

MINISTERE DU COMMERCE

Arrêté du 10 Ramadhan 1433 correspondant au 29 juillet 2012 rendant obligatoire la méthode horizontale pour le dénombrement des bactéries sulfito-réductrices se développant en conditions anaérobies.

Le ministre du commerce,

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 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 horizontale pour le dénombrement des bactéries sulfito-réductrices se développant en conditions anaérobies.

Art. 2. — Pour le dénombrement des bactéries sulfito-réductrices se développant en conditions anaérobies, 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 10 Ramadhan 1433 correspondant au 29 juillet 2012.

Mustapha BENBADA.

ANNEXE

**METHODE HORIZONTALE POUR LE
DENOMBREMENT DES BACTERIES
SULFITO-REDUCTRICES SE DEVELOPPANT EN
CONDITIONS ANAEROBIES**

La présente méthode spécifie une méthode horizontale pour le dénombrement des bactéries sulfito-réductrices se développant en conditions anaérobies. Elle est applicable aux :

— produits destinés à l'alimentation humaine et animale ;

— échantillons d'environnement dans le domaine de la production et de la distribution des aliments.

1. DÉFINITION

Pour les besoins de la présente méthode, la définition suivante s'applique.

1.1 Bactéries sulfito-réductrices se développant en conditions anaérobies

Bactéries formant des colonies dénombrables typiques dans les conditions spécifiées dans la présente méthode.

2. PRINCIPE

2.1 Ensemencement dans la masse de deux boîtes de Pétri (ou de deux tubes) de milieu au sulfite de fer avec une quantité spécifiée de l'échantillon pour essai si le produit initial est liquide, ou avec une quantité spécifiée de suspension mère dans le cas d'autres produits.

Préparation de deux autres boîtes (ou tubes) de gélose, dans les mêmes conditions, avec des dilutions décimales de l'échantillon pour essai ou de la suspension mère.

2.2 Incubation en anaérobiose des boîtes (ou tubes) à $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ pendant 24 h à 48 h (lecture finale au bout de 48 h), éventuellement à 50°C si l'on suspecte la présence des bactéries thermophiles. Dénombrement de colonies caractéristiques de couleur noire. La couleur noire des colonies et des alentours est due à la formation du sulfure de fer (II) résultant de la réaction entre les ions sulfurés et les ions trivalents ferriques [Fe (III)] présents dans le milieu.

2.3 Calcul du nombre de bactéries sulfito-réductrices par millilitre ou par gramme d'échantillon, à partir du nombre de colonies obtenues sur les boites (ou tubes).

3. MILIEU DE CULTURE ET DILUANT

3.1 Gélose pour le dénombrement : gélose au sulfite de fer.

3.1.1 Composition

Digestat enzymatique de caséine	15 g
Digestat enzymatique de soja	5 g
Extrait de levure	5 g
Disulfite de sodium ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$)	1 g
Citrate de fer (III) ammoniacal	1 g
Agar-agar	9 g à 18 g ^a
Eau	1000 ml

^a Selon le pouvoir gélifiant de l'agar-agar.

3.1.2 Préparation

Dissoudre les ingrédients dans l'eau en chauffant. Si nécessaire, ajuster le pH de sorte qu'après stérilisation il soit de $7,6 \pm 0,2$ à 25°C .

Verser des portions de 250 ml de milieu dans des flacons de 500 ml.

Si le dénombrement est effectué à l'aide de tubes (4.5), verser 20 ml à 25 ml de milieu dans les tubes. Stériliser à l'autoclave pendant 15 min à 121°C.

Désaérer le milieu juste avant son utilisation.

3.2 Diluant peptone - sel

4. APPARIELLAGE ET VERRERIE

Matériel courant de laboratoire de microbiologie et, en particulier ce qui suit :

4.1 Matériel d'homogénéisation, pour les échantillons d'aliments solides.

4.2 Bain d'eau, pouvant être maintenu à une température comprise entre 44 °C et 47 °C.

4.3 Jarres pour anaérobiose, dotés d'un équipement permettant de générer une atmosphère anaérobie, et comprenant un système de vérification des conditions anaérobies.

4.4 Incubateur, pouvant être maintenu à 37 °C ± 1 °C et, si nécessaire, à 50 °C ± 1°C.

4.5 tubes à essais, de dimensions 16 mm x 160 mm, et fioles ou flacons de 500 ml de capacité.

5. ECHANTILLONNAGE

Il est important que le laboratoire reçoive un échantillon vraiment représentatif, non endommagé ni modifié lors du transport et de l'entreposage.

6. MODE OPERATOIRE POUR LA PREPARATION DE L'ECHANTILLON POUR ESSAI

6.1 Généralités

Une représentation schématique du mode opératoire est donnée au tableau ci-dessous.

6.2 Prise d'essai, suspension mère et dilutions

Il peut être nécessaire d'effectuer un traitement thermique de la suspension mère pour éliminer les formes végétatives de bactéries formant des spores et/ou les bactéries non sporulées. Les températures et les temps de chauffage varient selon les besoins, allant de combinaisons produisant un effet de pasteurisation marqué à un effet d'activation des spores par la chaleur (par exemple 75 °C pendant 20 min) à une ébullition de plusieurs minutes. Dans ce cas, le résultat peut être donné en nombre de spores de bactéries sulfito-réductrices se développant en conditions anaérobies.

6.3 Ensemencement

Prendre deux boîtes de Petri stériles. A l'aide d'une pipette stérile, transférer dans chaque boîte 1 ml d'échantillon pour essai si le produit à tester est liquide, ou 1 ml de suspension mère pour les autres produits.

Prendre deux autres boîtes de Petri stériles. A l'aide d'une nouvelle pipette stérile, transférer 1 ml de la première dilution décimale (10-1) de l'échantillon pour essai si le produit est liquide, ou 1 ml de la deuxième dilution décimale (10-2) de la suspension mère pour les autres produits.

Répéter la procédure décrite avec les dilutions suivantes, en utilisant une nouvelle pipette stérile pour chaque dilution.

Ajouter dans chacune des boîtes de Petri environ 15 ml de gélose au sulfite de fer (3.1) refroidi à l'aide d'un bain d'eau (4.2) à une température comprise entre 44°C et 47°C. Il convient que le temps écoulé entre l'ensemencement des boîtes de Petri et l'addition du milieu gélosé n'excède pas 15 min. Bien mélanger l'inoculum avec le milieu gélosé à l'aide de mouvements horizontaux, puis laisser le milieu se solidifier.

Après solidification du milieu, verser dans la boîte 5 ml à 10 ml du même milieu, de manière à recouvrir la couche précédente.

Dans le cas où des tubes sont utilisés, inoculer 1 ml de chacune des dilutions dans chacun de deux tubes contenant le milieu gélosé, conservés à une température comprise entre 44 °C et 47 °C. Mélanger délicatement en évitant la formation de bulles d'air, puis laisser le milieu se solidifier à l'aide d'un bain d'eau (4.2).

Après solidification du milieu, verser dans chaque tube 2 ml à 3 ml du même milieu, de manière à recouvrir la couche précédente.

6.4 Incubation

Après solidification, incuber les boîtes de Petri dans des jarres pour anaérobiose (4.3) à 37°C ± 10°C pendant 24 h à 48 h.

Si l'on suspecte la présence de bactéries thermophiles, préparer une deuxième série de boîtes de Pétri (voir 6.3). Incuber ces boîtes à 50 °C ± 1 °C.

Si des tubes sont utilisés, l'incubation dans des jarres pour anaérobiose n'est pas nécessaire.

6.5 Comptage des colonies

Lire les résultats après 24 h et après 48 h, selon le degré de coloration noire et le taux de croissance des micro-organismes. Les colonies noires, éventuellement entourées d'une zone noire, sont dénombrées comme des bactéries sulfito-réductrices.

Note 1 — Il peut se produire un noircissement diffus et non spécifique du milieu, surtout lorsque l'inoculation est effectuée dans des tubes de gélose au lieu de boîtes de Pétri. La croissance des bactéries anaérobies, qui produisent seulement de l'hydrogène (pas de H₂S), peut également réduire le sulfite présent et provoquer un noircissement général du milieu.

Dénombrer les colonies sulfito-réductrices dans chaque boîte contenant moins de 150 colonies caractéristiques et moins de 300 colonies au total.

Il est possible que les nombres spécifiés ci-dessus soient trop élevés pour les tubes; dans ce cas ne tenir compte que des tubes dans lesquels les colonies sont bien séparées.

Note 2 — La présente méthode se prête également au dénombrement des seules *Clostridia*. Dans ce cas, après avoir obtenu des colonies caractéristiques, prélever cinq d'entre elles dans chaque boîte utilisée, puis confirmer le genre *Clostridium* au moyen d'essais de confirmation (par exemple essais portant sur le pouvoir respiratoire, sur la formation de spores).

Tableau
représentation schématique du mode opératoire

