

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

Arrêté du Aouel Rabie El Aouel 1439 correspondant au 20 novembre 2017 rendant obligatoire la méthode de préparation des échantillons, de la suspension mère et des dilutions décimales en vue de l'examen microbiologique des laits et des produits laitiers.

— — — —

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 26 Rajab 1425 correspondant au 11 septembre 2004 rendant obligatoire une méthode de préparation des échantillons pour essai et dilutions en vue de l'examen microbiologique ;

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 laits et des produits laitiers.

Art. 2. — Pour la préparation des échantillons, de la suspension mère et des dilutions décimales en vue de l'examen microbiologique des laits et des produits laitiers, 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. — Sont abrogées les dispositions de l'arrêté du 26 Rajab 1425 correspondant au 11 septembre 2004 rendant obligatoire une méthode de préparation des échantillons pour essai et dilutions en vue de l'examen microbiologique.

Art. 4. — Le présent arrêté sera publié au *Journal officiel* de la République algérienne démocratique et populaire.

Fait à Alger, le Aouel Rabie El Aouel 1439 correspondant au 20 novembre 2017.

Mohamed BENMERADI.

ANNEXE

Méthode de préparation des échantillons, de la suspension mère et des dilutions décimales en vue de l'examen microbiologique des laits et des produits laitiers

1. DOMAINE D'APPLICATION :

La présente méthode spécifie les règles de préparation des échantillons des laits et des produits laitiers et de leur mise en suspension en vue d'un examen microbiologique.

La présente méthode s'applique :

- aux laits et aux produits laitiers liquides ;
- aux produits laitiers en poudre ;
- aux fromages ;
- à la caséine et aux caséinates ;
- au beurre ;
- aux crèmes glacées ;
- à la crème anglaise, aux desserts et à la crème douce ;
- au lait fermenté et à la crème acide ;
- aux préparations à base de lait pour nourrissons.

2. TERMES ET DEFINITIONS :

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

2.1. Echantillon pour laboratoire :

Echantillon prélevé pour être 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 à neuf (9) fois cette quantité de produit, en laissant se déposer les particules grossières, si elles existent.

2.4 Dilutions décimales qui suivent :

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, si nécessaire, de dilutions décimales (2.4) qui suivent 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 gélose).

Pour 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 :

Utiliser uniquement des réactifs de qualité analytique reconnue et de l'eau distillée ou déionisée stérilisée.

4.1 Composants de base :

Il ya lieu de se conformer à la méthode d'analyse relative à la préparation des échantillons, de la suspension mère et des dilutions décimales en vue de l'examen microbiologique, fixée par la réglementation en vigueur.

4.2 Diluants à usage 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.....	1 000 ml

4.2.1.2 Préparation :

Dissoudre les composants dans l'eau en chauffant légèrement, si nécessaire, sur une plaque chauffante (5.6).

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

4.2.2 Solution de Ringer diluée au quart :**4.2.2.1 Composition :**

Chlorure de sodium (NaCl).....	2,25 g
Chlorure de potassium (KCl).....	0,105 g
Chlorure de calcium, anhydre (CaCl_2).....	0,06 g*)
Hydrogénocarbonate de sodium (NaHCO_3)	0,05 g
Eau.....	1 000 ml

*) En alternative, utiliser 0,12 g de $\text{CaCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$

4.2.2.2 Préparation :

Dissoudre les sels dans l'eau. Ajuster le pH, si nécessaire, de sorte qu'après stérilisation, il soit de $6,9 \pm 0,2$ à 25°C .

4.2.3 Solution de peptone :**4.2.3.1 Composition :**

Digestat enzymatique de caséine	1 g
Eau	1 000 ml

4.2.3.2 Préparation :

Dissoudre la peptone dans l'eau. Ajuster le pH, si nécessaire, de sorte qu'après stérilisation, il soit de $7 \pm 0,2$ à 25°C .

4.2.4 Solution tampon phosphate :**4.2.4.1 Composition :**

Dihydrogénophosphate de potassium (KH_2PO_4).....	42,5 g
Eau.....	1 000 ml

4.2.4.2 Préparation :

Dissoudre le sel dans 500 ml d'eau. Ajuster le pH, si nécessaire, de sorte qu'après stérilisation, il soit de $7,2 \pm 0,2$ à 25°C . Diluer à 1 000 ml avec l'eau restante.

Ajouter 1 ml de cette solution mère à 1 000 ml d'eau pour utilisation en tant que diluant.

Conserver la solution mère au réfrigérateur.

4.2.5 Eau peptonée tamponnée :

4.2.5.1 Composition :

Digestat enzymatique de tissus animaux.....	10 g
Chlorure de sodium (NaCl).....	5 g
Hydrogénophosphate disodique dodécahydraté (Na ₂ HPO ₄ , 12H ₂ O).....	9 g *)
Dihydrogénophosphate de potassium (KH ₂ PO ₄)..	1,5 g
Eau.....	1 000 ml

*) En alternative, utiliser 3,56g d'hydrogénophosphate disodique anhydre (Na₂HPO₄).

4.2.5.2 Préparation :

Dissoudre les composants dans l'eau en chauffant légèrement, si nécessaire, sur une plaque chauffante (5.6).

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

4.2.5.3 Application :

Ce diluant est recommandé en particulier pour la détection de *Salmonella spp* ou le dénombrement de *Listeria monocytogenes*, mais peut également être utilisé pour la préparation de suspensions mères pour d'autres analyses.

4.3 Diluants pour des besoins particuliers :

Ces diluants ne doivent être utilisés que pour la préparation de suspensions mères.

4.3.1 Solution de citrate de sodium :

4.3.1.1 Composition :

Citrate trisodique dihydraté (Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇ .2H ₂ O).....	20 g
Eau.....	1000 ml

4.3.1.2 Préparation :

Dissoudre le sel dans de l'eau en chauffant, si nécessaire, sur une plaque chauffante (5.6) à une température comprise entre 45 °C et 50 °C. Ajuster le pH, si nécessaire, de sorte qu'après stérilisation, il soit de $7,5 \pm 0,2$ à 25 °C.

4.3.1.3 Application :

Cette solution est utilisée pour le fromage et le lait en poudre Hatmaker et certains caséinates.

4.3.2 Solution d'hydrogénophosphate dipotassique :

4.3.2.1 Composition :

Hydrogénophosphate dipotassique (K ₂ HPO ₄).....	20 g
Eau.....	1000 ml

4.3.2.2 Préparation :

Dissoudre le sel dans de l'eau en chauffant, si nécessaire, sur une plaque chauffante (5.6) à une température comprise entre 45 °C et 50 °C. Pour la poudre de lactosérum acide, ajuster le pH de sorte que, pour la première dilution après stérilisation, il soit de $8,4 \pm 0,2$ à 25 °C. Pour le fromage, le lait en poudre Hatmaker, le lait fermenté, les caséinates et la crème acide, ajuster le pH de sorte qu'après stérilisation, il soit de $7,5 \pm 0,2$ à 25 °C.

4.3.2.3 Application :

Cette solution est utilisée pour le fromage, le lait en poudre Hatmaker, le lait fermenté, certains caséinates, le lactosérum acide et la crème acide.

4.3.3 Solution d'hydrogénophosphate dipotassique avec agent antimoissant :

4.3.3.1 Solution d'hydrogénophosphate dipotassique :

4.3.3.1.1 Composition :

Hydrogénophosphate dipotassique (K ₂ HPO ₄).....	20 g
Eau.....	1000 ml

4.3.3.1.2 Préparation :

Dissoudre l'hydrogénophosphate dipotassique dans de l'eau en chauffant, si nécessaire, sur une plaque chauffante (5.6) à une température comprise entre 45 °C et 50 °C.

4.3.3.2 Solution concentrée d'agent antimoissant :

4.3.3.2.1 Composition :

Polyéthylène glycol 2000	1 g
Eau	100 ml

4.3.3.2.2 Préparation :

Dissoudre le polyéthylène glycol 2000 dans l'eau en mélangeant.

4.3.3.3 Préparation de la solution d'hydrogénophosphate dipotassique avec agent antimoussant :

Ajouter 1 ml de la solution concentrée d'agent antimoussant (4.3.3.2) à 1 litre de la solution de K_2HPO_4 (4.3.3.1).

Ajuster le pH de sorte qu'aussi bien pour la première dilution de la caséine acide que pour celle de la caséine lactique, il soit de $8,4 \pm 0,2$ à $25^\circ C$ et pour la caséine présure il soit de $7,5 \pm 0,2$ à $25^\circ C$ après stérilisation.

4.3.3.4 Application :

Cette solution est utilisée pour la caséine acide, la caséine lactique et les caséines présures.

4.3.4 Solution de tripolyphosphate :

4.3.4.1 Composition :

Tripolyphosphate de sodium ($Na_5O_{10}P_3$).....	20 g
Eau.....	1000 ml

4.3.4.2 Préparation :

Dissoudre le sel dans l'eau en chauffant légèrement sur une plaque chauffante (5.6), si nécessaire, verser la solution de tripolyphosphate dans des flacons à raison de 90 ml et les stériliser.

Note : Cette solution peut être conservée à une température de $5^\circ C \pm 3^\circ C$ pendant un mois au maximum.

4.3.4.3 Application :

Cette solution est utilisée comme autre diluant pour les caséines présures qui sont difficiles à dissoudre.

4.3.5 Diluant à usage général avec une solution d' α -amylase :

4.3.5.1 Préparation :

Ajouter 12,5 mg d' α -amylase ayant une activité spécifique d'approximativement 400 unités(*) par milligramme pour 225 ml du diluant d'usage général (4.2). Ce diluant est utilisé pour 25 g de prise d'essai.

Utiliser des quantités dans la même proportion pour la préparation d'autres prises d'essai (par exemple pour une prise d'essai de 10 g, ajouter 5 mg d' α -amylase à 90 ml du diluant à usage général).

Note : (*) Cette unité internationale est définie comme étant la quantité d'enzyme qui catalyse la transformation de 1 μ mol de substrat par minute dans des conditions normales.

4.3.5.2 Application :

Cette solution est utilisée pour des aliments contenant de l'amidon.

4.3.6 Eau peptonée tamponnée avec pourpre de bromocrésol :

4.3.6.1 Composition :

Eau peptonée tamponnée (4.2.5)..... 1 000 ml

Pourpre de bromocrésol (à 4 % dans une solution d'alcool, par exemple une solution d'éthanol)..... 0,1 ml

4.3.6.2 Préparation :

Ajouter 0,1 ml de solution de pourpre de bromocrésol à 1 000 ml d'eau peptonée tamponnée (4.2.5).

4.3.6.3 Application :

Cette solution peut être utilisée dans certains produits acides (7.3) de sorte que l'ajustement du pH puisse être réalisé sans utiliser une sonde de pH stérile.

Le pourpre de bromocrésol est jaune à un pH acide, virant au violet à un pH supérieur à 6,8.

4.4 Répartition et stérilisation du diluant :

Pour la préparation et la stérilisation du diluant, il y a lieu de se conformer à la méthode d'analyse relative à la préparation des échantillons, de la suspension mère et des dilutions décimales en vue de l'examen microbiologique, fixée par la réglementation en vigueur.

5. APPAREILLAGE :

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

5.1 Mélangeur rotatif ou péristaltique.

5.2 Agitateur Vortex.

5.3 Billes en verre de diamètre environ 6 mm.

5.4 Bains d'eau capables de maintenir des températures de $37^\circ C \pm 1^\circ C$ et de $45^\circ C \pm 1^\circ C$.

5.5 Spatules ou baguettes en verre.

5.6 Plaque chauffante ou autre appareil, permettant un chauffage doux (pas de brûleurs à gaz) et pouvant fonctionner à la température requise.

6. PREPARATION DES ECHANTILLONS :

6.1 Produits congelés :

Il convient de ramener les produits stockés congelés à une consistance permettant de réaliser l'échantillonnage, c'est-à-dire en les stockant entre 18 °C et 27 °C (température du laboratoire) pendant 3 h au maximum, ou à 3 °C ± 2 °C pendant 24 h au maximum.

Soumettre les échantillons à essai dès que possible.

En ce qui concerne la durée des opérations relative à la préparation des échantillons, il y a lieu de se conformer à la méthode d'analyse relative à la préparation des échantillons, de la suspension mère et des dilutions décimales en vue de l'examen microbiologique, fixée par la réglementation en vigueur.

Si le produit est encore congelé au moment de la prise d'essai, il est possible d'ajouter du diluant (4), à température du laboratoire pour faciliter la décongélation.

6.2 Produits durs et secs :

Pour mélanger des produits durs dans un mélangeur péristaltique (5.1) placer l'échantillon et le diluant dans deux sacs ou plus stériles, afin d'empêcher leur perforation et un débordement possible de l'échantillon.

Pour les produits durs ou secs, ne pas homogénéiser dans un homogénéisateur rotatif plus de 2,5 minutes en continu.

Pour les produits secs et durs ou hétérogènes, il peut être nécessaire de broyer l'échantillon pour laboratoire. Dans ce cas et pour éviter un échauffement excessif, l'opération de broyage ne doit pas durer plus d'une minute.

6.3 Produits liquides et non visqueux :

Agiter l'échantillon manuellement (8.1) ou par des moyens mécaniques de manière à s'assurer que les micro-organismes sont uniformément répartis avant l'analyse.

6.4 Produits hétérogènes :

Pour les produits hétérogènes, il convient de prélever des parties aliquotes 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 le prélèvement d'un échantillon pour essai plus homogène.

Il peut être nécessaire de broyer l'échantillon pour laboratoire. Dans ce cas et pour éviter un échauffement excessif, l'opération de broyage ne doit pas durer plus d'une minute.

7. MODES OPERATOIRES GENERAUX :

7.1 Généralités :

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

7.2 Echantillonnage :

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

7.3 Cas général des produits acides :

Il est important de s'assurer lors de l'utilisation d'une solution en suspension de produits acides, que le pH soit ramené à la neutralité. L'utilisation de diluant additionné d'un indicateur de pH (4.3.6) peut permettre d'éviter l'utilisation et la stérilisation des sondes de pH ; ajouter de l'hydroxyde de sodium (NaOH) jusqu'à ce que l'indicateur commence à changer de couleur.

En cas d'utilisation de diluants tamponnés, l'ajout de NaOH est souvent nécessaire pour augmenter l'effet tampon du composant alcalin. La concentration du NaOH ajouté, 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).

7.4 Aliments à forte teneur en matières grasses (plus de 20 % de matière grasse sur la masse totale (fraction massique)) :

L'emploi de diluant additionné de 1 g/l à 10 g/l de monooléate de sorbitol [polysorbate 80] : par exemple tween 80, correspondant approximativement au taux de matières grasses (par exemple ajout de 4 g/l pour une teneur en matières grasses de 40 %) peut améliorer l'émulsification lors de la mise en suspension.

8. MODES OPERATOIRES SPECIFIQUES :

8.1 Lait et produits laitiers liquides :

Mélanger soigneusement l'échantillon pour essai afin d'assurer une répartition aussi uniforme que possible des micro-organismes en retournant rapidement 25 fois le récipient contenant l'échantillon. Eviter la formation de mousse et bien laisser la mousse se disperser, si elle se forme. L'intervalle de temps entre le mélange et le prélèvement de la prise d'essai ne doit pas dépasser 3 minutes.

Prélever au moins 1 ml d'échantillon pour essai avec une pipette stérile et ajouter une quantité neuf fois égale de diluant à usage général (4.2). Agiter cette première dilution pour obtenir une dilution 10^{-1} [par exemple 25 fois avec un mouvement d'environ 300 mm pendant 7 secondes manuellement, ou utiliser un agitateur Vortex (5.2) pendant 5 secondes à 10 secondes].

Préparer les dilutions qui suivent conformément au point (9).

8.2 Lait sec, poudre de lactosérum doux, poudre de lactosérum acide, babeurre en poudre et lactose :

Mélanger soigneusement le contenu du récipient fermé en le secouant et en le retournant de manière répétée.

Si l'échantillon pour essai est dans le récipient d'origine non ouvert et trop plein ne permettant pas un mélange complet, le transférer dans un autre récipient stérile plus grand, puis mélanger. Prélever la prise d'essai requise avec une spatule et procéder comme indiqué ci-dessous. Refermer immédiatement le récipient.

Peser 10 g de l'échantillon pour essai dans un récipient en verre stérile (par exemple un bécher) et verser ensuite la poudre dans le flacon de dilution contenant un diluant à usage général (4.2). Pour la poudre de lactosérum acide, utiliser une solution d'hydrogénophosphate dipotassique (4.3.2) à un pH de $8,4 \pm 0,2$ ou, si nécessaire, utiliser pour le lait en poudre Hatmaker une solution de citrate de sodium (4.3.1) ou une solution d'hydrogénophosphate dipotassique (4.3.2) à un pH de $7,5 \pm 0,2$.

Ou bien, peser 10 g de l'échantillon pour essai et le verser directement dans le flacon avec le diluant requis.

Pour dissoudre l'échantillon pour essai, faire tourner lentement le flacon pour mouiller la poudre, puis agiter le flacon par exemple 25 fois avec une amplitude d'environ 300 mm pendant environ 7 secondes. Au lieu d'une agitation manuelle, un mélangeur du type péristaltique (5.1) peut être utilisé.

Laisser reposer 5 minutes, agiter occasionnellement.

Le diluant peut être préchauffé à $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ si une suspension homogène ne peut pas être obtenue même après broyage.

Préparer les dilutions qui suivent conformément au point (9).

Note : Pour une meilleure reconstitution, et en particulier avec du lait en poudre Hatmaker, il est utile d'utiliser des billes en verre (5.3). Dans ce cas, il est préférable de les mettre dans le flacon avant la stérilisation.

8.3 Fromages et fromage fondu :

Peser 10 g d'échantillon pour essai dans une coupelle et les transférer dans le récipient d'un mélangeur rotatif ou d'un mélangeur de type péristaltique (5.1). Ou bien, peser 10 g d'échantillon pour essai directement dans le récipient.

Ajouter 90 ml de diluant à usage général (4.2) ou de diluant pour fromage, soit 90 ml de solution de citrate de sodium (4.3.1) ou de solution d'hydrogénophosphate dipotassique (4.3.2) à un pH de $7,5 \pm 0,2$.

Mélanger de manière à disperser complètement le fromage.

Laisser la mousse se disperser.

Le diluant peut être préchauffé à $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ si une suspension homogène ne peut pas être obtenue même après broyage.

Préparer les dilutions qui suivent conformément au point (9).

8.4 Caséine acide, caséine lactique, caséine présure et caséinates :

8.4.1 Cas général :

Mélanger soigneusement le contenu du récipient fermé en l'agitant et en le retournant de manière répétée.

Peser 10 g d'échantillon pour essai dans un sac plastique stérile pour mélangeur péristaltique (5.1). Ajouter 90 ml du diluant approprié à température ambiante, comme suit :

a) pour les caséines acides et lactiques, diluer avec une solution d'hydrogénophosphate dipotassique avec agent antimoissant (4.3.3) à un pH de $8,4 \pm 0,2$;

b) pour les caséinates, diluer avec une solution de citrate (4.3.1) ou une solution d'hydrogénophosphate dipotassique (4.3.2) à un pH de $7,5 \pm 0,2$ ou une solution de peptone-sel (4.2.1) ;

c) pour la caséine présure, diluer avec une solution d'hydrogénophosphate dipotassique avec agent antimoissant (4.3.3) à un pH de $7,5 \pm 0,2$.

Bien mélanger manuellement et laisser reposer à température ambiante pendant 15 minutes. Mélanger si nécessaire, pendant 2 minutes dans un mélangeur péristaltique (5.1) en utilisant deux sacs stériles pour les produits en granulés. Laisser reposer pendant 5 minutes.

Préparer les dilutions qui suivent conformément au point (9).

8.4.2 Cas particulier de la caséine présure :

L'utilisation d'une solution d'hydrogénophosphate dipotassique avec agent antimoissant (4.3.3) comme diluant pour les caséines présures peut ne pas être efficace pour dissoudre les grains de caséine. Ces grains gênent le dénombrement des micro-organismes à $30\text{ }^{\circ}\text{C}$. En conséquence, il est recommandé d'utiliser la technique suivante :

Si nécessaire, réduire en poudre la caséine sèche avant de prélever la prise d'essai. Transférer approximativement 20 g d'échantillon pour essai dans un récipient approprié. Le broyer en utilisant un appareil comportant des couteaux pouvant tourner à, approximativement, 20.000 t/min, équipé d'un dispositif qui empêche l'échauffement de l'échantillon pendant le broyage.

Peser 5 g de l'échantillon pour essai ainsi préparé dans un flacon stérile de 250 ml. Ajouter des billes en verre (5.3) pour mélanger et 95 ml de la solution de tripolyphosphate de sodium (4.3.4) préchauffée à 37 °C. Mélanger en laissant le flacon sur un dispositif mélangeur pendant 15 minutes. Puis le placer dans le bain d'eau (5.4) réglé à 37 °C pendant 15 minutes tout en agitant de temps à autre.

Préparer les dilutions qui suivent conformément au point (9).

8.5 Beurre :

S'il est nécessaire d'exclure la surface d'un échantillon de beurre de l'examen, il convient d'utiliser une spatule à large lame pour enlever la couche supérieure du produit dans la zone d'échantillonnage sur une épaisseur d'au moins, 5 mm.

Peser 10 g d'échantillon pour essai dans un récipient pour échantillon. Placer le récipient dans le bain d'eau (5.4) réglé à 45 °C. Le maintenir dans le bain d'eau jusqu'à ce que toute la prise d'essai ait fondu.

Ajouter 90 ml de diluant à usage général (4.2) porté à 45 °C et mélanger.

Cette opération est plus facile à exécuter dans un mélangeur péristaltique (5.1). Ou bien, n'utiliser que la phase aqueuse pour la dilution, comme suit :

Prélever une prise d'essai de 50 g contenant une fraction en volume/masse d'eau de w %. Ajouter une quantité de $(50 - [50 \times w/100])$ ml de diluant à usage général (4.2) préchauffé dans le bain d'eau (5.4) à 45 °C.

Dans ces conditions, 1 ml de la phase aqueuse correspond à 1 g de beurre.

EXEMPLE : Pour 50 g de beurre contenant une fraction en volume/masse d'eau d'environ 16 %, la phase aqueuse représente 8 ml de liquide. Ajouter $(50 - [50 \times 16/100]) = 42$ ml de diluant à usage général (4.2) préchauffé dans le bain d'eau (5.4) à 45 °C.

Placer le récipient dans le bain d'eau (5.4) réglé à 45 °C jusqu'à ce que le beurre fonde. Le retirer du bain d'eau, bien agiter, et laisser les phases se séparer pendant une durée maximale de 15 minutes. Si nécessaire, enlever la phase de matière grasse avec une spatule ou une baguette en verre (5.5).

Si nécessaire, et pour séparer les phases, transférer la prise d'essai fondue dans un tube de centrifugation stérile (ou faire fondre directement la prise d'essai dans le tube) et centrifuger à une vitesse de rotation permettant aux phases de se séparer. Il peut être nécessaire, d'enlever la phase grasse (supérieure) de manière aseptique avec un tube stérile relié à une pompe à vide. Aspirer avec une pipette depuis la couche inférieure.

Préparer les dilutions qui suivent, conformément au point (9).

8.6 Crème glacée :

Peser 10 g d'échantillon pour essai dans un flacon ou dans un sac plastique stérile pour mélangeur péristaltique (5.1). Ajouter 90 ml de diluant à température ambiante et mélanger. Le produit fond au cours du mélange.

Préparer les dilutions qui suivent, conformément au point (9).

8.7 Crème anglaise, desserts et crème douce (pH > 5) :

Peser 10 g d'échantillon pour essai dans un flacon contenant des billes en verre (5.3). Ajouter 90 ml de diluant à usage général (4.2) à température ambiante et agiter pour disperser. Ou bien, un mélangeur péristaltique (5.1) peut être utilisé suivant les instructions du fabricant. Dans ce cas, il convient que le sac ne contienne pas de billes en verre.

Préparer les dilutions qui suivent, conformément au point (9).

8.8 Lait fermenté et crème acide (pH < 5) :

Peser 10 g d'échantillon pour essai dans un flacon contenant des billes en verre (5.3). Ajouter comme diluant 90 ml d'eau peptonée tamponnée (4.2.5) ou une solution d'hydrogénophosphate dipotassique (4.3.2) à un pH de $7,5 \pm 0,2$ à température ambiante et agiter manuellement.

Ou bien, un mélangeur péristaltique (5.1) peut être utilisé suivant les instructions du fabricant. Dans ce cas, il convient que le sac ne contienne pas de billes en verre.

Préparer les dilutions qui suivent, conformément au point (9).

8.9 Aliments à base de lait pour nourrissons :

Mélanger soigneusement le contenu du récipient fermé en l'agitant et en le retournant de manière répétée. Si l'échantillon pour essai est dans le récipient d'origine non ouvert et trop plein ne permettant pas un mélange complet, le transférer dans un autre récipient stérile, plus grand, puis mélanger. Prélever la prise d'essai requise avec une spatule (5.5) et procéder comme indiqué ci-dessous. Refermer immédiatement le récipient.

Peser 10 g d'échantillon pour essai dans un récipient en verre stérile approprié (par exemple un bécher). Puis ajouter la poudre dans le flacon de dilution contenant un diluant à usage général (4.2) ou pour des échantillons ayant une teneur élevée en amidon, un diluant pour des besoins particuliers (4.3.5).

Ou bien, peser directement 10 g de l'échantillon pour essai dans le flacon avec le diluant requis.

Le diluant peut être préchauffé à 45 °C si une suspension homogène ne peut pas être obtenue même après broyage.

Pour une meilleure reconstitution, il est utile d'utiliser des billes en verre (5.3). Dans ce cas, les ajouter dans le flacon avant la stérilisation.

Pour dissoudre l'échantillon, faire tourner lentement le flacon pour mouiller la poudre puis agiter manuellement le flacon, par exemple 25 fois, avec une amplitude d'environ 300 mm, pendant environ 7 secondes. Ou bien, un mélangeur péristaltique (5.1) peut être utilisé. Laisser reposer 5 min, en agitant occasionnellement.

Préparer les dilutions qui suivent, conformément au point (9).

Les échantillons ayant une teneur élevée en amidon peuvent créer des problèmes du fait de la viscosité élevée de la première dilution.

Utiliser un diluant à usage général (4.2) avec une solution d' α -amylase (4.3.5) pour réduire la viscosité de la solution mère ou utiliser deux fois la quantité de diluant. Tenir compte de cette dilution supplémentaire lors des examens ultérieurs.

9. DILUTIONS DECIMALES :

Il convient de suivre les recommandations prévues dans la méthode relative à la préparation des échantillons, de la suspension mère et des dilutions décimales en vue de l'examen microbiologique, fixée par la réglementation en vigueur.

Lors du transfert d'une suspension mère visqueuse, préparée à partir de caséine acide ou de caséine présure (8.4), rincer la pipette avec le diluant par plusieurs aspirations, en ayant recours au diluant utilisé pour réaliser la dilution décimale.

Lorsque 10 ml plus 90 ml ou 11 ml plus 99 ml, ont été prélevés, agiter manuellement comme décrit en (8.1).

Note : Si l'étape mentionnée ci-dessus est réalisée sans rincer la pipette lors du transfert d'une première dilution visqueuse, le volume de la suspension mère à transférer sera incorrect.