

6.1.6 Beurre

Peser 10 g d'échantillon pour essai dans un récipient et le placer dans le bain d'eau (4.11) à $45^{\circ}\text{C} \pm 1$. Garder le récipient dans l'eau jusqu'à ce que l'échantillon soit juste fondu.

Ajouter 90 ml de diluant (3.2).

Mélanger. Cette opération est plus facilement réalisée dans l'homogénéisateur de type péristaltique (4.2b).

On peut également travailler uniquement sur la phase aqueuse pour la dilution, comme suit :

Prendre une prise de 50 g contenant environ 8 ml d'eau et ajouter 42 ml de diluant (3.2.3) réchauffé à 45°C .

Placer le récipient dans un bain d'eau (4.11) à $45^{\circ}\text{C} \pm 1$ jusqu'à ce que le beurre soit fondu. Bien mélanger et laisser séparer pendant 15 min. au maximum.

Si nécessaire, pour séparer les phases, placer l'échantillon pour l'essai fondu dans un tube à centrifuger stérile (ou faire fondre l'échantillon pour essai directement dans le tube), et centrifuger à une fréquence de rotation de 1000 min⁻¹ à 2000 min⁻¹.

Prélever stérilement la phase grasse (supérieure) avec un tube stérile relié à une pompe à vide. Prélever la couche inférieure.

Préparer les dilutions suivantes selon 6.2.

6.1.7 Produits laitiers congelés (y compris les glaces de consommation)

Procéder comme indiqué pour le beurre (6.1.6) (première alternative), mais en utilisant un bain d'eau (4.12) à $37^{\circ}\text{C} \pm 1$ au maximum.

La température de l'échantillon pour essai ne doit pas dépasser la température de ce bain d'eau.

Préparer les dilutions suivantes selon 6.2.

6.1.8 Flans, desserts, lait fermenté et crème

Peser 10g d'échantillon pour essai dans une fiole (4.4) contenant des billes de verre (4.8)

Pour les flans, les desserts et la crème douce ajouter 90 ml de diluant (3.2) et agiter pour disperser.

Pour le lait fermenté et la crème acide utiliser le diluant 3.3.2 à $\text{pH } 7,5 \pm 0,1$. On peut utiliser un homogénéisateur de type péristaltique (4.2 b).

Préparer les dilutions suivantes selon 6.2.

6.2 Dilutions décimales suivantes :

Dans le cas de la recherche de la présence ou de l'absence d'un micro-organisme dans 0,1ml ou 0,1 g de produit, il n'est pas nécessaire de préparer les dilutions décimales.

Introduire avec une nouvelle pipette 1 ml de la dilution primaire (par exemple 6.1.1 ou 6.1.2) dans un nouveau tube contenant 9 ml de diluant stérile (3.2) en évitant le contact de la pipette avec le diluant. Utiliser une nouvelle pipette pour chaque dilution.

Si de plus grands volumes doivent être utilisés, introduire 10 ml de la dilution primaire dans une fiole contenant 90 ml de diluant stérile (3.2) ou 11 ml de la dilution primaire à 99 ml de diluant stérile (3.2).

Dans la pratique courante, quand on exige une dilution 10^{-3} , 1 ml de la dilution primaire devrait être rajouté à 99 ml de diluant stérile (3.2).

Mélanger soigneusement, soit par aspiration refoulement, 10 fois, avec une nouvelle pipette, soit en utilisant un agitateur mécanique (4.3) pendant 5 à 10 secondes pour obtenir la dilution 10^{-2} .

La vitesse de rotation doit être choisie de sorte que le liquide tournoyant affleure à 2 à 3 cm du bord du récipient.

Si nécessaire, répéter ces opérations avec le diluant stérile (3.2) en utilisant la dilution 10^{-2} et les suivantes pour obtenir les dilutions 10^{-3} , 10^{-4} , etc... jusqu'à obtention du nombre approprié de micro-organismes par millilitre (voir 2).

Lorsque 10 ml plus 90 ml ou 11 ml plus 90 ml ont été prélevés, ajouter manuellement comme indiqué en 6.1.1.

6.3 Durée des opérations

Le temps qui s'écoule entre la fin de la préparation de la dilution primaire et le mélange des dilutions et des milieux (décrit selon les méthodes spécifiques) ne doit pas être supérieur à 15 minutes.

—————★—————

Arrêté du 26 Rajab 1425 correspondant au 11 septembre 2004 rendant obligatoire une méthode de contrôle microbiologique pour le lait pasteurisé.

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 29 Safar 1414 correspondant au 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 contrôle microbiologique pour le lait pasteurisé.

Art. 2 — Pour le contrôle microbiologique du lait pasteurisé, les laboratoires du contrôle de la qualité et de la répression des fraudes et les laboratoires agréés à cet effet doivent employer la méthode 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 26 Rajab 1425 correspondant au 11 septembre 2004.

Noureddine BOUKROUH

ANNEXE

METHODE DE CONTROLE MICROBIOLOGIQUE POUR LE LAIT PASTEURISE

1. Préparation de l'échantillon pour essai

Il est nécessaire de rendre l'échantillon homogène avant chaque analyse, par exemple, agiter soigneusement en inversant rapidement 25 fois le préemballage, ou appliquer des techniques appropriées donnant des résultats identiques.

Ouvrir aseptiquement le préemballage après avoir nettoyé à l'éthanol la surface d'ouverture.

Procéder à l'analyse bactériologique dans un délai n'excédant pas trois minutes.

Jusqu'au moment de l'analyse, conserver l'échantillon à 6° C.

2. Dilutions décimales

La préparation des dilutions décimales est effectuée avec le diluant suivant.

2.1 Composition

Peptone pancréatique de caséine (tryptone).....1 g
Chlorure de sodium.....8,5 g
Eau distillée.....1000 ml

2.2 Préparation

Faire dissoudre les composants dans l'eau en chauffant légèrement. Si nécessaire, ajuster le pH de sorte qu'après stérilisation il soit de $7 \pm 0,1$ à 25° C.

Répartir, par exemple, à raison de 100 ml dans des flacons de capacité appropriée.

Stériliser à l'autoclave à 121° C $\pm$ 1 pendant vingt minutes.

2.3 Préparation des dilutions décimales

Au moment de l'emploi, distribuer aseptiquement le diluant à raison de 9 ml dans des tubes stériles de 20 x 200 mm. Pour la préparation des dilutions, utiliser le diluant à température ambiante.

Une dilution au 1/10 est obtenue en transférant aseptiquement 1 ml de lait à l'aide d'une pipette de 1 ml stérile dans 9 ml de diluant (2.1.). Une dilution au 1/100 est obtenue en transférant 1 ml de la dilution au 1/10 à l'aide d'une nouvelle pipette de 1 ml stérile dans un second tube de diluant.

Procéder de manière identique pour les dilutions suivantes.

Mélanger soigneusement chacune des dilutions pendant 5 à 10 secondes au moyen d'un agitateur mécanique à mouvement de rotation excentré au moment de leur préparation et avant les ensemencements.

3. Dénombrement des micro-organismes aérobies à 30° C.

Gélose pour dénombrement

3.1 Composition

Peptone pancréatique de caséine (tryptone).....5,0 g
Extrait de levure déshydratée.....2,5 g
Glucose anhydre.....1,0 g
Lait écrémé en poudre(exempt de substances inhibitrices).....10 g
Ou lait écrémé (exempt de substances inhibitrices) 10 ml
Agar-agar.....12 à 18 g
Eau distillée.....1000 ml

3.2 Préparation

Faire dissoudre les composants ou le milieu complet déshydraté dans l'eau en portant à ébullition. Si nécessaire, ajuster le pH de sorte qu'après stérilisation, il soit de $7 \pm 0,1$ à 25° C.

Répartir à raison de 100 ml dans des flacons de capacité appropriée ou de 12 à 15 ml dans des tubes de 18 x 180 mm ou 20 x 200 mm.

Stériliser à l'autoclave à 121 °C $\pm$ 1 pendant 20 minutes. Le milieu peut être conservé trois mois au maximum et à l'obscurité entre 0°C et 5°C.

3.3 Mode opératoire

Transférer en double 1 ml des dilutions retenues (2.3) dans des boîtes de Pétri stériles de 90 ou 100 mm de diamètre. Couler 12 à 15 ml de milieu, fondu au préalable et refroidi dans un bain d'eau à 45 °C $\pm$ 0,5 (le maintien dans le bain d'eau ne doit pas excéder trois heures). Mélanger soigneusement l'inoculum au milieu.

Laisser solidifier en posant les boîtes sur une surface fraîche et horizontale.

Placer les boîtes de Pétri retournées dans une étuve à 30°C $\pm$ 1 pendant 72h $\pm$ 2 h..

Le délai entre la préparation des dilutions et l'introduction de la gélose dans les boîtes ne doit pas excéder 15 minutes.

3.4 Expression des résultats

Retenir pour comptage, les boîtes de Pétri contenant un nombre de colonies compris entre 10 et 300. Utiliser, si nécessaire, une loupe d'un grossissement de 1,5 au maximum.

3.5 Mode de calcul

Calculer le nombre de micro-organismes par millilitre de lait à l'aide de la formule suivante :

$$\text{Nombre/ml} = \frac{\text{Nombre total de colonies comptées}}{\text{Volume ensemencé de l'échantillon}}$$

$$\text{ou} \quad \frac{\sum c}{(n1 + 0,1 n2) d}$$

où :

c : Somme totale des colonies comptées.

nl : Nombre de boîtes comptées dans la première dilution.

n2 : Nombre de boîtes comptées dans la seconde dilution.

d : Facteur de dilution à partir duquel les premiers comptages ont été obtenus.

Exemple : Dilution 10-2 278 et 290 colonies.

Dilution 10-3 33 et 28 colonies.

$$\text{Nombre/ml} : \frac{278 + 290 + 33 + 28}{(2 + 0,1 \times 2) 10^{-2}} = \frac{629}{0,022} = 28590$$

Pour exprimer le nombre de microorganismes, arrondir le nombre à deux chiffres significatifs.

Quand le chiffre qui doit être arrondi est 5, arrondir de manière que la valeur indiquée immédiatement à gauche soit paire.

Dans l'exemple, le résultat devra être arrondi à 29 000 ou

$2,9 \times 10^4$ si les boîtes contiennent moins de 10 colonies donner le nombre de micro-organismes par millilitre sous la forme moins de $10 \times d$, « d » étant l'inverse du facteur de dilution le plus faible.

Si les boîtes contiennent plus de 300 colonies, faire une estimation à partir des boîtes ayant un comptage proche de 300 colonies. Donner le résultat avec l'indication « nombre estimé de micro-organismes par millilitre ».

Le résultat peut-être exprimé par un nombre compris entre 1 et 9,9 multiplié par 10^x , « x » étant la puissance de 10 appropriée.

L'expérience montre que si le résultat le plus élevé de deux essais indépendants sur le même échantillon dépasse fréquemment le résultat le plus bas de 30 %, l'analyste doit exprimer son mode opératoire afin de déterminer les sources d'erreurs.

4. Dénombrement des coliformes à 30° C et des coliformes fécaux.

Utiliser la gélose lactosée à 0,5 % de désoxycholate de sodium

4.1 Composition

Peptone.....	10 g
Lactose.....	10 g
Désoxycholate de sodium.....	0,5 g
Chlorure de sodium.....	5 g
Citrate de sodium.....	2 g
Agar agar	12 à 15 g
Rouge neutre.....	0,03 g
Eau distillée	1000 ml

4.2 Préparation

La préparation est extemporanée. Préparer la quantité nécessaire ne pas stériliser à l'autoclave.

Faire dissoudre les composants ou le milieu complet déshydraté dans l'eau en portant à ébullition. Refroidir le milieu en le maintenant dans un bain d'eau à $45 \pm 0,5^\circ \text{C}$.

Eviter de surchauffer le milieu : un chauffage prolongé ou des chauffages répétés diminuent son pouvoir sélectif et nuisent à la spécificité de l'épreuve.

4.3 Mode opératoire

Transférer en double 1 ml de lait et 1 ml d'une dilution au 1/10 (2.3) dans les boîtes de Pétri stériles de 90 ou 100 mm de diamètre.

Couler 12 ml de gélose au désoxycholate et mélanger linoculum avec le milieu. Laisser solidifier en posant les boîtes sur une surface fraîche et horizontale. Lorsque le milieu est solidifié, couler environ 4 ml de milieu non ensemencé. Laisser solidifier à nouveau.

4.3.1 Coliformes à 30° C

Placer les boîtes de Pétri retournées dans une étuve à $30^\circ \text{C} \pm 1^\circ \text{C}$ pendant 24 heures $\pm 2 \text{ h}$.

4.3.2 Coliformes fécaux

Placer les boîtes de Pétri retournées dans une étuve à $44^\circ \text{C} \pm 1^\circ \text{C}$ pendant 24 heures $\pm 2 \text{ h}$.

4.4 Expression des résultats

4.4.1 Sélection des boîtes

Retenir pour comptage, les boîtes de Pétri contenant moins de 150 colonies caractéristiques rouge foncé d'un diamètre d'au moins 0,5 mm.

4.4.2 Mode de calcul

Donner le résultat des coliformes par millilitre de lait après avoir effectué la moyenne arithmétique des colonies comptées sur boîtes ensemencées par le même volume de l'échantillon. Le résultat peut être obtenu également à partir de la moyenne arithmétique entre les valeurs obtenues par l'examen de 1 ml de lait et dilution décimale, sauf lorsque le rapport de la valeur la plus faible est supérieur à 2; dans ce cas, retenir comme résultat la valeur la plus faible.

Si les valeurs sont obtenues depuis une dilution décimale, multiplier par l'inverse du facteur de dilution.

Le résultat peut être exprimé par un nombre compris entre 1 et 9,9 multiplié par 10^x « x » étant la puissance de 10 appropriée.

5. Dénombrement de staphylococcus

Utiliser la gélose BAIRD PARKER.

5.1 Composition

Peptone pancréatique de caséine (tryptone).....	10 g
Extrait de levure.....	1 g
Extrait de viande.....	5 g
Glycine	12 g
Chlorure de lithium.....	5 g
Agar-agar	12 à 20 g
Eau.....	1000 ml

Faire dissoudre les composants dans de l'eau en portant à ébullition. Si nécessaire, ajuster le pH de sorte qu'après stérilisation il soit de $7,2 \pm 0,1$ à 25°C .

Répartir le milieu à raison de 90 ml dans des flacons de capacité appropriée.

Steriliser à l'autoclave à $121^{\circ}\text{C} \pm 1$ pendant 15 minutes. Le milieu de base peut être conservé un mois entre 0 et $+5^{\circ}\text{C}$.

5.2 Milieu complet et préparation des boîtes

Au moment de l'emploi, après fusion du milieu de base (5.1) faire refroidir dans un bain d'eau à 50°C et ajouter à 90 ml :

Solution aqueuse à 1 % de tellurite de potassium : 1 ml ;

Solution aqueuse à 20 % de pyruvate de sodium : 5 ml ;

Emulsion de jaune d'œuf, concentration à environ 20 % : 5 ml.

Mélanger soigneusement entre chaque addition et couler le milieu à raison de 28 ± 1 ml dans des boîtes de Pétri de 140 mm de diamètre ou de 15 ml ou 20 ml dans des boîtes de Pétri de 90 mm ou 100 mm de diamètre respectivement.

Laisser solidifier, puis sécher les boîtes en les plaçant retournées couvercles largement ouverts, dans une étuve entre 45°C et 53°C durant 30 minutes.

Procéder aux ensemencements dans les 30 minutes qui suivent la fin du séchage.

Les boîtes contenant la gélose Baird Parker non séchées peuvent être utilisées pendant 24 heures entre 0°C et $+5^{\circ}\text{C}$.

Si l'on suspecte la présence de *Proteus*, il est conseillé d'ajouter une solution de sulfamézathine.

Sulfamézathine.....0,2 g

Solution d'hydroxyde de sodium 0,1 mol/l.....10 ml

Eau Q.S.P.....100 ml

Dissoudre la sulfamézathine dans la solution d'hydroxyde de sodium, compléter à 100 ml avec de l'eau.

Steriliser cette solution par filtration sur membrane.

Au moment de l'emploi, après fusion de la gélose, ajouter 27,5 ml de cette solution à 100 ml de milieu de base.

5.3 Mode opératoire

5.3.1 Ensemencement

Selon le format des boîtes de Pétri, l'ensemencement de 1 ml de lait sera pratiqué de la manière suivante :

Boîtes de 140 mm : à l'aide d'un étaleur en verre stérile, étaler à la surface du milieu la totalité du volume.

Boîtes de 90 ou 100 mm : distribuer 1 ml à la surface du milieu de trois boîtes de Pétri sous forme de trois fractions sensiblement égales, puis étaler en utilisant le même étaleur pour les trois boîtes.

Attendre 15 minutes avant de placer les boîtes de Pétri retournées dans une étuve à $37^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ pendant 24 à 48 heures.

5.3.2 Sélection des boîtes et choix des colonies

Après 24 et 48 heures d'incubation, marquer sur le fond des boîtes les colonies caractéristiques et/ou non caractéristiques.

Colonies caractéristiques : Colonies noires, brillantes, convexes, entourées d'une zone transparente qui peut être translucide. Après 24 heures, peut apparaître dans cette zone transparente un anneau opalescent immédiatement au contact des colonies.

Colonies non caractéristiques : Colonies noires, brillantes convexes ou gris noirâtre ayant parfois un aspect mat et une texture sèche, dépourvues de zone transparente (exceptées certaines colonies gris noirâtre).

Retenir pour comptage, les boîtes contenant moins de 250 colonies caractéristiques et/ou non caractéristiques par boîte de 140 mm; 150 colonies caractéristiques et/ou non caractéristiques par boîte de 90 ou 100 mm.

Prélever en vue de l'épreuve de la coagulase un nombre maximum de cinq colonies caractéristiques et/ou non caractéristiques en tenant compte de leur nombre respectif.

De manière identique, dix colonies au maximum seront prélevées dans le cas d'un volume réparti en trois fractions ou en double.

5.3.3 Epreuve de la coagulase

Ensemencer la colonie dans un bouillon cœur et incubé dans une étuve à 37°C durant 20 à 24 heures.

Pour l'épreuve de la coagulase, utiliser un plasma de lapin contenant de l'E.D.T.A. (acide éthylène diamine tétra-acétique), à défaut ajouter une solution d'E.D.T.A. de sorte que la concentration finale dans le plasma réhydraté soit de 0,1 %.

L'épreuve est reconnue positive lorsque le coagulum occupe plus des trois quarts du volume initial.

5.4 Expression des résultats

Si au moins 80 % des colonies examinées sont coagulase positive, considérer que la totalité des colonies dénombrées correspond à *Staphylococcus aureus*, sinon, exprimer le résultat global en tenant compte des proportions (colonies caractéristiques et colonies non caractéristiques).

Le résultat peut être exprimé par un nombre compris entre 9,9 multiplié par 10^x , « x » étant la puissance de 10 appropriée.

6. Recherche des Salmonella

6.1 Utiliser les milieux complets déshydratés correspondant aux indications données ci-dessous.

6.2 Mode opératoire

6.2.1 Préenrichissement

Afin de réduire la charge de travail, prélever aseptiquement de chacune des cinq unités, 250 ml de lait et les rassembler dans un récipient stérile de 1,5 à 2 litres.

Abandonner à la température ambiante pendant 1 heure, si nécessaire, ajuster le pH à 6,8 environ. Introduire aseptiquement 2,25ml d'une solution aqueuse à 1 % de vert brillant. Mélanger soigneusement.

Incuber à l'étuve à 37° C pendant 20h ± 2 heures.

6.2.2 Enrichissement

Introduire 10 ml de lait préenrichi dans 100 ml de bouillon Muller Kauffmann au tétrathionate et au vert brillant ; faire incuber dans un bain d'eau à 43°C ± 1 pendant quarante-huit heures. Et dans 100 ml de bouillon au sélénite-cystine, faire incuber à l'étuve à 37°C ± 1 pendant quarante-huit heures.

6.2.3 Isolement

Après l'incubation, pratiquer à partir de chaque bouillon des isollements. Effectuer les isollements à la surface de deux milieux sélectifs solides coulés de préférence dans des boîtes de Pétri de 140 mm.

Utiliser la gélose au vert brillant et au rouge de phénol, et la gélose au sulfate de bismuth.

En raison de l'existence possible de Salmonella atypiques, lactose +, on peut substituer la gélose au vert brillant et au rouge de phénol par un autre milieu sélectif, par exemple : la gélose XLD, la gélose Hektoen.

Retourner les boîtes à l'étuve à 37° C pendant dix huit à vingt heures. Si le développement est insuffisant, poursuivre l'incubation.

Soumettre aux épreuves biochimiques classiques un nombre suffisant de colonies caractéristiques ou douteuses.



Arrêté du 26 Rajab 1425 correspondant au 11 septembre 2004 rendant obligatoire une méthode de dénombrement des coliformes pour les crèmes glacées et les glaces au lait.

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 29 Safar 1414 correspondant au 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 pour les crèmes glacées et les glaces au lait.

Art. 2. — Pour le dénombrement des coliformes dans les crèmes glacées et les glaces au lait, les laboratoires du contrôle de la qualité et de la répression des fraudes et les laboratoires agréés à cet effet doivent employer la méthode 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 26 Rajab 1425 correspondant au 11 septembre 2004.

Noureddine BOUKROUH.

ANNEXE

METHODE DE DENOMBREMENT DES COLIFORMES DANS LES CREMES GLACEES ET LES GLACES AU LAIT

1. DEFINITION

On appelle "coliformes", les bactéries en forme de bâtonnets, Gram négatives, aérobies et facultativement anaérobies, non sporulées, qui fermentent le lactose avec formation de gaz et d'acide.

2. PRINCIPE DE LA METHODE

2.1 Méthode de référence

Trois séries de dilutions en parallèle obtenues à partir de l'échantillon du produit servant à ensemer le milieu liquide sélectif «Vert Brillant lactosé à la bile de bœuf» dans des tubes à essai contenant de petits tubes de Durham. On incube les tubes pendant 48 heures + 2 h à 30°C ± 1.

Les tubes positifs (production de gaz dans les tubes de Durham) seront soumis à confirmation par repiquage d'une ose dans un nouveau tube du même milieu. A partir des tubes pour lesquels le test est positif, après confirmation, on détermine le nombre le plus probable de bactéries coliformes par g du produit en se référant au tableau du nombre le plus probable (NPP) pour trois séries parallèles.