

MINISTERE DU COMMERCE

Arrêté du 14 Chaâbane 1436 correspondant au 2 juin 2015 rendant obligatoire la méthode horizontale pour le dénombrement des levures et moisissures par comptage des colonies dans les produits, dont l'activité d'eau est supérieure à 0,95.

— — — —

Le ministre du commerce ;

Vu le décret présidentiel n° 15-125 du 25 Rajab 1436 correspondant au 14 mai 2015 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° 05-465 du 4 Dhou El Kaada 1426 correspondant au 6 décembre 2005 relatif à l'évaluation de la conformité ;

Vu le décret exécutif n° 13-328 du 20 Dhou El Kaada 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 l'arrêté du 14 Safar 1415 correspondant au 23 juillet 1994, modifié et complété, relatif aux spécifications micro biologiques 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 la méthode horizontale pour le dénombrement des levures et moisissures par comptage des colonies dans les produits, dont l'activité d'eau est supérieure à 0,95.

Art. 2. — Pour le dénombrement des levures et moisissures par comptage des colonies dans les produits, dont l'activité d'eau est supérieure à 0,95, 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.

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 14 Chaâbane 1436 correspondant au 2 juin 2015.

Amara BENYOUNES.

ANNEXE

Méthode horizontale pour le dénombrement des levures et moisissures par comptage des colonies dans les produits, dont l'activité d'eau est supérieure à 0,95.**1- Domaine d'application**

La présente méthode spécifie une technique horizontale pour le dénombrement des levures et des moisissures viables présentes dans les produits destinés à la consommation humaine ou animale, dont l'activité d'eau est supérieure à 0,95 [œufs, viande, produits laitiers (excepté le lait en poudre), fruits, légumes, pâtes fraîches, etc] au moyen de la technique par comptage des colonies à $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

Cette méthode ne permet pas le dénombrement des spores de moisissures et ne s'applique pas à l'identification de la flore fongique ou à l'examen des aliments pour la recherche des mycotoxines.

La présente méthode n'est pas appropriée pour le dénombrement de champignons résistants à la chaleur, tels que les *Byssoschlamys fulva* ou *Byssoschlamys nivea* présents dans les fruits et légumes en conserve ou en bouteille.

2. Termes et définitions

Pour les besoins de la présente méthode, les termes et définitions suivantes s'appliquent :

2.1 Levure :

Micro-organisme aérobie, mésophile qui, à 25°C et en utilisant un milieu gélosé dans les conditions décrites dans la présente méthode, se développe à la surface du milieu en formant des colonies (2.4) présentant le plus souvent un contour régulier et une surface plus au moins convexe.

Des levures se développant en profondeur, plutôt qu'à la surface d'un milieu, peuvent former des colonies rondes et lenticulaires.

2.2 Moisissure :

Micro-organisme aérobie, mésophile filamentueux qui, à la surface d'un milieu gélosé et dans les conditions décrites dans la présente méthode, développe habituellement des **propagules** ou des **germes** (2.3) plats ou duveteux ou des **colonies** (2.4) présentant souvent des fructifications colorées et des formes de sporulation.

Des moisissures se développant en profondeur, plutôt qu'à la surface d'un milieu, peuvent former des colonies rondes et lenticulaires.

Note : Il existe des formes intermédiaires des micro-organismes. La distinction entre une **levure** (2.1) et une **moisissure** (2.2) peut être arbitraire.

2.3 Propagule ou germe :

Entité viable, capable de se développer dans un milieu nutritif.

Exemple : Cellule végétative, groupe de cellules, spore, groupe de spores ou morceau de mycélium fongique.

2.4 Colonie :

Accumulation visible localisée de masse microbienne développée sur ou dans un milieu nutritif solide à partir d'une cellule viable.

3. Principe

3.1 Des boîtes de Petri préparées en utilisant un milieu de culture sélectif défini sontensemencées.

En fonction du nombre de colonies attendu, une quantité spécifique de l'échantillon pour essai (si le produit est liquide) ou de la suspension mère (dans le cas d'autres produits) ou des dilutions décimales de l'échantillon ou de la suspension mère est utilisée.

Des boîtes supplémentaires peuvent êtreensemencées dans les mêmes conditions ; en utilisant des dilutions décimales obtenues à partir de l'échantillon pour essai ou de la suspension mère.

3.2 Les boîtes sont ensuite incubées en aérobie à $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ pendant cinq (5) jours. Puis, si nécessaire, les boîtes de gélose sont laissées au repos à la lumière du jour pendant un (1) à deux (2) jours.

3.3 Les colonies ou propagules sont alors comptées et, si nécessaire (pour distinguer les colonies de levures et des bactéries). L'identité des colonies douteuses est confirmée par examen à la loupe binoculaire ou au microscope.

3.4 Le nombre de levures et de moisissures par gramme ou par millilitre d'échantillon est calculé à partir du nombre de colonies ou propagules ou germes obtenus sur les boîtes choisies à des taux de dilution permettant d'obtenir des colonies pouvant être dénombrées. Les moisissures et les levures sont comptées séparément, si nécessaire.

4. Diluant et milieu de culture**4.1 Diluant****4.1.1 Généralités**

Il est possible d'ajouter des agents tensioactifs, tels que le poly (oxyéthylène) sorbitan monooléate [par exemple Tween 80*] (0,05 %, concentration en masse) pour réduire l'agglutination des spores de moisissures et des conidies.

Sauf dans le cas d'une préparation spécifique de l'échantillon pour essai, il est recommandé d'utiliser de l'eau peptonée à 0,1 % (concentration en masse) comme diluant.

4.1.2 Composition de l'eau peptonée à 0,1% (concentration en masse)

Digestat enzymatique de tissus animaux et végétaux	1g
Eau	1000 ml

4.1.3 Préparation de l'eau peptonée à 0,1 % (concentration en masse)

Dissoudre les composants dans l'eau, en chauffant si nécessaire.

Si nécessaire, ajuster le pH (5.4) à $7 \pm 0,2$ à 25° C après stérilisation.

4.2 Milieu de culture

4.2.1 Dichloran rose bengalechloramphenicol agar (DRBC)

4.2.1.1 Composition

Digestat enzymatique de tissus animaux et végétaux	5 g
D-Glucose ($C_6H_{12}O_6$)	10 g
Phosphate monopotassique (KH_2PO_4)	1 g
Sulfate de magnésium ($MgSO_4, H_2O$)	0,5 g
Dichloran (2,6-dichloro-4-nitroaniline)	0,002 g
Rose ben gale	0,025 g
Gélose	12 g à 15 g ^a
Chloramphénicol	0,1 g
Eau, distillée ou déionisée	1000 ml
^a : En fonction du pouvoir gélifiant de la gélose.	

* Des produits équivalents peuvent être utilisés s'il est démontré qu'ils conduisent aux mêmes résultats.

4.2.1.2 Préparation

4.2.1.2.1 Généralités

Mettre tous les ingrédients, excepté le chloramphénicol, en suspension dans l'eau et porter à ébullition pour dissoudre complètement. Si nécessaire, ajuster le pH (5.4) à $5,6 \pm 0,2$ à 25° C, après stérilisation.

Ajouter 10 ml de solution à 1 % (concentration en masse) dans l'éthanol de chloramphénicol et mélanger. Répartir le milieu dans des récipients appropriés (5.5). Stériliser à l'autoclave à 121° C pendant 15 min.

Refroidir immédiatement le milieu dans un bain-marie (5.3) maintenu à une température comprise entre 44° C et 47° C. Répartir ce milieu par portions de 15 ml dans des boîtes de Petri stériles (5.6).

— laisser le milieu se solidifier et sécher

— utiliser immédiatement ou conserver dans l'obscurité jusqu'à son utilisation.

Note - Eviter l'exposition du milieu à la lumière, car les produits de décomposition cytotoxiques peuvent causer la sous-évaluation de la mycoflore dans les échantillons.

4.2.1.2.2 Addition facultative de chlorhydrate de chlortétracycline

Lorsque la prolifération bactérienne peut poser un problème (par exemple dans les viandes crues), il est recommandé d'utiliser le chloramphénicol (50 mg/l) et la chlortétracycline (50 mg/l).

Dans ce cas, préparer le milieu de base (4.2.1.2), comme décrit ci-dessus, avec seulement 50 mg de chloramphénicol, le répartir par quantité de 100 ml et stériliser.

Préparer également une solution avec 0,1% (concentration en masse) de chlorhydrate de chlortétracycline dans de l'eau (relativement instable en solution, elle doit être préparée extemporanément) et stériliser par filtration. Juste avant l'utilisation, ajouter 5 ml de cette solution de manière stérile à 100 ml du milieu de base et verser dans les boîtes. La gentamicine est déconseillée, car elle peut causer l'inhibition de certaines espèces de levures.

4.2.1.2.3 Addition facultative d'éléments trace

Pour que les moisissures présentent toutes leur morphologie, notamment tous les pigments qu'elles produisent habituellement, elles ont besoin d'éléments trace qui ne sont pas présents dans le DRBC.

Pour identifier les moisissures dans ce milieu, ajouter la solution d'éléments trace suivante à 1 ml par litre de milieu, avant passage à l'autoclave :

— $ZnSO_4, 7H_2O$: 1g ;

— $CuSO_4, 5H_2O$: 0,5g ;

— 100 ml d'eau, distillée ou déionisée.

4.2.1.2.4 Addition facultative de Tergitol *

Afin d'éviter la prolifération de *Mucoraceae* dans les boîtes de gélose, il est recommandé d'ajouter du Tergitol (1 ml/l) au milieu de culture.

4.2.1.3 Essai de performance pour l'assurance de la qualité du milieu de culture

4.2.1.3.1 Généralité

Le milieu DRBC est un milieu solide. La productivité et la sélectivité doivent être soumises à essai selon les spécifications suivantes :

4.2.1.3.2 Productivité

— **incubation** : Cinq (5) jours à $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

— **souches** :

Saccharomyces cerevisiae ATCC 9763 ;

Candida albicans ATCC 10231 ;

Aspergillus niger ATCC 16404 ;

Mucor racemosus ATCC 42647.

Ou souches enregistrées comme équivalentes dans d'autres collections fongiques.

* Des produits équivalents peuvent être utilisés s'il est démontré qu'ils conduisent aux mêmes résultats.

— **milieux de référence** : Milieux de culture « Sabouraud Dextrose Agar » (SDA).

— **méthode de contrôle** : Quantitative.

— **critères** : Rapport de productivité, $P_R \geq 0,5$

— **réaction caractéristique** : Colonies ou propagules ou germes caractéristiques selon chaque espèce.

4.2.1.3.3 Sélectivité

— **incubation** : Cinq (5) jours à $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

— **souches** :

Escherichia coli ATCC 25922 ;

Ou *Bacillus subtilis* ATCC 6633 ;

Ou souches enregistrées comme équivalentes dans d'autres collections de bactéries.

— **méthode de contrôle** : Qualitative.

— **critères** : Inhibition totale.

5. Appareillage et verrerie

L'utilisation de matériel à usage unique est une alternative acceptable à l'utilisation de verrerie réutilisable, à condition qu'il réponde aux exigences spécifiées.

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

5.1 Etuve, pouvant fonctionner à $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

5.2 Pipettes à écoulement total, stériles, d'une capacité nominale de 1 ml et graduées à 0,1 ml.

5.3 Bain-marie, ou appareillage similaire, pouvant fonctionner de 44°C à 47°C .

5.4 pH-mètre, précis à $\pm 0,1$ unité de pH à 25°C .

5.5 Flacons, fioles et tubes, pour bouillir et conserver les milieux de culture et pour effectuer des dilutions.

5.6 Boîtes de petri, stériles, en verre ou en plastique, de 90 mm à 100 mm de diamètre.

5.7 Microscope, pour distinguer les levures des cellules bactériennes (fond clair, grossissement de x 250 à x 1000).

5.8 Étaleurs, en verre ou en plastique (de diamètre inférieur à 2 mm et de longueur 80 mm). Il convient que le diamètre des étaleurs ne dépasse pas 2 mm afin de minimiser la quantité d'échantillon y adhérent à la fin de l'étalement.

5.9 Loupe binoculaire, (grossissement x 6,5 à x 50) pour distinguer et différencier les colonies ou les cellules des levures et moisissures.

6. Echantillonnage

Il convient que l'échantillon envoyé au laboratoire soit réellement représentatif, non endommagé ou modifié lors du transport et de l'entreposage. L'échantillon pour le laboratoire ne doit pas être congelé.

L'échantillonnage et la préparation de l'échantillon pour essai se font dans des conditions appropriées.

7. Mode Opérateur

7.1 Prise d'essai, suspension mère et dilutions

Préparer la prise d'essai, la suspension mère (première dilution) et les dilutions suivantes selon des exigences réglementaires et normatives spécifiques et appropriées au produit concerné. Sauf dans le cas d'une préparation spécifique de l'échantillon pour essai, il est recommandé d'utiliser de l'eau peptonée à 0,1 % (concentration en masse) (4.1.3) comme diluant.

Utiliser un homogénéisateur péristaltique de préférence à un mélangeur ou à un agitateur.

En raison de la sédimentation rapide des spores dans la pipette, maintenir la pipette (5.2) horizontale (et non verticale) lorsqu'elle est remplie du volume approprié de suspension mère et de dilutions.

Agiter la suspension mère et les dilutions afin d'éviter la sédimentation de particules contenant des micro-organismes.

7.2 Ensemencement et incubation

7.2.1 Dans une boîte de gélose de **DRBC** (4.2.1), transférer avec une pipette (5.2) stérile, 0,1 ml de l'échantillon pour essai s'il est liquide ou 0,1 ml de la suspension mère dans le cas d'autres produits.

Dans une deuxième boîte de gélose **DRBC** (4.2.1), transférer à l'aide d'une nouvelle pipette stérile 0,1 ml de la première dilution décimale (10^{-1}) (produit liquide), ou 0,1 ml de la dilution (10^{-2}) (autres produits).

Pour faciliter le dénombrement de faibles populations de levures et de moisissures, des volumes, jusqu'à 0,3 ml d'une dilution (10^{-1}) de l'échantillon ou de l'échantillon pour essai, s'il est liquide, peuvent être répartis dans trois (3) boîtes.

Procéder de la même façon avec les dilutions suivantes en utilisant une nouvelle pipette (5.2) stérile à chaque dilution décimale.

Note : Si la présence de moisissures se développant rapidement est suspectée, se référer à la méthode horizontale pour le dénombrement des levures et moisissures par comptage des colonies dans les produits à activité d'eau inférieure ou égale à 0.95.

7.2.2 Etaler l'inoculum sur la surface de la boîte de gélose avec un étaleur (5.8) stérile jusqu'à ce que le liquide soit entièrement absorbé par le milieu.

L'ensemencement des boîtes par inclusion peut également être utilisé, mais dans ce cas, l'équivalence des résultats doit être validée par rapport à l'ensemencement en surface, et la distinction et la différenciation des moisissures et des levures ne sont pas possibles.

La méthode d'étalement en surface peut donner des dénombrements supérieurs. La technique de l'inoculation en surface facilite l'exposition maximale des cellules à l'oxygène atmosphérique et évite l'inactivation thermique des propagules fongiques.

Les résultats dépendent du type de champignons.

7.2.3 Incuber en aérobiose les boîtes préparées (7.2.2), couvercles en haut, en position droite dans l'étuve (5.1) à $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ pendant cinq (5) jours. Si nécessaire, laisser reposer les boîtes de gélose à la lumière du jour pendant un (1) à deux (2) jours.

Il est recommandé d'incuber les boîtes (5.6) dans un sac plastique ouvert afin d'éviter la contamination de l'étuve en cas de dissémination des moisissures à l'extérieur des boîtes.

7.3 Comptage et sélection des colonies pour confirmation

Lire les boîtes entre deux (2) jours et cinq (5) jours d'incubation. Sélectionner les boîtes (7.2.3) contenant moins de 150 colonies ou propagules ou germes et compter ces colonies ou propagules ou germes.

Si l'on observe un envahissement rapide des boîtes, retenir les comptages obtenus après deux (2) jours, puis de nouveau après cinq (5) jours d'incubation.

Note 1 : Les méthodes de dénombrement des levures et en particulier des moisissures sont imprécises du fait qu'elles consistent en un mélange de mycélium, de spores asexués et sexués. Le nombre d'unité à l'origine de la formation de colonies dépend du degré de fragmentation du mycélium et de la proportion de spores capables de se développer sur le milieu.

Note 2 : Des comptages non linéaires à partir des dilutions décimales se produisent souvent, c'est-à-dire qu'une dilution d'un facteur 10 de l'échantillon n'aboutit généralement pas à une réduction d'un facteur 10 du nombre de colonies à la surface de la boîte de Pétri. Cela est dû à la fragmentation du mycélium et à la dispersion des spores pendant la dilution et à la compétition entre espèces lorsqu'un grand nombre de colonies sont présentes dans la boîte de petri.

Remarque - Les spores des moisissures se disséminent facilement dans l'air, à ce titre, manipuler les boîtes de petri avec précaution pour éviter leur prolifération qui pourrait engendrer une surestimation de la population dans l'échantillon.

Si nécessaire, effectuer un examen à l'aide de la loupe binoculaire (5.9) ou du microscope (5.7) afin de différencier les cellules de levures ou de moisissures des colonies de bactéries.

Les colonies de levures et les colonies propagules de moisissures sont comptées séparément, si nécessaire.

Pour l'identification des levures et des moisissures, sélectionner des zones de développement fongique et effectuer un prélèvement pour un examen microscopique approfondi ou un ensemencement dans des milieux d'isolation ou d'identification appropriés.

8. Expression des résultats et limites de confiance

Les résultats et les limites de confiance doivent être exprimés selon les exigences générales et les recommandations relatives à la microbiologie des aliments.

Compter les colonies de levures et les colonies ou propagules de moisissures séparément, si nécessaire.