1 ml de la dilution 10<sup>-2</sup> et éventuellement 1 ml de la dilution 10<sup>-3</sup>. Couler 12 à 15 ml de milieu puis mélanger soigneusement l'inoculum avec le milieu.

Laisser refroidir et après solidification mettre à incuber à 30° C pendant 48 h puis à 20° C ± 1° C pendant 48 h.

### 5.1.3 Lecture des boîtes :

Retenir pour comptage les boîtes contenant entre 10 et 300 colonies. Dénombrer toutes les colonies en évitant d'inclure dans le comptage les colonies en « pointe d'épingle » qui représentent une flore lactique.

Néanmoins, certaines souches d'espèces lactiques peuvent se développer convenablement et l'attention doit être retenue par la régularité de l'aspect morphologique, colonies lenticulaires ou rondes ; il est alors conseillé d'effectuer l'épreuve de la catalase, celle-ci doit être négative pour les espèces lactiques.

### 5.1.4 Expression des résultats :

Calculer le nombre de micro-organismes de contamination par millilitre de dilution primaire, c'est-à-dire par gramme de beurre selon le mode de calcul suivant :

— Cas où seuls les comptages d'une dilution sont retenus :

effectuer la moyenne arithmétique.

— Cas où les comptages de deux dilutions successives sont retenus : appliquer la formule suivante :

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

Où  $\Sigma c$  : somme totale des colonies comptées.

$n_1$  : nombre de boîtes comptées dans la première dilution.

$n_2$  : nombre de boîtes comptées dans la seconde dilution.

$d$  : facteur de dilution à partir duquel les premiers comptages ont été obtenus.

Tolérance analytique : 3 m soit  $3 \times 10^3$

## 5.2 Microorganismes aérobies à 30° C :

Ce dénombrement est appliqué au beurre concentré.

**5.2.1 Milieu** : utiliser le milieu dit « Plate Count Agar » additionné de lait.

**5.2.2 Ensemencement** : déposer en double dans des boîtes de Pétri 1 ml de la phase aqueuse dilution primaire et éventuellement 1 ml de la dilution  $10^{-1}$ . Couler 12 à 15 ml de milieu, puis mélanger soigneusement l'inoculum avec le milieu. Laisser refroidir et après solidification, mettre à incuber à 30° C pendant 72 h.

### 5.2.3 Lecture des boîtes :

Retenir pour comptage les boîtes contenant entre 10 et 300 colonies. Dénombrer toutes les colonies en utilisant si nécessaire une loupe d'un grossissement de 1,5 au maximum.

### 5.2.4 Expression des résultats :

Calculer le nombre de micro-organismes aérobies par millilitre de dilution primaire, c'est à dire par gramme de beurre concentré (5.1.4).

Tolérance analytique : 3 m soit  $1,510 \cdot 10^{-3}$

## 5.3 Bactéries coliformes à 30° C

### 5.3.1 Milieu : gélose au désoxycholate

#### Composition :

Protéose peptone.....	10 g
Lactose.....	10 g
Désoxycholate de sodium.....	0,5 g
Chlorure de sodium.....	5 g
Citrate de sodium.....	2 g
Agar.....	15 g
Rouge - neutre.....	0,03 g
Eau distillée.....	1000 ml

Préparer le milieu juste avant l'emploi : ne pas stériliser.

### 5.3.2 Ensemencement

Déposer en double dans des boîtes de Pétri, 1 ml de la phase aqueuse, dilution primaire et éventuellement 1 ml de la dilution  $10^{-1}$ . Couler le milieu à raison de 15 ml environ. Mélanger soigneusement l'inoculum avec le milieu. Laisser refroidir puis couler une seconde couche avec 4 ml à 5 ml de milieu non ensemencé. Après solidification, mettre en incubation à 30 °C pendant 22 h à 24 heures.

### 5.3.3 Lecture des boîtes

Retenir pour comptage les boîtes contenant 150 colonies maximum et dénombrer les colonies rouges typiques d'au moins 0,5 mm de diamètre ; lorsque le diamètre est difficile à estimer, repiquer la colonie dans un tube de bouillon lactosé bilié au vert brillant et porter à l'étuve à 30°C pendant 24 h. à 48 heures afin d'observer la fermentation du lactose.

## 5.3.4 Expression des résultats

Calculer le nombre de coliformes par millilitre de dilution primaire, C'est-à-dire par gramme de produit selon le mode de calcul décrit en (5.1.4).

Tolérance analytique 3 m pour les beurres pasteurisés et les corps gras à base de matière grasse butyrique soit 30 : absence de tolérance pour le beurre concentré, plan à deux classes.

## 5.4 Staphylococcus aureus :

### 5.4.1 Milieu gélose Baird Parker, (E.T.G.P.A).

Couler le milieu complet à raison de 15 ml à 20 ml dans des boîtes de Pétri de 90 mm ou 100 mm de diamètre respectivement.

Après solidification, faire sécher les boîtes retournées, couvercle entrouvert dans une étuve entre 45 °C et 55 °C pendant 30 min. (ou à température ambiante pendant 2 heures). Pour les boîtes de Pétri de 140 mm, couler 28 ml gélose Baird Parker.

Si l'on suspecte la présence de Proteus, il est conseillé d'ajouter une solution de sulfamézathine

Sulfamézathine.....	0,2 g
Solution d'hydroxyde de sodium (0,1 mol).....	10 ml
Eau qsp.....	100 ml

Avant répartition et stérilisation de la gélose Baird Parker, ajouter par litre de milieu 27,5 ml de la solution de sulfamézathine.

### 5.4.2 Ensemencement

Distribuer 1 ml de la phase aqueuse à la surface de la gélose Baird Parker d'une boîte de Pétri de 140 mm, ou de 3 boîtes de Pétri de 90 mm à 100 mm sous forme de 3 fractions sensiblement égales, puis étaler sans tarder à l'aide d'un étaleur en verre stérile. Laisser imprégner pendant 15 minutes à température ambiante. Mettre à incuber à 37° C pendant 24 h. et 48 heures.

### 5.4.3 Lecture des boîtes et choix des colonies

Après 24 heures et 48 heures d'incubation, marquer sur les fonds des boîtes les colonies caractéristiques et/ou non caractéristiques :

**Colonies caractéristiques** : colonies noires, brillantes convexes, entourées d'une zone transparente qui peut être translucide. Après 24 heures, peut apparaître dans cette zone transparente un anneau opalescent immédiatement au contact des colonies.

**Colonies non caractéristiques** : colonies noires, brillantes, convexes ou gris noirâtre ayant parfois un aspect mat et une texture sèche, dépourvues de zone transparente (excepté certaines colonies gris noirâtre).

Retenir pour le dénombrement les boîtes qui renferment 150 colonies au maximum, caractéristiques et/ou non caractéristiques. Dénombrer les colonies suivant leur aspect.

Prélever en vue de l'épreuve de la coagulase (éventuellement de la thermonucléase) un nombre de colonies caractéristiques et/ou non caractéristiques égal à la racine carrée du nombre total des colonies présentes dans une boîte ou trois boîtes de Pétri, en tenant compte de leur nombre respectif.

Lorsque le volume est réparti dans une boîte de Pétri de 140 mm, 5 colonies au minimum doivent être examinées et si leur nombre est inférieur à 5, les prélever toutes ; dans le cas où le volume est réparti sous 3 fractions, 10 colonies au minimum seront examinées et si leur nombre est inférieur, toutes les colonies seront prélevées.

#### 5.4.4 Expression des résultats

Calculer le nombre de staphylococcus aureus par millilitre de dilution primaire, c'est-à-dire par gramme de produit en interprétant les résultats obtenus de la manière suivante :

les résultats douteux à l'épreuve de la coagulase seront considérés comme positifs si l'épreuve de la thermonucléase est positive.

— Si au moins 80 % des colonies examinées sont coagulase positive, considérer que le nombre présumé, donné par le comptage représente le nombre de staphylococcus aureus sinon exprimer le résultat global en tenant compte des proportions de colonies caractéristiques et de colonies non caractéristiques, qui sont coagulase ou thermonucléase positive.

Lorsque plusieurs dilutions ont été examinées, appliquer le mode de calcul décrit en (5.1.4).

Tolérance analytique :

— 3 m pour le beurre cru, les beurres pasteurisés et les corps gras à base de matière grasse butyrique.

— Absence de tolérance pour le beurre concentré, plan à 2 classes.

#### 5.5 Recherche des salmonella

##### 5.5.1 Préenrichissement :

Bouillon lactosé au pourpre de bromocrésol :

Répartir le bouillon à raison de 1125 ml dans des récipients de 2 litres à large ouverture.

Stériliser à l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes

##### — Enrichissement :

Emploi d'un milieu réparti à raison de 100 ml dans des récipients de capacité appropriée ; le préparer juste avant l'emploi.

- Bouillon au tétrathionate de sodium (Muller et Kauffmann) additionné éventuellement de novobiocine, concentration finale 40 µg/ml de milieu; ne pas stériliser.

##### — Isolement :

Les géloses sélectives suivantes sont recommandées :

— Gélose au vert brillant et au rouge de phénol (Edel et Kampelmacher)

— Gélose au sulfite de bismuth (Wilson Blair)

— Gélose xylose lysine décarboxylase(XLD) : utiliser les milieux qui autorisent l'ébullition.

— Gélose Hektoen.

Afin d'éviter des effets défavorables au développement des salmonella par certaines géloses sélectives, se conformer aux recommandations suivantes :

les géloses sélectives doivent être utilisées après 24 heures, soit au plus tard dans la journée qui suit leur préparation.

— la stérilisation des milieux doit être évitée.

— les boîtes préparées seront séchées de préférence à température ambiante, par exemple 2 h à 25 °C; les conserver à l'obscurité à la même température ou au réfrigérateur.

##### 5.5.2 Pré-enrichissement (Jour A)

Afin de réduire la charge de travail, prélever depuis chacun des cinq godets de centrifugation contenant la phase aqueuse 25 ml de celle-ci et les rassembler dans un récipient de 2 litres contenant 1125 ml de bouillon lactosé au pourpre de bromocrésol.

Mélanger soigneusement. Abandonner 1 heure à température ambiante.

Incuber à 37 °C pendant 22 h ± 2 heures.

Lecture après 18 h. à 20 heures ; si le développement est insuffisant, incuber à nouveau pendant 20 h. à 24 heures.

##### 5.5.3 Techniques d'enrichissement et d'isolement

Opérer selon le schéma suivant :

Jour A + 24 h

##### Enrichissement

par ensemencement de 10 ml de la culture pré- enrichie dans



- 100ml de milieu au tétrathionate de sodium incubé au bain marie à 43°C pendant 24 h et 48 h.



Jour A + 48 h

##### Isolement

d'une anse bouclée sur 2 géloses sélectives :

1 - gélose au vert brillant et rouge de phénol ou gélose au bismuth de sulfite

2 - gélose XLD ou gélose Hektoen

Jour A + 72 h

Répéter les isolements tels que décrits à Jour A + 48 h.

Incuber les géloses sélectives à 37° C.

Effectuer une première lecture après 18 h. à 20 heures ; si le développement est insuffisant, incuber à nouveau pendant 20 h. à 24 heures.