

Arrêté du 4 Rabie Ethani 1425 correspondant au 24 mai 2004 rendant obligatoire une méthode de dénombrement des coliformes dans les laits fermentés.

Le ministre du commerce,

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 ;

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 dénombrement des coliformes dans les laits fermentés.

Art. 2. — Pour le dénombrement des coliformes dans les laits fermentés, les laboratoires du contrôle de la qualité et de la répression des fraudes et les laboratoires agréés à cet effet doivent employer la méthode 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 4 Rabie Ethani 1425 correspondant au 24 mai 2004.

Noureddine BOUKROUH.

ANNEXE

Méthode de dénombrement des coliformes dans les laits fermentés

1°/ Définition :

Aux fins de la présente méthode la dénomination « coliforme » s'applique aux bactéries en forme de bacilles Gram négatives, aérobies et facultativement anaérobies, non sporulées fermentant le lactose avec formation de gaz et d'acide.

2°/ Principe :

Trois séries de dilutions en parallèle, obtenues à partir de l'échantillon de lait fermenté, sontensemencées sur un milieu sélectif au «Brillant Green Lactose Bile Broth» dans des tubes à essais contenant de petits tubes de Durham. On incube les tubes pendant 48 heures à 37° C.

A partir des tubes positifs (production de gaz dans les cloches de Durham) on détermine le nombre le plus probable de bactéries coliformes par g de lait fermenté en se référant au tableau NPP (nombre le plus probable) pour trois séries parallèles.

3°/ Appareillage et verrerie :

Matériel courant de laboratoire.

4°/ Milieu de culture :

4.1 Composition

La composition du milieu « Brillant Green Lactose Bile Broth » est la suivante :

Peptone ou gélisate.....	10 g
Lactose.....	10 g
Bile de boeuf déshydratée.....	20 g
Vert brillant.....	0,0133 g
Eau distillée (dans un appareil en verre).....	1000 ml

4.2 Préparation

Pour préparer 1000 ml du milieu, dissoudre le peptone et le lactose dans environ 500 ml d'eau distillée.

Dissoudre 20 g de bile de boeuf anhydre dans 200 ml d'eau distillée. Le pH de cette solution doit être compris entre 7,0 et 7,5. Mélanger les deux solutions, ajuster le pH mesuré à l'aide d'une électrode de verre, à 7,4 ajouter

13,3 ml d'une solution aqueuse à 0,1% de vert brillant. Le volume est à compléter à 1000 ml avec de l'eau distillée.

Verser 10 ml de milieu dans les tubes à essais.

Ces tubes sont munis de cloches de Durham. Après le remplissage, stériliser pendant 15 minutes dans des autoclaves réglés à 121° C. Après stérilisation, le pH mesuré à l'aide d'une électrode de verre doit être de $7,2 \pm 0,1$.

5°/ Diluant :

Solution de Ringer au quart.

La composition de la solution concentrée de Ringer est la suivante :

Chlorure de sodium (NaCl).....9,00 g

Chlorure de potassium (KCl).....0,42 g

Chlorure de calcium anhydre (CaCl₂).....0,24 g

Bicarbonate de sodium (NaHCO₃).....0,20 g

Eau distillée (dans un appareil en verre).....1000 ml

Pour l'emploi, ajouter une partie de la solution précédente à trois parties d'eau distillée (dans un appareil en verre).

La solution diluée sera stérilisée par chauffage pendant 15 minutes à 121° C.

— **On peut également employer une solution de peptone à 0,1 % au lieu et place de la solution de Ringer diluée au quart.**

— **Tous les réactifs doivent être de qualité analytique.**

6°/ Mode opératoire :

6.1 Préparation des dilutions

6.1.1 L'échantillon sera conservé dans un réfrigérateur (3 à 4° C) jusqu'à l'analyse bactériologique qui sera effectuée dans un délai maximum de 24 h après le prélèvement.

6.1.2 Prélever, en s'entourant des précautions aseptiques habituelles, un échantillon de 10 g de lait fermenté que l'on déposera dans un flacon ou récipient approprié, fermé à vis ou bouché, contenant 90 ml d'une solution de Ringer au quart et quelques perles de verre.

Mélanger soigneusement en agitant le flacon 25 fois de haut en bas avec une amplitude de 30 cm environ.

Le liquide est à utiliser pour la numération; 1 ml correspond à 100 mg de lait fermenté.

6.1.3 Afin d'obtenir la dilution au 1/100, transférer aseptiquement 1 ml du liquide (6.1.2) à 9 ml de solution de Ringer au quart, en mélangeant. Préparer, si nécessaire, une série de dilutions au 1/1000 à partir de la dilution au 1/100.

6.2. Ensemencement du milieu

6.2.1 Ensemencer les tubes de «Brillant Green Lactose Bile Broth» avec 1 g de lait fermenté et avec les dilutions préparées connues, indiqué en 6.1.3. Mélanger soigneusement, en évitant d'introduire des bulles d'air dans les tubes de Durham.

6.2.2 Ensemencer en parallèle dans trois tubes chaque quantité d'échantillon et chaque dilution; effectuer au moins trois séries, par exemple 1g, 0,1g et 0,01g. En général, on doit prévoir un nombre de dilutions au dixième suffisant pour répondre aux exigences du tableau ci-dessous.

6.3. Incubation

Incuber les tubes ensemencés pendant 48 heures $\pm$ 2h à 30°C $\pm$ 1° C;

6.4. Détermination du nombre le plus probable de bactéries coliformes

Le test est considéré comme positif lorsqu'il y a production visible de gaz dans les tubes de Durham. Le nombre de tubes positifs est déterminant pour la lecture du nombre le plus probable (NPP) de bactéries coliformes selon le tableau ci-dessous pour trois séries parallèles.

NOMBRE LE PLUS PROBABLE (NPP) POUR TROIS SERIES PARALLELES

Index

Tubes positifs de NPP(pour 10 g)

Index

Tubes positifs de NPP (pour 10 g)

10 g

00000111111122222222

1,0 g

0011200011223000111222

0,1 g

0101001201010012012012

0

0,3

0,3

0,6

0,6

0,4

0,7

1,1

0,7

1,1

1,1

1,5

1,6

0,9

1,4

2,0

1,5

2,0

3,0

2,0

3,0

3,5

10 g

22223333333333333333

1,0 g

2333000111122223333

0,1 g

3012012012301230123

4,0

3,0

3,5

4,0

2,5

4,0

6,5

4,5

7,5

11,5

16,0

9,5

15,0

20,0

30,0

25,0

45,0

110,0

140,0

Le NPP détermine le nombre de bactéries coliformes dans la quantité de lait fermenté (en règle générale 1 g ou 0,1 g ou 0,01 g) ayant servi àensemencer en parallèle les trois premiers tubes à partir desquels on constitue l'index.

Le nombre de bactéries coliformes sera exprimé par le nombre le plus probable (NPP) par g de lait fermenté. Si tous les tubes sont positifs, il faut répéter l'analyse en utilisant des dilutions plus élevées (par exemple 0,1 g, 0,01 g et 0,001 g ou encore plus élevées).

Si l'on trouve un chiffre-index ne figurant pas dans le tableau NPP, on peut en conclure qu'une erreur a été commise dans le mode opératoire.

7°/ Expression des résultats

(NPP) Les résultats sont exprimés en tant que nombre le plus probable de bactéries coliformes par g du produit, selon les indications du tableau.

8°/ Répétabilité

Les différences entre les résultats de détermination effectuées en double (résultats obtenus simultanément ou rapidement l'un après l'autre par le même analyste) ne doit pas s'écarter de plus de 30% du résultat le plus bas.