

MINISTERE DU COMMERCE

Arrêté du 22 Dhou El Kaâda 1437 correspondant au 25 août 2016 rendant obligatoire la méthode de préparation des échantillons, de la suspension mère et des dilutions décimales en vue de l'examen microbiologique des produits autres que les produits laitiers, les produits carnés et les produits de la pêche.

Le ministre du commerce,

Vu le décret présidentiel n° 15-125 du 25 Rajab 1436 correspondant au 14 mai 2015, modifié, 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 Kaâda 1426 correspondant au 6 décembre 2005 relatif à l'évaluation de la conformité ;

Vu le décret exécutif n° 13- 328 du 20 Dhou EL Kaâda 1434 correspondant au 26 septembre 2013 fixant les conditions et les modalités d'agrément des laboratoires au titre de la protection du consommateur et de la répression des fraudes ;

Vu l'arrêté interministériel du 14 Safar 1415 correspondant au 23 juillet 1994, modifié et complété, relatif aux spécifications microbiologiques de certaines denrées alimentaires ;

Vu l'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 ;

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 préparation des échantillons, de la suspension mère et des dilutions décimales en vue de l'examen microbiologique des produits autres que les produits laitiers, les produits carnés et les produits de la pêche.

Art. 2. — Pour la préparation des échantillons, de la suspension mère et des dilutions décimales en vue de l'examen microbiologique des produits autres que les produits laitiers, les produits carnés et les produits de la pêche, 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 Alger, le 22 Dhou El Kaâda 1437 correspondant au 25 août 2016.

Bekhti BELAÏB.

ANNEXE

**METHODE DE PREPARATION
DES ECHANTILLONS, DE LA SUSPENSION
MERE ET DES DILUTIONS DECIMALES
EN VUE DE L'EXAMEN MICROBIOLOGIQUE
DES PRODUITS AUTRES QUE LES PRODUITS
LAITIERS, LES PRODUITS CARNES
ET LES PRODUITS DE LA PECHE.**

1. Domaine d'application :

La présente méthode spécifie des règles pour la préparation des échantillons et des dilutions décimales en vue de l'examen microbiologique des produits autres que les produits laitiers, les produits carnés et les produits de la pêche.

Elle décrit uniquement les techniques de préparation applicables à plusieurs micro-organismes simultanément. Elle exclut les préparations qui ne s'appliquent qu'à la recherche et/ou au dénombrement d'un seul micro-organisme.

La présente méthode est applicable aux produits suivants :

- produits acides (7.2) ;
- aliments à haute teneur en matière grasse à l'exclusion de la margarine et des produits à tartiner (7.3) ;
- farines, graines de céréales complètes, sous-produits de meunerie, farines animales et aliments pour bétail (8.1) ;
- produits très durs comme le manioc (8.2) ;
- gélatine (8.3) ;
- margarine et produits à tartiner (8.4) ;
- produits déshydratés et produits lyophilisés (à l'exception des produits laitiers et ovoproduits) (8.5) ;
- œufs et ovoproduits (8.6) ;
- produits fermentés (produits contenant des micro-organismes vivants) (8.7) ;
- pâtisseries et gâteaux (8.8).

2. Termes et définitions :

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

2.1 Echantillon pour laboratoire :

Echantillon envoyé au laboratoire et destiné à être utilisé pour un contrôle ou pour des essais.

2.2 Echantillon pour essai :

Echantillon représentatif mesuré en volume ou en masse prélevé sur l'échantillon pour laboratoire pour servir à la préparation de la suspension mère.

2.3 Suspension mère (première dilution) :

Suspension, solution ou émulsion obtenue en mélangeant une quantité du produit à analyser (ou de l'échantillon pour essai préparé à partir de ce produit) avec une quantité de diluant égale, le plus souvent, à neuf (9) fois cette quantité de produit, en laissant se déposer les particules grossières, si elles existent.

2.4 Dilutions décimales suivantes :

Suspensions ou solutions obtenues en mélangeant un volume mesuré de la suspension mère (2.3) avec un volume de diluant égal à neuf (9) fois le volume prélevé de la suspension mère et en répétant cette opération sur chaque dilution préparée jusqu'à obtention d'une série de dilutions décimales, appropriée pour l'ensemencement des milieux de culture.

3. Principe :

Préparation de la suspension mère (2.3), de façon à obtenir une répartition aussi uniforme que possible des micro-organismes contenus dans l'échantillon pour essai.

Préparation d'une suspension de pré-enrichissement ou d'enrichissement de la même façon, avec utilisation du milieu préconisé par la méthode d'analyse concernée, sauf cas particuliers mentionnés dans chaque chapitre relatif à un produit de la présente méthode.

Préparation, si nécessaire, de dilutions décimales (2.4) en vue de réduire le nombre de micro-organismes par unité de volume pour permettre, après incubation, d'observer leur éventuel développement (cas des milieux liquides) ou d'observer les colonies (cas des boîtes de Petri ou des tubes de gélose).

Afin de restreindre, si nécessaire, 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 (au moins deux dilutions successives) pour pouvoir effectuer le dénombrement.

4. Diluants :

4.1 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 distillée ou de qualité équivalente.

4.2 Diluants d'emploi général :

4.2.1 Solution de peptone - sel :

4.2.1.1 Composition :

Digestat enzymatique de caséine.....1 g
Chlorure de sodium (NaCl).....8,5 g
Eau.....1000 ml.

4.2.1.2 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.

4.2.2 Eau peptonée tamponnée :

4.2.2.1 Composition :

Digestat enzymatique de tissus animaux10 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
Eau1000 ml

4.2.2.2 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.

4.3 Diluants pour les besoins particuliers :**4.3.1 Solution de peptone - sel avec pourpre de bromocrésol :****4.3.1.1 Composition :**

Solution de peptone- sel (4.2.1).....1000 ml

Pourpre de bromocrésol (solution alcoolisée à 0.04 %
par exemple solution dans l'éthanol).....0,1 ml

4.3.1.2 Préparation :

Diluer 0,1 ml de pourpre de bromocrésol dans 1000 ml
de solution de peptone- sel (4.2.1).

4.3.1.3 Application :

Cette solution (4.3.1) peut être utilisée pour l'analyse de
certains produits acides (7.2), ce qui permet de régler le
pH sans utiliser de sonde de pH stérile.

Le pourpre de bromocrésol est jaune à un pH acide et
vire au pourpre à un pH au-dessus de 6,8.

4.3.2 Solution tampon de phosphate :**4.3.2.1 Composition :**

Hydrogénophosphate disodique dodécahydraté
($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$).....9 g

Dihydrogénophosphate de potassium (KH_2PO_4)...1,5 g

Eau1000 ml

4.3.2.2 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 ± 0.2 à 25°C .

Répartir 180 ml dans chaque fiole.

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

4.3.2.3 Application :

Le tampon de phosphate est utilisé comme diluant pour
les échantillons de gélatine (8.3) et autres.

4.4 Répartition et stérilisation du diluant :

Répartir le diluant (4.2) ou (4.3) en volumes nécessaires
à la préparation des suspensions mères dans des fioles de
capacité appropriée.

Répartir le diluant (4.2) ou (4.3) en volumes nécessaires
à la préparation des dilutions décimales dans des tubes à
essai (5.11) ou fioles (5.10) en quantité tel qu'après
stérilisation, chaque tube ou fiole contient 9 ml.

Après stérilisation, l'incertitude de mesure de ce volume
final, 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 (5.10) et des
tubes à essai (5.11) étant prévue en conséquence.

Boucher les tubes ou les fioles stériliser à l'autoclave à
 121°C pendant 15 min.

5.Appareillage :

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

5.1 Homogénéisateur :

Cet appareil est utilisé pour préparer la suspension mère
à partir de l'échantillon pour essai des produits non
liquides ; il est possible d'utiliser l'un des appareils
suivants :

5.1.1 Homogénéisateur rotatif (blender), dont la
vitesse théorique est comprise entre 8000 t/min et 45000
t/min, équipé de bols en verre, ou en métal stérilisables
munis d'un couvercle.

5.1.2 Homogénéisateur péristaltique

(Stomacher) avec des sacs stériles et comportant
éventuellement une variation de vitesse et un minuteur.

5.2 Râpe de type ménager stérile.**5.3 Marteau.**

5.4 Bains d'eau, capable d'être maintenus à $45^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$
ou, à $40^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ ou entre 37°C et 42°C .

5.5 Ciseaux, couteaux, scalpels et pinces stériles.

**5.6 Spatules, cuillères ou pelles d'échantillonnage
stériles.**

5.7 Carottiers (sondes métalliques) stériles permettant
de prélever des échantillons en profondeur.

5.8 Agitateur à mouvement de va-et- vient.

5.9 Flacons à large ouverture, stériles, de 500 ml de
capacité.

5.10 Fiole de capacité appropriée.**5.11 Tube à essai** de capacité appropriée.

5.12 pH mètre ayant une précision de lecture de $\pm 0,01$
unité pH à 25°C . permettant de réaliser des mesures
précises à $\pm 0,1$ unité pH.

5.13 Balance de précision de pesée de 0,01 g près.

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

6. Préparation des échantillons :

6.1 Produits congelés :

Il convient de ramener les produits congelés à une consistance permettant de procéder à l'échantillonnage et ce, en les soumettant à une température de 18°C à 27°C (température du laboratoire) pendant trois (3) heures au maximum ou à 2°C ± 2°C pendant 24h au maximum.

Il convient de soumettre les échantillons à l'essai dès que possible.

En ce qui concerne la durée des opérations relatives à la préparation des échantillons, il ya lieu de se conformer au point (6.3) de la méthode officielle relative à la préparation des échantillons, de la suspension mère et des dilutions décimales en vue de l'examen microbiologique, fixée par l'arrêté du 28 mai 2014 relatif à la méthode de préparation des échantillons, de la suspension mère et des dilutions décimales en vue de l'examen microbiologique.

Si le produit est encore congelé au moment du découpage, du diluant peut être ajouté à la température ambiante et ce, afin de faciliter sa décongélation.

Il convient que les produits soient bien mélangés dans leurs récipients avant l'échantillonnage.

6.2 Produits durs et secs :

Pour les produits durs ou secs, ne pas homogénéiser dans un homogénéisateur rotatif (5.1.1) plus de 2,5 min d'affilée.

Pour les produits secs et durs ou hétérogènes, il peut être nécessaire de hacher l'échantillon avant l'analyse au laboratoire.

Dans ce cas, pour éviter un échauffement excessif, l'opération de hachage ne doit pas durer plus d'une minute.

6.3 Produits liquides et non visqueux :

Avant l'analyse, il convient de prélever l'échantillon pour essai après avoir agité manuellement l'échantillon pour laboratoire (par exemple 25 fois selon un arc de 25 cm) ou par des moyens mécaniques de manière à s'assurer que les micro-organismes soient uniformément répartis.

6.4 Produits hétérogènes :

Pour les produits hétérogènes (qui contiennent des morceaux de différents aliments), il convient de prélever des parties représentatives de chaque composant en fonction de leurs proportions dans le produit initial.

Il est également possible d'homogénéiser l'ensemble de l'échantillon pour laboratoire, pour permettre de prélever un échantillon pour essai homogène.

Il peut être nécessaire de hacher l'échantillon pour laboratoire. Néanmoins, l'opération de hachage ne doit pas durer plus d'une minute et ce, pour éviter un échauffement excessif.

7. Modes opératoires généraux:

7.1 Généralités :

Il convient que toutes les préparations et les manipulations soient effectuées selon des méthodes aseptiques appropriées et avec un équipement stérile pour éviter toute contamination microbienne des échantillons par des sources extérieures.

7.2 Produits acides :

Lors de la mise en solution des produits acides, il est important de s'assurer que le pH soit ramené à la neutralité. L'utilisation du diluant (4.3.1) additionné d'un indicateur de pH peut permettre d'éviter l'utilisation et la stérilisation des sondes de pH. Ajouter de l'hydroxyde de sodium (NaOH) pour rétablir la coloration de la suspension jusqu'à ce qu'un virage de couleur de l'indicateur soit observé.

En cas d'utilisation de diluants tamponnés, l'addition de (NaOH) est souvent nécessaire pour augmenter l'effet tampon du composant alcalin. La concentration de soude (NaOH) dépend de l'acidité du produit. La concentration la plus adaptée est celle qui permet de s'écarter le moins possible du rapport 1 pour 9 de diluant (par exemple 0,1 mol / l ou 1 mol / l).

7.3 Aliments à haute teneur en matière grasse, à l'exclusion de la margarine et des produits à tartiner (par exemple plus de 20% de matière grasse sur la masse totale) :

Lors de la mise en suspension, l'emploi de diluant additionné de 1g/l à 10g/l de monooléate de sorbitol (Tween 80), correspondant environ au taux de matières grasses (par exemple ajout de 4 gl pour une teneur en matières grasses de 40 %), peut améliorer l'émulsification.

8. Modes opératoires spécifiques :

8.1 Farines, graines de céréales, sous-produits de meunerie, farines animales et aliments pour bétail :

8.1.1 Généralités :

Suivre les plans d'échantillonnage selon la taille de chaque lot de produits.

8.1.2 Préparation de la suspension mère :

Bien mélanger les poudres sèches manuellement dans leurs récipients avant de peser l'échantillon pour essai.

Peser, à 0,1 g près, la masse de la prise d'essai spécifiée dans le tableau ci-dessous dans :

— un bol d'un homogénéisateur rotatif (5.1.1) pour les produits de la catégorie 1, ou ;

— un sac en plastique pour homogénéisateur péristaltique (5.1.2) pour les produits de la catégorie 2.

Ajouter à la prise d'essai le volume correspondant de diluant conformément au tableau ci-dessous.

Tableau : Préparation de la suspension mère.

Catégorie	Produit	Masse de la prise d'essai (g)	Volume du diluant (ml ou g)
1	Grains	40	360
2	Produits de mouture (par exemple farine, semoule, son)	20	180

Avant l'homogénéisation, laisser reposer 30 minutes à la température ambiante.

Si la viscosité de la suspension augmente de telle sorte que celle-ci devient trop épaisse ou trop visqueuse et pour bien se mélanger ou pouvoir être prélevée à la pipette, ajouter un volume égal de diluant pour obtenir une suspension mère à 1 pour 20.

Mélanger la solution en fonction du produit soit avec un homogénéisateur péristaltique (5.1.2) pendant deux minutes, soit avec un homogénéisateur rotatif (5.1.1) entre 15000 t/min et 20000 t/min, pendant 2 minutes au maximum.

La suspension mère doit être utilisée dans les trois minutes afin d'éviter toute phase de décantation du produit à analyser.

Note :

Prendre en compte les dilutions supplémentaires éventuellement effectuées pour le dénombrement des micro - organismes.

Une prise d'essai de 100 g est recommandée pour l'analyse des grains de céréales et autres produits hétérogènes. Dans ce cas, il convient que la première suspension soit une suspension à 1 pour 5.

Homogénéiser et effectuer une dilution à 1 pour 2.

Note :

Il convient de doubler les sacs pour homogénéisateur péristaltique dans le cas des produits durs (par exemple grains et farine d'os) afin d'éviter le risque de perforation.

Il est recommandé d'utiliser un homogénéisateur rotatif (5.1.1).

8.2 Produits très durs (par exemple le manioc).**8.2.1 Préparation de l'échantillon pour essai :**

Prélever une quantité d'échantillon pour essai supérieure à celle requise à l'analyse et la râper (5.2) de manière aseptique ou la réduire en menus morceaux à l'aide d'un marteau (5.3) et la placer dans un sac plastique stérile.

8.2.2 Préparation de la solution mère :

Ajouter une partie d'échantillon pour essai à neuf parties de solution de peptone-sel (4.2.1) et mélanger.

Avant l'homogénéisation, laisser reposer 20 min à 30 min entre 18°C et 27°C (température ambiante du laboratoire).

Homogénéiser dans un homogénéisateur rotatif (5.1.1).

8.3 Gélatine (en granulés ou en feuille) :**8.3.1 Préparation de l'échantillon pour essai :**

Prélever 20 g de l'échantillon pour essai d'une manière aseptique.

8.3.2 Préparation de la solution mère :

Transférer l'échantillon pour essai dans un flacon stérile de 500 ml (5.9) . Ajouter 180 ml de solution tampon de phosphate (4.3.2) et mélanger pour disperser les granulés dans le liquide.

Laisser la gélatine se fixer par absorption au diluant pendant 60 min à la température ambiante.

Placer le flacon dans un bain d'eau réglé à 45°C (5.4) pendant 30 min au maximum et mélanger fréquemment pour dissoudre la gélatine et obtenir une solution à 1 pour 9.

8.4 Margarine et produits à tartiner :**8.4.1 Echantillonnage :****8.4.1.1 Généralités:**

Les échantillons peuvent être prélevés à partir des produits en vrac et des produits préemballés.

8.4.1.2 Produits en vrac ou produits préemballés > 1 kg :

En appliquant des techniques aseptiques, retirer en surface une épaisseur de 3 mm à 5 mm, à l'aide d'une spatule (5.6) ou d'un couteau (5.5). Enfoncer un carottier métallique (5.7) stérile, en diagonale dans le produit sans qu'il atteigne l'extrémité opposée. Faire pivoter le carottier d'un tour complet et retirer le prélèvement conique.

Transférer le prélèvement dans un récipient ou un sac plastique stérile, à l'aide de spatule (5.6) ou de couteau (5.5), à l'exception des 25 mm de la partie supérieure destinés à boucher l'orifice provoqué par le carottier (5.7).

Effectuer un ou plusieurs prélèvement(s) afin d'obtenir un échantillon pour laboratoire approprié.

Tout autre mode de prélèvement (par exemple l'extraction d'une masse d'au moins 500 g) est admissible si le produit est considéré comme homogène.

8.4.1.3 Margarine préemballée : ≤ 1 kg

L'échantillon pour laboratoire est constitué d'un ou plusieurs préemballage (s) intacts.

Prélever les échantillons pour essai d'une manière aseptique. Si la masse de l'échantillon pour laboratoire est supérieure à 500 g de produit en vrac, l'échantillon pour essai doit être prélevé après avoir retiré la couche superficielle sur une épaisseur de 5 mm.

8.4.1.4 Produits préemballés :

Pour les produits préemballés, ouvrir l'emballage. Prélever l'échantillon à la surface à l'aide d'un instrument stérile, après avoir retiré la couche superficielle. Il peut, également, être prélevé à l'aide d'un carottier permettant de prélever un échantillon cylindrique.

8.4.2 Préparation de l'échantillon pour essai :

8.4.2.1 Généralités :

Dans un flacon stérile, peser 40 g d'échantillon pour essai prélevé à partir de l'échantillon pour laboratoire.

8.4.2.2 Préparation de la phase aqueuse (dilution primaire) :

Ajouter dans un récipient stérile un volume de diluant (4.2) équivalent à la proportion escomptée de matière grasse de l'échantillon de margarine ou de produit à tartiner. Exemple, Pour une margarine à 82 % de matière grasse et un échantillon pour essai de 10 g, ajouter $40 \times 0.82 = 33$ ml de diluant.

Placer le récipient dans le bain d'eau (5.4) réglé à 45°C jusqu'à la fusion complète du produit. Il convient que ce temps n'excède pas 20 min.

Mélanger à l'aide de l'agitateur à mouvement de va-et-vient (5.8) jusqu'à l'obtention d'une émulsion homogène. Le temps d'agitation varie de 2 à 5 min en fonction du type de margarine ou du produit à tartiner.

Laisser le récipient à la température ambiante, afin d'obtenir une bonne séparation de la phase grasse (couche supérieure) et de la phase aqueuse (couche inférieure).

Réaliser les opérations suivantes sur la phase aqueuse dont 1 ml de cette solution correspond à 1 g de margarine. Cette solution constitue l'échantillon à utiliser dans la préparation de la suspension mère conformément à la méthode officielle de la préparation des échantillons, de la suspension mère et des dilutions décimales en vue de l'examen microbiologique, fixée par l'arrêté du 28 mai 2014 relatif à la méthode de la préparation des échantillons, de la suspension mère et des dilutions décimales en vue de l'examen microbiologique.

8.4.2.3 Préparation d'une suspension d'enrichissement ou pré-enrichissement :

Si la méthode requiert un enrichissement ou un pré-enrichissement, l'échantillon peut être une coulée complète de margarine.

8.5 Produits déshydratés :

8.5.1 Généralités :

Sont considérés comme produits déshydratés les produits suivants :

- viandes et légumes déshydratés, potages déshydratés et préparations pour sauces ;
- jus de fruits déshydratés et poudre pour boisson (produits à base de thé, de cacao, de chocolat et de café) ;
- cellulose brute en poudre, cellulose soluble, dextrines, sorbitol, sucres, glucose, glutamate ;
- herbes, épices, arômes et colorants ;
- gélifiants polysaccharidiques, gommes, etc ;
- noix de coco, extrait de levure, confiseries de chocolat (tablettes ou bombons), œuf entier déshydraté et blanc d'œuf séché.

Sont exclus les produits suivants :

- les produits laitiers ;
- les ovoproduits ;
- les produits renfermant des micro-organismes vivants (par exemple les levures de boulangerie).

8.5.2 Appareillage :

Des sacs à homogénéisateur péristaltique à filtre central sont recommandés pour faciliter le prélèvement à la pipette des produits comportant une quantité importante de matières insolubles en suspension.

8.5.3 Préparation de l'échantillon pour essai :

Il convient de mélanger soigneusement les produits en poudre dans leur récipient, puis de les peser directement d'une manière aseptique. Il peut être nécessaire de casser ou de couper les autres produits en menus morceaux à l'aide d'outils stériles avant utilisation.

8.5.4 Préparation de la suspension mère :

8.5.4.1 Produits en poudre entièrement solubles :

Ces produits étant solubles, il n'est pas toujours nécessaire de leur faire subir une homogénéisation mécanique.

8.5.4.2 Autres produits (non pulvérulents) :

Préparer une suspension à l'aide d'un homogénéisateur rotatif (5.1.1) ou d'un homogénéisateur péristaltique (5.1.2) comme indiqué (8.2.2).

8.5.4.3 Produits qui gonflent dans l'eau :

Pour tous les produits qui se réhydratent dans l'eau (par exemple gélifiants polysaccharidiques et à base de gomme, persil ou ciboulette déshydratés), effectuer les dilutions avec du diluant (1 pour 20, 1 pour 50 ou 1 pour 100) pour obtenir une suspension utilisable. Si des dilutions plus importantes sont effectuées, le nombre de boîtes ensemencées doit être augmenté, pour distribuer 0,1 g de l'échantillon pour essai, lorsque de faibles dénombrements sont attendus.

Il est également possible, pour favoriser la dissolution d'une substance, d'ajouter à l'eau peptonée tamponnée (4.2.2) une solution d'enzymes spécifiques (par exemple gamanase pour les produits à base de caroube ou cellulase pour la carboxyméthylcellulose).

8.5.4.4 Dilutions supplémentaires pour aliments inhibiteurs :

Pour diminuer l'activité anti-microbienne dans le cas de certains additifs alimentaires contenant des substances inhibitrices (par exemple poudre d'oignon, ail, origan, poivres et certains thés et café) :

- utiliser des dilutions plus importantes (par exemple 1 pour 100 pour l'origan et la cannelle, et 1 pour 1000 pour les clous de girofle) ;

- Ou ajouter du sulfite de Potassium ($K_2 SO_3$) à l'eau peptonée tamponnée (4.2.2) afin d'obtenir une concentration finale de 0.5%.

8.5.4.5 Chocolat, confiseries de chocolat (tablettes ou bonbons) :

- préchauffer le diluant à 40 °C ;
- ajouter l'échantillon pour essai préalablement pesé dans le diluant. Mélanger immédiatement manuellement ;
- laisser le mélange à la température ambiante pendant 20 min à 30 min jusqu'à ramollissement ;
- mélanger ensuite dans l'homogénéisateur péristaltique (5.1.2).

8.5.5 Revivification :

En général laisser reposer l'échantillon pendant environ 30 min $\pm$ 5 min, à la température du laboratoire (ne pas excéder 25 °C) avant la préparation des dilutions qui suivent.

8.6 Ovoproduits :**8.6.1 Œufs frais entiers :****8.6.1.1 Généralités :**

Il convient que les œufs utilisés pour l'analyse microbiologique ne présentent pas de fissures visibles. Les œufs peuvent être examinés un par un ou par lots, selon le cas. Pour examiner le contenu, stériliser les œufs avant ouverture.

Pour la détection des agents pathogènes qui peuvent également se trouver à l'extérieur de la coquille, il n'est pas nécessaire de stériliser la coquille.

8.6.1.2 Désinfection de la coquille :

Eliminer les souillures ou déjections avec un tissu et de l'eau, et sécher.

En portant des gants stériles, à l'aide d'une gaze ou d'une compresse imbibée d'alcool à 70° ou d'isopropanol. essuyer l'ensemble de la surface de la coquille.

Une solution d'iode peut également être utilisée, avec beaucoup de précautions pour protéger le personnel.

Laisser la coquille sécher complètement tout en évitant le risque de contamination.

8.6.2 Recherche ou dénombrement de flore de coquille :**8.6.2.1 Généralités :**

L'œuf doit toujours être manipulé selon des techniques aseptiques.

8.6.2.2 Technique par rinçage de la coquille :

Rincer l'œuf plusieurs fois, sans briser la coquille, en le faisant pivoter, à l'aide de faibles volumes bien déterminés du diluant ou du milieu de culture.

Le liquide ainsi récupéré dans le récipient constitue la suspension mère.

Il est également possible d'introduire l'œuf entier intact dans un sac d'homogénéisateur péristaltique contenant un volume bien déterminé du diluant ou du milieu de culture. Rincer l'œuf dans ce liquide et l'en ressortir par la suite.

8.6.2.3 Technique par frottement :

A l'aide de gaze stérile ou tout autre tissu ou papier équivalent, imbibé de diluant ou de milieu de culture, frotter toute la coquille de l'œuf.

Introduire le morceau de gaze dans le volume de diluant (4.2.1) ou de milieu de culture nécessaire à l'analyse.

8.6.2.4 Technique par trempage :

- casser l'œuf ;
- prendre la coquille et l'introduire dans un sac pour homogénéisation avec le volume requis de diluant ou de milieu de culture ;
- malaxer avec les doigts à travers le sac et utiliser la suspension obtenue.

8.6.3 Recherche ou dénombrement de flore interne :

En portant des gants neufs stériles, casser l'œuf de manière aseptique.

Si le jaune et le blanc doivent être analysés séparément, il faut les séparer et les placer chacun dans deux récipients distincts stériles.

Ajouter de la solution de peptone-sel (4.2.1) pour obtenir une dilution à 1 pour 9 pour le jaune et à 1 pour 40 pour le blanc, de manière à diluer le lysozyme inhibiteur présent à l'état naturel.

Si la recherche de micro - organismes est effectuée dans l'œuf entier, placer directement le contenu dans un récipient stérile contenant 180 ml d'eau peptonnée tamponnée (4.2.2) ou dans le milieu liquide d'enrichissement approprié.

8.6.4 Œuf entier liquide en vrac, blanc d'œuf liquide et jaune d'œuf liquide en vrac :

Pour les œufs entiers liquides, diluer à 1 pour 9 dans de l'eau peptonnée tamponnée (4.2.2).

Pour les blancs d'œuf une suspension à 1 dans 40 dans de l'eau peptonnée tamponnée (4.2.2) est recommandée pour réduire l'inhibition naturelle due au lysozyme.

8.6.5 Œuf entier déshydraté et blanc d'œuf séché :

Procéder comme en (8.5), pour les produits déshydratés.

8.6.6 Dénombrement de la flore globale (coquille + jaune + blanc) :

— selon des techniques aseptiques, casser l'œuf et introduire la coquille et son contenu dans un récipient stérile ;

— homogénéiser par agitation manuelle ou broyage ;

— prendre la masse requise de mélange pour réaliser la suspension mère dans un diluant.

8.7 Produits fermentés (produits contenant des micro-organismes vivants à l'exception des probiotiques).

8.7.1 Généralités :

Il s'agit d'examiner les produits pour détecter une éventuelle contamination par des micro-organismes autres que ceux utilisés dans la fermentation.

8.7.2 Diluant :

Utiliser une solution de peptone - sel additionnée de pourpre de bromocrésol (4.3.1).

Lorsque la suspension montre un virage de l'indicateur, ajouter 40 g/l d'hydroxyde de sodium pour avoir un pH presque neutre (par exemple $7 \pm 0,2$ à 25°C).

Dans le cas des levures, il est nécessaire d'ajouter au milieu de dénombrement un antifongique (par exemple de la cycloheximide à une concentration de 50 mg/kg ou de la nystatine à 50 mg/kg, ou encore de l'amphotéricine à une concentration de 10 mg/kg).

Dans les autres cas, il est recommandé d'ajouter un antibiotique approprié contre la flore constitutive du produit à analyser.

8.8 Pâtisseries et gâteaux:

8.8.1 Généralités :

Les pâtisseries et gâteaux sont de façon générale sucrés et composés de farine, beurre, œufs et autres ingrédients, par exemple des produits laitiers ou des produits à base de fruits.

8.8.2 Préparation de l'échantillon pour essai :

Dans le cas de produits conditionnés, ouvrir l'emballage comme suit :

— conditionnement souple : à dégager au moyen de ciseaux ou d'un scalpel ;

— conditionnement rigide (récipient en verre, etc): nettoyer et désinfecter la surface extérieure soigneusement à l'alcool ; procéder à l'ouverture dans des conditions stériles.

Prélever des parties aliquotes de chaque composant en tenant compte de leurs proportions.

Il est possible d'homogénéiser la totalité de l'échantillon pour laboratoire afin d'obtenir un échantillon pour essai homogène.

Il est recommandé de traiter les gâteaux secs de la même manière que les produits déshydratés (8.5).

9. Dilutions décimales suivantes :

Pour les dilutions décimales suivantes, il ya lieu de se conformer au point (6.2) de la méthode officielle de préparation des échantillons, de la suspension mère et des dilutions décimales en vue de l'examen microbiologique fixée par l'arrêté du 28 mai 2014 relatif à la méthode de préparation, de la suspension mère des dilutions décimales en vue de l'examen microbiologique.