

MINISTERE DU COMMERCE

Arrêté du 23 Rajab 1433 correspondant au 13 juin 2012 rendant obligatoire la méthode de recherche et de dénombrement des spores de micro-organismes anaérobies sulfito-réductrices (Clostridia).

— — — —

Le ministre du commerce,

Vu la Loi n° 05-12 du 28 Joumada Ethania 1426 correspondant au 4 août 2005, modifiée et complétée, relative à l'eau ;

Vu le décret présidentiel n° 10-149 du 14 Joumada Ethania 1431 correspondant au 28 mai 2010 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 le décret exécutif n° 05-465 du 4 Dhou EL Kaada 1426 correspondant au 6 décembre 2005 relatif à l'évaluation de la conformité ;

Vu l'arrêté interministériel du 22 Dhou El Hidja 1426 correspondant au 22 janvier 2006, modifié et complété, fixant les proportions d'éléments contenus dans les eaux minérales naturelles et les eaux de source ainsi que les conditions de leur traitement ou les adjonctions autorisées ;

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 la méthode de recherche et de dénombrement des spores micro-organismes anaérobies sulfito-réductrices.

Art. 2. — Pour la recherche et le dénombrement des spores micro-organismes anaérobies sulfito-réductrices, les laboratoires du contrôle de la qualité et de la répression des fraudes et les laboratoires agréés à cet effet doivent employer la méthode jointe en annexe du présent arrêté.

Cette méthode doit être 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 23 Rajab 1433 correspondant au 13 juin 2012.

Mustapha BENBADA.

ANNEXE

MÉTHODE DE RECHERCHE ET DE DÉNOMBREMENT DES SPORES DE MICRO-ORGANISMES ANAÉROBIES SULFITO-RÉDUCTEURS (CLOSTRIDIA)

La présente méthode spécifie la recherche et le dénombrement des spores de micro-organismes anaérobies sulfito-réducteurs (clostridia) par enrichissement dans un milieu liquide.

Le principe de la méthode est applicable à tous les types d'eau, y compris les eaux troubles.

1- DEFINITION

Pour les besoins de cette méthode, la définition suivante est applicable :

clostridia: micro-organismes anaérobies formant des spores et sulfito-réducteurs, appartenant à la famille des Bacillacées et au genre Clostridium.

2-PRINCIPE

La recherche des spores de micro-organismes anaérobies sulfito-réducteurs (clostridia) dans un échantillon d'eau de volume déterminé, passe par les étapes suivantes ;

2.1 - Sélection des spores

Sélection des spores dans l'échantillon, par chauffage pendant une période de temps suffisante pour que les bactéries végétatives soient détruites.

2.2 - Culture par enrichissement

Recherche et énumération des spores des organismes anaérobies sulfito-réducteurs par inoculation de volumes de l'échantillon dans les milieux liquide d'enrichissement, suivie de l'incubation à $37 \pm 1^\circ\text{C}$ pendant $44 \pm 4\text{h}$ dans des conditions anaérobies.

3 - MILIEUX DE CULTURE ET REACTIFS**3.1 - Principaux matériaux**

Pour améliorer la reproductibilité des résultats, il est recommandé d'utiliser, pour la préparation des diluants et des milieux de culture, des composants de base déshydratés ou des milieux complets déshydratés. De la même façon, des préparations commerciales de réactifs peuvent être utilisées. Les prescriptions du fabricant doivent être suivies scrupuleusement.

Les produits chimiques utilisés pour la préparation des milieux de culture et des réactifs doivent être de qualité analytique reconnue.

L'eau utilisée doit être de l'eau distillée ou déminéralisée, exempte de substances susceptibles d'inhiber la croissance des micro-organismes dans les conditions de l'essai.

Les mesures du pH doivent être effectuées au pHmètre, et rapportées à la température de 25°C .

Si les milieux de culture préparés ne sont pas utilisés extemporanément, ils doivent, sauf spécification contraire, être conservés à l'obscurité à environ 4°C pendant 1 mois au maximum.

3.2 - Milieux de culture et diluant

3.2.1 - Diluant

Utiliser un des diluants indiqués dans la méthode de dénombrement des micro-organismes dans le milieu de culture.

3.2.2 - Milieu renforcé spécial pour les clostridia (DRCM)

3.2.2.1 - Milieu de base simple concentration

Composition

Viande digérée dans la peptone tryptique.....	10 g
Extrait de viande.....	10 g
Extrait de levure.....	1,5 g
Amidon.....	1 g
Acétate de sodium hydraté.....	5 g
Glucose.....	1 g
Chlorhydrate de L - cystine.....	0,5 g
Eau.....	1000 ml

Préparation

Mélanger la peptone, l'extrait de viande, l'acétate de sodium ainsi que l'extrait de levure à 800 ml d'eau.

Avec les 200 ml d'eau distillée qui restent, préparer une solution d'amidon comme suit : mélanger l'amidon avec un peu d'eau froide de manière à faire une pâte. Chauffer le reste de l'eau jusqu'à ce qu'elle commence à bouillir et l'introduire lentement dans la pâte, tout en agitant constamment.

Ajouter alors cette solution d'amidon au premier mélange et chauffer jusqu'à ce que le point d'ébullition soit atteint et que le mélange se dissolve.

A la fin, ajouter le glucose et le chlorhydrate de L-cystine : dissoudre.

Ajuster le pH en le faisant passer de 7, 1 à 7, 2 avec une solution d'hydroxyde de sodium à 1 mol / l.

Transvaser une aliquote de 25 ml du milieu dans des flacons avec bouchons à vis de 25 ml de capacité. Stériliser à l'autoclave à 121 ± 1 °C pendant 15 min.

3.2.2.2 - Milieu de base double concentration

Préparer le milieu de base double concentration comme en 3.2.2.1, mais réduire le volume d'eau distillée de moitié.

Transvaser des aliquotes, respectivement, de 10 ml et de 50 ml du milieu, dans des flacons avec bouchons à vis, de capacités respectivement de 25 ml et 100 ml.

Stériliser à l'autoclave à 121 ± 1 °C pendant 15 mn.

3.2.3 - sulfite de sodium ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$), solution à 4 % (m/m).

Dissoudre 4 g de sulfite de sodium anhydre dans 100 ml d'eau. Stériliser par filtration. Conserver entre 2 et 5 °C.

Il est conseillé de préparer une nouvelle solution tous les 14 jours.

3.2.4 - Citrate de fer (III) ($\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7\text{Fe}$) , solution à 7% (m/m).

Dissoudre 7 g de citrate de fer (III) dans 100 ml d'eau, stériliser par filtration.

Conserver entre 2 et 5 °C.

Il est conseillé de préparer une nouvelle solution tous les 14 jours.

3.2.5 - Milieu complet

3.2.5.1 - Le jour de l'analyse, mélanger des volumes égaux des solutions de sulfite de sodium (3.2.3) et de citrate de fer (III) (3.2.4).

3.2.5.2 - Ajouter 0,5 ml du mélange (3.2.5.1) dans chaque flacon de milieu de concentration simple (3.2.2.1) qui vient d'être chauffé et refroidir.

3.2.5.3 - Ajouter 0,4 ml du mélange (3.2.5.1) à chaque volume de 10 ml et 2 ml du mélange à chaque volume de 50 ml du milieu double concentration, ces volumes étant traités de manière semblable.

4- APPAREILLAGE ET VERRERIE DE LABORATOIRE

Verrerie et matériel de laboratoire couramment employés pour la bactériologie, sont :

4.1 - Flacons ou fioles avec bouchons à vis, en verre ou borosilicaté, de capacités 200 ; 100 et 25 ml.

4.2 - Pipettes volumétriques, de capacités 10 et 1 ml.

4.3 - Bains d'eau, contrôles thermiquement.

4.4 - Tubes à essai, de 150 mm x 13 mm.

4.5 - Fil de fer.

4.6 - Incubateurs, réglables à 37 ± 1 °C.

5- ECHANTILLONNAGE

L'échantillonnage se fait dans des conditions appropriées.

6- MODE OPERATOIRE

6.1 - Traitement des échantillons

Se référer à la méthode de dénombrement des micro-organismes sur milieu de culture en ce qui concerne la méthode à suivre pour la conservation et le traitement des échantillons.

6.2 - Sélection des spores (technique)

Avant qu'il soit procédé à l'essai, l'échantillon d'eau doit être chauffé dans un bain d'eau à $75 \pm 5^{\circ}\text{C}$ pendant 15 mn à partir du moment où cette température a été atteinte. Un flacon similaire contenant le même volume d'eau que celui de l'échantillon pour essai doit être utilisé parallèlement comme témoin afin de vérifier le temps de chauffage nécessaire. La température de l'eau dans le flacon témoin peut être enregistrée de manière permanente à l'aide d'un thermomètre.

6.3 - Inoculation et incubation

Ajouter 50 ml de l'échantillon (6.2) à un flacon à capuchon à vis contenant 50 ml du milieu double concentration (3.2.5.3).

Ajouter 10 ml de l'échantillon (6.2) à une série de cinq flacons à capuchon à vis de 25 ml contenant 25 ml du milieu double concentration (3.2.5.3).

Ajouter 1 ml de l'échantillon (6.2) à une série de cinq flacons à capuchon à vis de 25 ml contenant 25 ml du milieu simple concentration (3.2.5.2).

Si nécessaire, ajouter 1 ml d'une dilution au 1/10 de l'échantillon (6.2) à une série de cinq flacons à capuchon à vis contenant 25 ml du milieu simple concentration (3.2.5.2).

Afin de procéder à un examen qualitatif de 100 ml d'eau potable ou d'eau en bouteille sans faire un comptage du NPP, utiliser une fiole de 200 ml contenant un mélange de 100 ml du milieu double concentration (3.2.5.3) et de 100 ml de l'échantillon (6.2).

Si nécessaire, remplir tous les flacons avec le milieu simple concentration (3.2.5.2) de façon à amener le liquide au niveau du col et s'assurer qu'il ne renferme qu'un très petit volume d'air; fermer alors les flacons hermétiquement ou incuber dans des conditions anaérobies.

Incuber les flacons inoculés à $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ pendant 44 ± 4 h.

Note : Des volumes contenant du bouillon de culture dans des flacons en verre hermétiquement fermés peuvent exploser en raison de la production de gaz. L'utilisation d'un fil de fer chauffé au rouge et placé dans le milieu avant incubation peuvent favoriser l'anaérobiose.

6.4 - Interprétation

Les flacons dans lesquels on observe un noircissement résultant de la réduction de sulfite et de la précipitation du sulfure de fer (II) doivent être considérés comme étant positifs.

7- EXPRESSION DES RESULTATS

Exprimer les résultats en conformité avec la méthode de dénombrement des micro-organismes sur milieu de culture.