

MINISTERE DU COMMERCE

**Arrêté du 11 Moharram 1441 correspondant au 11 septembre 2019 rendant obligatoire la méthode horizontale pour le dénombrement des micro-organismes par comptage des colonies à 30 °C par la technique d'ensemencement en surface.**

Le ministre du commerce,

Vu le décret présidentiel n° 19-111 du 24 Rajab 1440 correspondant au 31 mars 2019, 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, notamment son article 19 ;

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 de spécifications micro- biologiques des 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 micro-biologique ;

Vu l'arrêté interministériel du 2 Moharram 1438 correspondant au 4 octobre 2016 fixant les critères micro-biologiques des 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, notamment son article 19, susvisé, le présent arrêté a pour objet de rendre obligatoire la méthode horizontale pour le dénombrement des micro-organismes par comptage des colonies à 30 °C par la technique d'ensemencement en surface.

Art. 2. — Pour le dénombrement des micro-organismes par comptage des colonies à 30 °C par la technique d'ensemencement en surface, 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, 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 11 Moharram 1441 correspondant au 11 septembre 2019.

Saïd DJELLAB.

#### ANNEXE

### **METHODE HORIZONTALE POUR LE DENOMBREMENT DES MICRO-ORGANISMES PAR COMPTAGE DES COLONIES À 30 °C PAR LA TECHNIQUE D'ENSEMENCEMENT EN SURFACE**

#### **1. DOMAINE D'APPLICATION :**

La présente méthode spécifie une technique horizontale de dénombrement des micro-organismes capables de se développer et de former des colonies à la surface d'un milieu solide après incubation aérobie à 30 °C.

Cette méthode s'applique :

- a) aux produits destinés à la consommation humaine ou animale ;
- b) aux échantillons de l'environnement du domaine de la production d'aliments destinés à la consommation humaine ou animale et à la préparation des aliments.

La présente méthode concerne l'analyse :

1. des produits contenant des organismes sensibles à la chaleur susceptibles de former une partie significative de l'ensemble de la flore bactérienne (par exemple : des organismes psychotrobes présents dans des aliments réfrigérés et congelés, des aliments secs et d'autres aliments pouvant contenir des organismes sensibles à la chaleur) ;

2. des produits contenant des bactéries aérobies susceptibles de former une partie significative de l'ensemble de la flore (par exemple : *Pseudomonas spp.*) ;

3. des produits contenant de petites particules qu'il peut se révéler difficile de distinguer des colonies dans une boîte de Petri ensemencée en profondeur ;

4. des produits dont la couleur intense empêche la reconnaissance des colonies dans une boîte de Petri ensemencée en profondeur ;

5. des produits pour lesquels il est nécessaire de faire la différence entre les différents types de colonies dans le cadre de l'évaluation de la qualité des aliments.

En plus de la technique d'ensemencement en surface manuelle, la présente méthode spécifique, également, l'utilisation d'un dispositif d'ensemencement en spirale, méthode rapide de dénombrement des colonies en surface (10).

La présente méthode peut ne pas être adaptée à l'analyse de certains aliments fermentés destinés à la consommation humaine et aux aliments pour animaux et à d'autres milieux ou les conditions d'incubation peuvent être plus appropriés.

Toutefois, cette méthode peut être appliquée à de tels produits, même si elle ne détecte pas totalement les micro-organismes présents en majorité dans ces produits alimentaires.

## 2. DEFINITION :

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

**Micro-organisme** : entité de taille microscopique, comprenant les bactéries, les champignons, les protozoaires et les virus.

## 3. PRINCIPE :

Une quantité déterminée de l'échantillon pour essai, pour les produits liquides ou une quantité déterminée de la suspension mère dans le cas d'autres produits, est ensemencée à la surface d'un milieu de culture gélosé solide contenu dans des boîtes de Petri.

D'autres boîtes sont préparées dans les mêmes conditions, à partir de dilutions décimales de l'échantillon pour essai ou de la suspension mère.

Les boîtes sont incubées dans des conditions aérobies à 30 °C pendant 72 h.

Le nombre de micro-organismes par gramme d'échantillon ou le nombre de micro-organismes par millilitre d'échantillon est calculé à partir du nombre de colonies obtenu sur les boîtes contenant moins de 300 colonies.

## 4. MILIEUX DE CULTURE ET DILUANTS :

### 4.1. Diluants :

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

## 4.2 Milieu gélosé : gélose pour dénombrement (PCA) :

### 4.2.1 Compositions :

Digestant enzymatique de caseine	5 g
Extrait de levure	2,5 g
Glucose anhydre (C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub> )	1 g
Gélose *	9 g à 18 g
Eau	1000 ml
* En fonction du pouvoir gélifiant de la gélose	

Dans le cas de l'analyse de produits laitiers, ajouter 1 g de poudre de lait écrémé par litre de milieu de culture. La poudre de lait écrémé doit être exempte de substances inhibitrices.

### 4.2.2. Préparation :

Dissoudre, dans de l'eau, les composants ou le complet déshydraté, en chauffant, si nécessaire.

Mélanger soigneusement et laisser reposer plusieurs minutes.

Ajuster le pH (5.5), si nécessaire, de sorte qu'après stérilisation, il soit de  $7 \pm 0,2$  à 25 °C.

Répartir le milieu dans des fioles ou flacons (5,9) de capacité appropriée.

Stériliser pendant 15 min à l'autoclave (5.1) à 121 °C.

Si le milieu est à utiliser extemporanément, le refroidir dans un bain d'eau (5.4) maintenu entre 47 °C et 50 °C, avant utilisation. Sinon, le laisser se solidifier dans une fiole ou dans un flacon et avant son utilisation le faire fondre complètement dans un bain d'eau bouillante, puis le refroidir dans un bain d'eau (5.4) maintenu entre 47 °C et 50 °C.

### 4.2.3 Préparation des boîtes gélosées :

Verser entre 15 ml et 20 ml de milieu dans des boîtes de Petri stériles (5,6) et laisser solidifier.

Les boîtes peuvent être stockées à  $(5 \pm 3)$  °C pendant 4 semaines, au plus.

Immédiatement avant utilisation, il est recommandé de sécher les boîtes gélosées.

### 4.2.4 Essai de performance du milieu de culture :

#### 4.2.4.1 Généralités :

La gélose pour dénombrement (PCA) est un milieu non sélectif, utilisé dans la présente méthode comme milieu pré-coulé pour ensemencement en surface.

#### 4.2.4.2 Productivité :

Incubation	(72 ± 3) h à (30 ± 1) °C
Souches témoins	- Bacillus subtilis subsp. spizizenii - Staphylococcus aureus
Milieu de référence	Gélose tryptone soja
Méthode de contrôle	Quantitative
Critère	Rapport de productivité (RP) ≥ 0,7

#### 5. APPAREILLAGE :

Le matériel, à usage unique, est acceptable au même titre que la verrerie et le matériel en plastique réutilisables, si leurs spécifications sont appropriées.

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

**5.1 Four** pour la stérilisation en chaleur sèche ou autoclave pour la stérilisation en chaleur humide.

**5.2 Etuve** ou armoire de séchage, ventilée par convection, pour sécher les boîtes, pouvant être maintenue entre 37 °C et 55 °C, ou hotte à flux d'air laminaire.

**5.3 Etuve** pouvant être maintenue à (30 ± 1) °C.

**5.4 Bains d'eau** dont l'un peut maintenir une température comprise entre 47 °C et 50 °C et l'autre peut maintenir l'eau au point d'ébullition.

**5.5 pH-mètre**, d'une précision de ± 0,1 unité pH à 25 °C.

**5.6 Boîtes de Petri**, en verre ou en plastique, de 90 mm à 100 mm, ou 140 mm de diamètre.

**5.7 Pipettes graduées à écoulement total**, stériles, ayant une capacité nominale de 0,1 ml et de 1 ml, ou pipettes automatiques, utilisant des embouts stériles.

**5.8 Appareil de comptage des colonies** (facultatif), constitué d'une base éclairée et d'un compteur (facultatif) mécanique ou électronique à affichage numérique.

**5.9 Fioles ou flacons**, de capacité appropriée pour la préparation, la stérilisation et, si nécessaire, le stockage des milieux de culture.

**5.10 Spatules** en verre, en plastique ou en métal, stériles, servant à étaler l'inoculum sur le milieu de culture.

#### 6. ECHANTILLONNAGE :

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

L'échantillon doit être réellement représentatif, non endommagé ou modifié pendant le transport ou le stockage.

#### 7. PREPARATION DE L'ECHANTILLON POUR ESSAI :

La préparation de l'échantillon pour essai doit être effectuée, conformément aux méthodes d'analyses spécifiées dans la réglementation en vigueur.

#### 8. MODE OPERATOIRE :

##### 8.1 Prise d'essai, suspension mère et dilution :

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 micro-biologique, fixées par la réglementation en vigueur.

##### 8.2 Ensemencement et incubation :

**8.2.1** A l'aide d'une pipette stérile (5.7), transférer au centre des deux (2) boîtes de milieu gélosé (4.2), 0,1 ml de l'échantillon pour essai si le produit est liquide, ou 0,1 ml de la suspension mère dans le cas d'autres produits. Si des boîtes sont préparées à partir de plus d'une dilution, le nombre de boîtes par dilution peut être réduit à une (1) boîte.

**8.2.2** Prendre une autre boîte gélosée (4.2). Utiliser une autre pipette stérile (5.7) pour déposer 0,1 ml de la dilution à 10<sup>-1</sup> (produits liquides) ou 0,1 ml de la dilution à 10<sup>-2</sup> (autres produits).

**8.2.3** Si nécessaire, répéter le mode opératoire avec d'autres dilutions décimales, en utilisant une nouvelle pipette stérile pour chaque dilution.

**8.2.4** Etaler, uniformément et soigneusement, l'inoculum aussi rapidement que possible à la surface de la gélose, sans toucher les parois de la boîte avec la spatule (5.10). Il est possible d'utiliser la même spatule pour toutes les dilutions d'un échantillon en commençant par la dilution la plus élevée et en poursuivant dans l'ordre jusqu'à la dilution contenant la plus grande quantité de l'échantillon pour essai.

Laisser les boîtes gélosées en place, pendant environ 15 min, à température ambiante, pour permettre l'absorption de l'inoculum.

**8.2.5** Retourner les boîtes ainsi préparées et les placer dans l'étuve (5.3) réglée à 30 °C. Incuber pendant (72 ± 3) h.

**NOTE :** Pour l'ensemencement au moyen d'un dispositif d'ensemencement en spirale, voir le point 10.

### 8.3 Dénombrement des colonies :

**8.3.1** Après la période d'incubation spécifiée (8.2.3), choisir les boîtes gélosées comportant, si possible, moins de 300 colonies. Compter toutes les colonies à l'aide de l'appareil de comptage (5.8), si nécessaire. Il est important d'inclure dans le comptage les colonies de la taille d'une tête d'épingle ; toutefois, il est indispensable que le manipulateur évite de confondre les particules d'aliments avec les colonies en tête d'épingle.

**8.3.2** Les colonies envahissantes doivent être considérées comme une seule colonie, Si l'on s'attend à trouver des colonies envahissantes, examiner les boîtes après 24h ou 48h et marquer les colonies visibles. Si moins d'un quart (1/4) de la boîte est envahi par de telles colonies, compter les colonies de la partie non envahie et calculer le nombre de colonies correspondant à la boîte entière.

Si plus d'un quart (1/4) de la boîte est recouvert de colonies envahissantes, ne pas tenir compte de cette boîte pour le comptage. Si toutes les boîtes présentent des colonies envahissantes, procéder au comptage pour les boîtes où cela est possible et indiquer dans le rapport d'essai que les colonies envahissantes peuvent impacter les résultats.

## 9. EXPRESSION DES RESULTATS :

### 9.1 Mode de calcul cas général :

Pour qu'un résultat soit valable, on estime en général qu'il est nécessaire de compter les colonies sur, au moins, une boîte contenant, au moins, dix (10) colonies.

Calculer le nombre  $N$  de micro-organismes présents dans l'échantillon pour essai, en tant que moyenne pondérée à partir de deux (2) dilutions successives, à l'aide de l'équation suivante :

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

Ou :

$\sum c$  : la somme des colonies comptées sur les deux (2) boîtes retenues des deux (2) dilutions successives et dont, au moins, une (1) contient, au moins, dix (10) colonies ;

$V$  : le volume de l'inoculum déposé à chaque boîte, en millilitre ;

$d$  : la dilution correspondant à la première dilution retenue [ $d=1$  pour un produit liquide non dilué (échantillon pour essai)].

Si plus d'une dilution est utilisée, on s'attend à ce que le rapport entre le comptage des colonies de la deuxième dilution  $d_2$  et le comptage des colonies de la première dilution  $d_1$  soit égal à 10 %. Il convient que les limites supérieures et inférieures soient spécifiées par le laboratoire pour le comptage des colonies de la deuxième dilution  $d_2$ .

**EXEMPLE :** Si le comptage des colonies de la dilution  $d_1$  est de 250, il convient que le comptage des colonies de la deuxième dilution  $d_2$  ne soit pas inférieur à 13 (5,2%) et pas supérieur à 39 (15,6%).

Arrondir le résultat calculé à deux (2) chiffres significatifs, pour cela, si le troisième chiffre est inférieur à 5, ne pas modifier le chiffre précédent ; si le troisième chiffre est supérieur ou égal à 5, augmenter le chiffre précédent d'une unité.

Exprimer le résultat comme, de préférence, un nombre compris entre 1 et 9,9 multiplié par la puissance appropriée de 10, ou un nombre entier avec deux (2) chiffres significatifs.

Exprimer le résultat comme le nombre  $N$  de micro-organismes par millilitre (produits liquides) ou par gramme (autres produits).

**EXEMPLE :** Un comptage a donné les résultats suivants :

- à la première dilution retenue ( $10^{-2}$ ) : 168 colonies ;
- à la deuxième dilution retenue ( $10^{-3}$ ) : 14 colonies.

$$N = \frac{\sum c}{V \times 1,1 \times d} = \frac{168 + 14}{1 \times 1,1 \times 10^{-2}} = \frac{182}{0,011} = 16545$$

En arrondissant le résultat tel que spécifié ci-dessus, le nombre de micro-organismes est de 17 000 ou  $1,7 \times 10^4$  par millilitre ou par gramme de produit.

## 10. TECHNIQUE DE COMPTAGE DES COLONIES EN SURFACE AU MOYEN D'UN DISPOSITIF D'ENSEMENCEMENT EN SPIRALE :

### 10.1 GENERALITES :

La présente technique spécifie le dénombrement des micro-organismes présents dans les aliments destinés à la consommation humaine ou animale et les échantillons de l'environnement, au moyen d'un dispositif d'ensemencement en spirale et de comptage des colonies se développant sur un milieu solide après incubation aérobie (pour la définition des micro-organismes (2.1).

### 10.2 PRINCIPE :

L'échantillon liquide, ou une suspension, dans le cas d'autres produits, est déposé(e) en continu, en suivant la forme d'une spirale d'Archimède, à la surface d'une boîte gélosée décrivant un mouvement rotatif.

Le volume réparti diminue au fur et à mesure du déplacement du système de répartition (stylet ou micro-seringue stérile à usage unique) du centre vers la périphérie de la boîte, de sorte qu'une relation exponentielle existe entre le volume déposé et le rayon de la spirale.

Pendant l'incubation, les colonies se développent sur la gélose le long des lignes où le liquide a été déposé, une grille de comptage est étalonnée en fonction du volume d'échantillon déposé sur les différentes zones de gélose.

Les colonies dans une zone définie sont comptées et le nombre de colonies par millilitre ou par gramme est calculé. Le comptage peut, également, être réalisé au moyen d'un système automatisé.

### 10.3 MILIEUX DE CULTURE, DE SUSPENSION MERE ET DILUANT (4)

Les solutions citées ci-après, sont utilisées pour le nettoyage et la décontamination du stylet. Elles ne sont pas nécessaires pour les dispositifs d'ensemencement en spirale utilisant des micro-seringues à usage unique :

**10.3.1 Eau stérile.** Si les aliments sont susceptibles de contenir des matières grasses, du polysorbate 80 à 1 % en volume peut être ajouté.

**10.3.2 Solution d'hypochlorite de sodium,** à 5% de chlore actif.

### 10.4 APPAREILLAGE :

Appareillage courant utilisé en microbiologie, (5).

**10.4.1 Dispositif d'ensemencement en spirale,** réglé de façon à répartir un volume total d'échantillon déterminé de par exemple : 0,05 ml, 0,1 ml, 0,2 ml ou 0,4 ml par boîte et comprenant généralement une pompe à vide pour contrôler l'aspiration et le dépôt des suspensions d'échantillons, l'élimination des suspensions résiduelles, la désinfection et le rinçage du système. La pression résiduelle requise est comprise entre 24 kPa et 35 kPa (entre 160 mmHg et 260 mmHg).

**10.4.2 Appareil de comptage des colonies,** ayant une grille étalonnée en fonction du volume d'échantillon déposé dans les zones définies de gélose. D'autres systèmes automatisés de comptage peuvent, également, être utilisés.

**10.4.3 Godets pour échantillons stériles à usage unique, de 5 ml.** Des modèles d'appareil récents utilisent des récipients de différentes tailles, en particulier pour la désinfection et le rinçage.

**10.4.4 Micro-seringues stériles à usage unique** (facultatives).

**10.4.5 Boîtes gélosées préparées,** conformément à (4.2). Il est particulièrement important d'avoir une épaisseur suffisante et constante de gélose dans les boîtes, et que la surface de gélose soit plane. Identifier les boîtes sur le côté.

**10.5 Echantillonnage :** (6).

**10.6 Préparation de l'échantillon pour essai :** (7).

**10.7 Mode opératoire :**

**10.7.1 Prise d'essai, suspension mère et dilution :** (8.1).

En général, aucune dilution n'est nécessaire ou des dilutions en nombre moins élevé suffisent lors de l'utilisation de la technique d'ensemencement en spirale. Transférer, au moyen d'une pipette stérile, entre 3 ml et 5 ml d'échantillon homogénéisé dans un godet stérile de 5 ml, à usage unique (10.4.3).

Si nécessaire, laisser l'échantillon homogénéisé sédimenter pendant quelques minutes avant de prélever le surnageant pour l'ensemencement en spirale, la présence de particules pouvant obstruer le tuyau. En cas de bouchages fréquents, il est recommandé d'utiliser des sacs plastiques stériles avec filtres intégrés pour la préparation de la suspension mère des échantillons non liquides.

### 10.7.2 Réglage :

Régler et, si nécessaire, ajuster l'appareil conformément aux instructions du fabricant, en particulier vérifier que :

a) pour les machines à fonctionnement mécanique, le bras fonctionnant avec la came reste sur la came à la bonne hauteur, de manière à déposer le volume approprié ;

b) la boîte identifiée se trouve au centre du plateau tournant ;

c) l'extrémité du stylet ou la micro-seringue en contact forme un angle correct avec la surface de la gélose, conformément aux instructions du fabricant ;

d) le stylet se pose et se soulève aux points de repère — pour l'appareillage électronique, il est uniquement nécessaire de vérifier le point de départ.

Renouveler ces vérifications si, pendant le fonctionnement de l'appareil, le stylet a été endommagé ou décalé (visible par des dépôts mal répartis ou un mauvais alignement de l'extrémité du stylet avec le repère de départ se trouvant sur le plateau tournant de l'appareil).

### 10.7.3 Ensemencement :

#### 10.7.3.1 Généralités :

Les dispositions suivantes s'appliquent aux modèles manuels — les nouveaux modèles sont semi-automatiques et il convient de les faire fonctionner, conformément aux instructions du fabricant.

Remplir un premier godet à usage unique (10.4.3) avec la solution d'hypochlorite de sodium (10.3.2), un deuxième avec l'eau stérile et un troisième avec l'échantillon. Nettoyer l'embout du stylet avant utilisation, et désinfecter le stylet entre chaque ensemencement, en rinçant pendant 1 s avec l'hypochlorite de sodium et ensuite 1 s avec de l'eau stérile.

Après rinçage, descendre le stylet dans l'échantillon et ouvrir la valve de remplissage du dispositif d'aspiration. Aspirer l'échantillon par l'extrémité du stylet jusqu'à la formation d'une colonne continue de liquide dans le tube au-dessus de la valve de remplissage du dispositif d'aspiration. L'extrémité du stylet étant toujours en dessous du niveau de liquide, fermer la valve du dispositif d'aspiration. Relever l'extrémité du stylet et faire pivoter le dispositif maintenant l'échantillon pour le désengager. Placer sur le plateau tournant le fond d'une boîte gélosée précoulée, identifiée sur le côté, et abaisser le stylet jusqu'à ce que son extrémité repose sans contrainte à la surface de la gélose. Mettre en marche le moteur et laisser tourner le plateau jusqu'à ce que le stylet remonte et que l'appareil s'arrête automatiquement. Remettre le couvercle sur la boîte et la retirer du plateau tournant.

Après que chaque échantillon a été soumis à essai, rincer l'appareil avec la solution d'hypochlorite et l'eau comme décrit précédemment. Entre chaque utilisation, le laisser rempli avec de l'eau.

Si plus d'une dilution de l'échantillon est à ensemer, commencer avec la dilution la plus élevée.

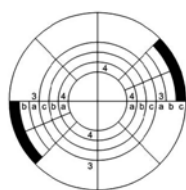
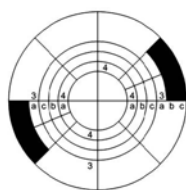
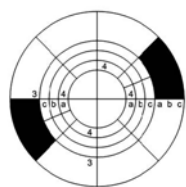
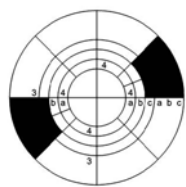
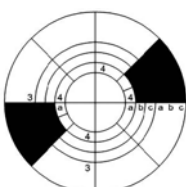
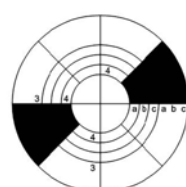
Laisser les boîtes avec leurs couvercles fermés pendant 15 min environ, à température ambiante, pour absorption de l'inoculum dans la gélose.

#### 10.7.3.2 Contrôle de stérilité du dispositif d'ensemencement en spirale :

Contrôler la stérilité du dispositif d'ensemencement en spirale en utilisant de l'eau stérile avant et après l'examen de chaque série d'échantillons.

**10.7.4 Incubation :** (8.2.5).**10.7.5 Dénombrement des colonies :****10.7.5.1 Grille de comptage :**

Deux (2) grilles de comptage sont disponibles, selon la dimension de la boîte. La grille de comptage se présente sous forme de disque transparent de 150 mm de diamètre, toutefois, pour les boîtes de 90 mm, seule la partie intérieure du cercle, d'un diamètre de 90 mm, est utilisée. Utiliser les grilles de comptage fournies avec l'appareil et conformément aux instructions du fabricant. La grille est utilisée pour relier le nombre de colonies sur une boîte ensemencée en spirale au volume de l'inoculum étalé initialement. Voir les exemples à la figure des zones de comptage.

**Figure des zones de comptage.****Zone 3c — 0,0005 ml****Zone 3b — 0,0015 ml****Zone 3a — 0,0025 ml****Zone 4c — 0,0038 ml****Zone 4b — 0,0060 ml****Zone 4a — 0,0090 ml****10.7.5.2 Etalonnage et vérification :**

Les volumes correspondant aux différents segments de la grille sont indiqués dans le manuel d'instruction du dispositif d'ensemencement en spirale. Pour un étalonnage précis, les volumes correspondant aux zones de la grille doivent être contrôlés par une personne expérimentée.

Pour vérifier les volumes correspondant à chaque segment, préparer 11 concentrations bactériennes dans une plage comprise entre 10<sup>6</sup> cellules/ml et 10<sup>3</sup> cellules/ml en réalisant des dilutions 1 + 1 d'une suspension de bactéries non envahissantes. Ensemencer toutes les dilutions en double comme spécifié en (8.2), au moyen du dispositif d'ensemencement en spirale, en utilisant le même milieu et la même étuve. Après incubation, calculer le volume correspondant à la zone de grille comptée, donné par :

$$V = \frac{C_A}{C_{ml}}$$

Où :

V : est le volume pour une zone de la grille (en ml) ;

CA : est le nombre de colonies comptées dans cette zone ;

C<sub>ml</sub> : est le nombre de colonies réel par millilitre.

Contrôler le volume total déposé par le dispositif d'ensemencement à spirale en pesant la quantité distribuée sur une balance analytique avec une précision de ± 2 mg.

**10.7.5.3 Examen et inscription dans le rapport du nombre de colonies ensemencées en spirale (méthode manuelle) :**

Centrer la boîte ensemencée sur la grille. Sélectionner les segments et compter les colonies en partant de l'extérieur jusqu'au centre et jusqu'à ce que vingt (20) colonies aient été comptées.

Continuer à compter les colonies présentes dans la zone (c'est-à-dire dans le segment ou dans la subdivision de segment) dans laquelle la 20<sup>ème</sup> colonie a été repérée. Consigner ce nombre ainsi que le numéro de la zone comprenant la 20<sup>ème</sup> colonie (par exemple 3c, 3b, 3a, 4c, 4b, 4a) indiqué sur la figure des zones de comptage. Compter dans la même zone, du côté opposé de la boîte, et diviser le nombre total de deux (2) zones par le volume connu qui a été déposé dans ces zones, ce qui donne le nombre de colonies par millilitre.

Si le nombre total de colonies comptées est supérieur à 75 et si le comptage des colonies dans la zone contenant la 20<sup>ème</sup> colonie est terminé, le nombre de ces colonies est, en général, inférieur en raison de l'erreur de coïncidence liée au développement d'un nombre important de colonies.

Il est recommandé de compter les segments annulaires adjacents autour de la circonférence jusqu'à dénombrer un total d'au moins 50 colonies. Calculer le résultat en divisant le nombre de colonies comptées par le volume de ces zones.

Si moins de 20 colonies sont comptées sur toute la boîte, l'intervalle de confiance du dénombrement est élevé. Si le nombre de colonies comptées est supérieur à 75 dans la première zone, par exemple, la zone 3c, enregistrer les résultats comme étant estimés > 300 000 colonies/ml.

**10.7.5.4 Examen et inscription dans le rapport du nombre de colonies ensemencées en spirale (au moyen d'un appareil de comptage électronique) :**

Suivre les instructions du fabricant, mais procéder à un contrôle en utilisant la méthode manuelle (10.7.5.3), au moins, lors de la première utilisation de l'appareil ou de l'examen d'un nouvel aliment.

**10.8 Calcul et expression des résultats :**

Calculer le nombre de colonies ensemencées en spirale. Consigner le résultat comme étant le nombre de colonies ensemencées en spirale par millilitre ou par gramme, selon le cas.