

ARRETES, DECISIONS ET AVIS**MINISTERE DU COMMERCE**

Arrêté du 21 Safar 1439 correspondant au 11 novembre 2017 rendant obligatoire la méthode de dénombrement des coliformes thermotolérants par comptage des colonies obtenues à 44 °C.

— — — —

Le ministre du commerce,

Vu le décret présidentiel n° 17-243 du 25 Dhou El Kaâda 1438 correspondant au 17 août 2017 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° 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 le décret exécutif n° 15- 172 du 8 Ramadhan 1436 correspondant au 25 juin 2015 fixant les conditions et les modalités applicables en matière des spécifications microbiologiques des denrées alimentaires ;

Vu le décret exécutif n° 17-62 du 10 Joumada El Oula 1438 correspondant au 7 Février 2017 relatif aux conditions et aux caractéristiques d'apposition de marquage de conformité aux règlements techniques ainsi que les procédures de certification de conformité ;

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 dénombrement des coliformes thermotolérants par comptage des colonies obtenues à 44 °C.

Art. 2. — Pour le dénombrement des coliformes thermotolérants par comptage des colonies obtenues à 44 °C, 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 21 Safar 1439 correspondant au 11 novembre 2017.

Mohamed BENMERADI.

ANNEXE

**METHODE DE DENOMBREMENT
DES COLIFORMES THERMOTOLERANTS
PAR COMPTAGE DES COLONIES
OBTENUES A 44 °C**

1. DOMAINE D'APPLICATION :

La présente méthode décrit une technique pour le dénombrement des coliformes thermotolérants, dans tous les produits destinés à la consommation humaine ou à l'alimentation animale, par comptage des colonies en milieu solide après incubation à 44 °C.

2. TERMES ET DEFINITIONS :

Au sens de la présente méthode, il est entendu par :

2.1 Coliformes thermotolérants : Bactéries qui, à la température spécifiée, forment des colonies caractéristiques en gélose lactosée biliée au cristal violet et au rouge neutre, lorsque l'essai est effectué selon la technique spécifiée dans la présente méthode.

2.2 Dénombrement des coliformes thermotolérants : Nombre de coliformes thermotolérants trouvés par millilitre ou par gramme d'échantillon lorsque l'essai est effectué selon la technique spécifiée dans la présente méthode.

3. Principe :

3.1 Ensemencement en profondeur du milieu gélosé à la bile, au cristal violet, au rouge neutre et au lactose, coulé dans une boîte de Petri :

— avec une quantité déterminée de l'échantillon pour essai si le produit à examiner est liquide ;

— ou avec une quantité déterminée de la suspension mère dans le cas d'autres produits.

Recouvrement avec une couche du même milieu.

Dans les mêmes conditions, ensemencement d'autres boîtes de Petri avec les dilutions décimales obtenues à partir de l'échantillon pour essai ou de la suspension mère.

3.2 Incubation des boîtes de Petri à 44 °C pendant 24 h.

3.3 Calcul du nombre de coliformes thermotolérants par millilitre ou par gramme d'échantillon pour essai, à partir du nombre de colonies caractéristiques dénombrées par boîte de Petri.

4. Diluants et milieu de culture :

Au cours de l'analyse, utiliser uniquement des réactifs de qualité analytique reconnue et de l'eau distillée ou déionisée stérilisée.

4.1 Diluants :

Il convient de préparer les diluants conformément aux exigences spécifiées dans les méthodes relatives à la préparation des échantillons pour essai, de la suspension mère et des dilutions décimales en vue de l'examen microbiologique, fixées par la réglementation en vigueur.

4.2 Milieu de culture, gélose au cristal violet, au rouge neutre, à la bile et au lactose (VRBL)

4.2.1 Composition :

Digestat enzymatique de tissus animaux.....	7 g
Extrait de levure.....	3 g
Sels biliaires.....	1,5 g
Lactose.....	10 g
Chlorure de sodium.....	5 g
Rouge neutre.....	0,03 g
Cristal violet.....	0,002 g
Agar-agar bactériologique.....	12 g à 18 g a)
Eau.....	1000 ml

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

4.2.2 Préparation : Dissoudre les composants ou le milieu complet déshydraté dans l'eau en portant le tout à ébullition.

Si nécessaire, ajuster le pH de sorte qu'après ébullition et refroidissement, il soit de $7,4 \pm 0,2$ à $25\text{ }^{\circ}\text{C}$. Répartir le milieu de culture dans des tubes stériles ou dans des flacons stériles (5.4) de capacité appropriée. Éviter un chauffage trop prolongé ou des chauffages répétés. Ne pas stériliser à l'autoclave.

Utiliser ce milieu rapidement après sa préparation (ne pas dépasser 4 h). Ne pas stériliser le milieu et le préparer extemporanément.

5 . Appareillage et verrerie :

Matériel courant de laboratoire de microbiologie et notamment ce qui suit.

5.1 Etuve réglable à $44\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$.

5.2 Boîtes de Petri stériles en verre ou en matière plastique, de diamètre 90 mm à 100 mm.

5.3 Bain d'eau ou équipement similaire thermostaté entre $44\text{ }^{\circ}\text{C}$ et $47\text{ }^{\circ}\text{C}$.

5.4 Tubes à essai et flacons de capacité appropriée.

5.5 Pipettes graduées à écoulement total de capacité nominale de 1 ml et 2 ml, graduées en 0,1 ml.

5.6 pH-mètre précis à 0,1 unité pH à $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ et de seuil minimal de mesure de 0,01 unité de pH.

6. Echantillonnage :

L'échantillon doit être réellement représentatif, non endommagé ou modifié lors du transport et de l'entreposage.

L'échantillonnage doit être effectué conformément aux exigences fixées par la réglementation en vigueur, le cas échéant aux normes reconnues.

7 . Préparation de l'échantillon pour essai :

La préparation de l'échantillon pour essai doit être faite conformément aux méthodes d'analyses relatives à la préparation des échantillons, de la suspension mère et des dilutions décimales en vue de l'examen microbiologique, fixées par la réglementation en vigueur.

8 . Mode opératoire :

8.1 Prise d'essai, suspension-mère et dilutions : La suspension mère et les dilutions doivent être préparées conformément aux méthodes relatives à la préparation des échantillons pour essai de la suspension mère et des dilutions décimales en vue de l'examen microbiologique, fixées par la réglementation en vigueur.

8.2 Ensemencement et incubation :

8.2.1 Prendre une boîte de Petri stérile (5.2). à l'aide d'une pipette stérile (5.5), transférer dans la boîte de Petri 1 ml de l'échantillon pour essai si le produit est liquide ou 1 ml de la suspension mère dans le cas d'autres produits.

Prendre une autre boîte de Pétri stérile. Transférer dans la boîte, à l'aide, d'une nouvelle pipette stérile, 1 ml de la première dilution décimale de l'échantillon pour essai si le produit est liquide ou 1 ml de la première dilution décimale de la suspension mère dans le cas d'autres produits.

Recommencer ces opérations avec les dilutions qui suivent, à l'aide d'une nouvelle pipette stérile pour chaque dilution décimale.

8.2.2 Couler dans chaque boîte de Petri environ 15 ml du milieu gélosé à la bile, au rouge neutre, au cristal violet et au lactose (4.2.1) refroidi au bain d'eau (5.3) à une température comprise entre $44\text{ }^{\circ}\text{C}$ et $47\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Mélanger soigneusement l'inoculum au milieu de culture et laisser le mélange se solidifier en posant les boîtes de Petri sur une surface froide et horizontale.

8.2.3 Après solidification du mélange, ajouter une couche d'environ 5 ml de milieu V.R.B.L. (4.2) refroidi comme décrit en (8.2.2), afin d'empêcher l'étalement des colonies.

8.2.4 Laisser la seconde couche se solidifier. Retourner les boîtes ainsi préparées (couvercle en dessous) et les incuber dans l'étuve réglée à $44\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ (5.1) durant $24\text{ h} \pm 2\text{ h}$.

Note : Il est important de mettre rapidement les boîtes de Petri en incubation après solidification.

8.3 Comptage des colonies :

Après la période d'incubation spécifiée en (8.2.4), procéder au comptage des colonies caractéristiques de coliformes thermotolérants pour chaque boîte ne contenant pas plus de 150 colonies au total. Au-delà de ce chiffre, les colonies de coliformes thermotolérants risquent de prendre des aspects non caractéristiques.

Après 24 h d'incubation, les colonies caractéristiques sont violacées, d'un diamètre supérieur ou égal à 0,5 mm et parfois entourées d'une zone rougeâtre due à la précipitation de la bile.

9 . Expression des résultats :

9.1 Cas général :

Retenir les boîtes contenant moins de 150 colonies caractéristiques et/ou non caractéristiques au niveau des deux dilutions successives. Il faut qu'une boîte de petri renferme au moins 10 colonies caractéristiques.

Calculer le nombre N de coliformes thermotolérants par millilitre ou par gramme de produit, en tant que moyenne pondérée, à l'aide de l'équation suivante :

$$N = \frac{\sum^c}{V \times 1,1 \times d}$$

Où :

\sum^c : la somme des colonies caractéristiques comptées sur les deux boîtes retenues ;

V : le volume de l'inoculum appliqué à chaque boîte, en millilitres ;

d : le taux de dilution correspondant à la première dilution comptée.

Arrondir les résultats calculés à deux chiffres significatifs.

Noter comme résultat, le nombre de coliformes thermotolérants par millilitre ou par gramme de produit, exprimé par un nombre compris entre 1 et 9,9 multiplié par 10^x , où x est la puissance appropriée de 10.

EXEMPLE : Un dénombrement de coliformes thermotolérants à 44 °C dans un produit liquide a donné les résultats suivants :

- à la première dilution 10^{-2} retenue : 83 colonies ;
- à la seconde dilution 10^{-3} retenue : 13 colonies.

$$N = \frac{\sum^c}{v \times 1,1 \times d} = \frac{83 + 13}{1 \times 1,1 \times 10^{-2}} = \frac{96}{0,011} = 8727$$

Arrondir à deux chiffres significatifs, soit 8 700 ou $8,7 \times 10^3$ coliformes thermotolérants par millilitre de produit.

9.2 Estimation des petits nombres :

9.2.1 Si la boîte de Petri, au niveau de l'échantillon pour essai (produit liquide) ou de la suspension mère (autres produits) contient moins de 10 colonies caractéristiques, donner le résultat sous la forme ci-après :

- pour les produits liquides, nombre estimé N_e de coliformes thermotolérants par millilitre :

$$N_e = a$$

Où :

a : est le nombre de colonies caractéristiques comptées ;

- pour les autres produits, nombre estimé N_e de coliformes thermotolérants par gramme :

$$N_e = a / d$$

Où :

a : est le nombre de colonies caractéristiques comptées ;

d : est le taux de dilution de la suspension mère.

9.2.2 Si le total est compris entre 1 et 3, la fidélité des résultats est si faible que l'on doit exprimer le résultat comme suit :

Le coliforme thermotolérant est présent, mais avec moins de $(4 \times 1 / d)$ coliformes thermotolérants par gramme ou par millilitre.

9.2.3 Si la boîte, au niveau de l'échantillon pour essai (produit liquide) ou de la suspension mère (autres produits) ne contient aucune colonie caractéristique, donner le résultat sous la forme :

- moins de 1 coliforme thermotolérant par millilitre (produit liquide) ;

- moins de $1 \times \frac{1}{d}$ coliformes thermotolérants par gramme (autres produits)

où :

d : est le taux de dilution de la suspension mère.