

Arrêté du 28 Rajab 1435 correspondant au 28 mai 2014 rendant obligatoire la méthode de préparation des échantillons, de la suspension mère et des dilutions décimales en vue de l'examen microbiologique.

Le ministre du commerce,

Vu le décret présidentiel n° 14-154 du 5 Rajab 1435 correspondant au 5 mai 2014 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 une méthode de préparation des échantillons, de la suspension mère et des dilutions décimales en vue de l'examen microbiologique.

Art. 2. — Pour la préparation des échantillons, de la suspension mère et des dilutions décimales 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 jointe en annexe.

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 Alge, le 28 Rajab 1435 correspondant au 28 mai 2014.

Amara BENYOUNES.

ANNEXE

**METHODE DE PREPARATION
DES ECHANTILLONS, DE LA SUSPENSION
MERE ET DES DILUTIONS DECIMALES EN VUE
DE L'EXAMEN MICROBIOLOGIQUE**

La présente méthode définit les règles générales pour la préparation de la suspension mère et des dilutions décimales réalisées en aérobiose, en vue des examens microbiologiques des produits destinés à la consommation humaines ou à l'alimentation animale.

I. TERMES ET DEFINITIONS

Pour les besoins de la présente méthode les termes et les définitions suivantes s'appliquent :

1.1 suspension mère (première dilution)

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) a été mélangée avec une quantité neuf fois égale de diluant, en laissant se déposer les particules grossières, s'il y en existe. (3 et les notes 1 et 2 en 6.1)

1.2 Dilutions décimales suivantes

Suspensions ou solutions obtenues en mélangeant un volume mesuré de la suspension mère (1.1) avec un volume neuf fois égal de diluant et en répétant cette opération sur les dilutions suivantes, jusqu'à obtention d'une gamme de dilutions décimales appropriée pour l'inoculation des milieux de culture.

2. PRINCIPE

Préparation de la suspension mère (1.1), de façon à obtenir une répartition aussi uniforme que possible des micro-organismes contenus dans la prise s'essai.

Préparation, si nécessaire, de dilutions décimales (1.2) en vue de réduire le nombre de microorganismes par unité de volume pour permettre, après incubation, d'observer leur éventuel développement (cas des tubes) ou d'effectuer le dénombrement des colonies (cas des boîtes), comme précisé dans chaque méthode spécifique.

NOTE - Pour restreindre le domaine de dénombrement à un intervalle donné ou si des nombres élevés de micro-organismes sont attendus, il est possible d'ensemencer uniquement les dilutions décimales nécessaires (deux dilutions successives au minimum).

3. DILUANTS

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 instructions du fabricant doivent être suivies scrupuleusement.

Les produits chimiques doivent être de qualité analytique reconnue et appropriée pour l'analyse microbiologique.

L'eau utilisée doit être de l'eau distillée ou de qualité équivalente.

3.2 Diluants d'emploi général

3.2.1 Solution de peptone - sel

3.2.1.1 Composition

Digestat enzymatique de caséine 1 g

Chlorure de sodium (NaCl) 8,5 g

Eau 1000 ml

3.2.1.2 Préparation

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

Si nécessaire, ajuster le pH de sorte qu'après stérilisation il soit de $7 \pm 0,2$ à 25°C .

3.2.2 Eau peptonée tamponnée

3.2.2.1 Composition

Digestat enzymatique de tissus animaux	10 g
Chlorure de sodium (NaCl)	5 g
Hydrogénophosphate disodique dodécahydraté ($\text{Na}_2\text{HPO}_4, 12 \text{H}_2\text{O}$)	9 g
Dihydrogénophosphate de potassium (KH_2PO_4) ..	1,5 g
Eau	1000 ml

3.2.2.2 Préparation

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

Si nécessaire, ajuster le pH de sorte qu'après stérilisation il soit de $7 \pm 0,2$ à 25°C .

3.3 Répartition et stérilisation du diluant

Répartir le diluant (3.2) en volumes nécessaires à la préparation des suspensions mères dans des fioles (4.4) de capacité appropriée.

Répartir le diluant (3.2) en volumes nécessaires à la préparation des dilutions décimales dans des tubes à essai (4.5) ou fioles (4.4) en quantité telle qu'après stérilisation, chaque tube ou fiole contienne 9 ml. L'incertitude de mesure de ce volume final, après stérilisation, ne doit pas excéder $\pm 2\%$

Note : S'il est prévu de dénombrer plusieurs groupes de micro-organismes au moyen de milieux de culture différents, il peut être nécessaire de répartir tous les diluants (ou quelques-uns seulement) en quantités supérieures à 9 ml, la dimension des fioles (4.4) et des tubes à essai (4.5) étant prévue en conséquence.

Boucher les tubes ou les fioles.

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

4 - APPAREILLAGE ET VERRERIE

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

4.1 Appareils pour la stérilisation en chaleur sèche (four) et en chaleur humide (autoclave).

4.2 Appareillage pour homogénéisation.

4.3 Agitateur mécanique.

4.4 Fioles, de capacités appropriées.

4.5 Tubes à essai, de capacités appropriées

4.6 Pipettes graduées à écoulement total, de 1 ml et 10 ml de capacité nominale, graduées respectivement en 0,1 ml et 0,5 ml.

4.7 pH - mètre, ayant une précision de lecture de $\pm 0,1$ unité pH à 25°C , permettant de réaliser des mesures précises à $\pm 0,1$ unité pH.

4.8 Balance, capable de peser à 0,01 g près.

5. ECHANTILLONNAGE

L'échantillonnage se fait dans des conditions appropriées.

6. MODE OPERATOIRE

6.1 prise d'essai et suspension mère (Première dilution)

Dans un bol ou dans un sac en plastique stériles, peser, avec une incertitude de mesure de $\pm 5\%$, une masse m (g), ou mesurer, avec une incertitude de mesure de $\pm 5\%$, un volume v (ml) (au minimum 10 g ou 10 ml, sauf spécification contraire) représentatifs de l'échantillon pour essai.

Ajouter une quantité de diluant égale à $9 \times m$ (g) ou $9 \times v$ (ml). Cette quantité peut être mesurée de préférence en masse, avec une incertitude de mesure de $\pm 5\%$, ou en volume, avec une incertitude de mesure de $\pm 5\%$.

Note 1 : Il peut être nécessaire dans certains cas, notamment pour les produits donnant une suspension mère 1 + 9 trop visqueuse ou trop épaisse, d'ajouter davantage de diluant. Il convient alors d'en tenir compte dans la suite des opérations et / ou dans l'expression des résultats.

Note 2 : Cette première dilution conditionne en partie la valeur de la limite inférieure de dénombrement, qui dépend également de la technique utilisée (par exemple ensemencement dans la masse avec un inoculum de 1 ml dans une suspension 1/10, pour laquelle cette limite est de 10 micro-organismes par gramme). S'il est nécessaire, pour certains dénombrements dans certains produits, de descendre en dessous de cette limite, il est possible d'utiliser un volume inférieur de diluant. Il convient de noter que l'ensemencement de cette suspension, mère peut éventuellement entraîner des difficultés liées au déséquilibre du rapport inoculum / milieu (inhibition de la croissance microbienne par concentration accrue des composants de l'aliment).

Pour éviter d'endommager les micro-organismes par de brusques changements de température, la température du diluant pendant les opérations décrites ci-après, doit être proche de la température ambiante, sauf produits particuliers.

Homogénéiser le mélange.

Si nécessaire, laisser les grosses particules se déposer durant 15 min au maximum. Les systèmes de filtration donnant des résultats équivalents peuvent être utilisés.

Dans le cas du dénombrement des spores, un chauffage de la suspension mère (par exemple pendant 10 min à 80°C) doit être pratiqué immédiatement après sa préparation, suivi d'un refroidissement rapide.

6.2 Dilutions décimales suivantes

Transvaser, à l'aide d'une pipette stérile (4.6) et avec une incertitude de mesure de $\pm 5\%$, 1 ml de la suspension mère dans un tube contenant 9 ml de diluant à la température appropriée.

Note : Si un plus grand volume est nécessaire, il est possible d'ajouter un volume déterminé de suspension mère (plus 1 ml), avec une incertitude de mesure de $\pm 5\%$, dans une fiole (4.4) contenant neuf fois le volume de diluant stérile.

Pour une précision optimale, ne pas introduire la pipette dans la suspension mère de plus de 1 cm.

Eviter tout contact entre la pipette (4.6) contenant l'inoculum et le diluant stérile.

Mélanger soigneusement la prise d'essai et le diluant, en utilisant de préférence un agitateur mécanique (4.3) pendant 5 s à 10 s, pour obtenir la dilution 10^{-2} .

Si nécessaire, répéter ces opérations sur la dilution 10^{-2} et les dilutions décimales suivantes en utilisant à chaque dilution une nouvelle pipette stérile afin d'obtenir les dilutions 10^{-3} , 10^{-4} , etc... jusqu'à obtention du nombre approprié de micro-organismes.

6.3 Durée des opérations

Le temps qui s'écoule entre la fin de la préparation de la suspension mère et le moment où l'inoculum entre en contact avec le milieu de culture ne doit pas dépasser 45 min, en limitant à 30 min le temps séparant la préparation de la suspension mère (6.1) du début de la préparation des dilutions décimales suivantes.

Note : Si la température ambiante du laboratoire est trop élevée, il convient de réduire ces deux durées maximales.