

MINISTERE DU COMMERCE

Arrêté du 19 Chaoual 1436 correspondant au 4 août 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 inférieure ou égale à 0,95.

— — — —

Le ministre du commerce,

Vu le décret présidentiel n° 15-125 du 25 Rajab 1436 correspondant au 14 mai 2015, 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 ;

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 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 la méthode horizontale pour le dénombrement des levures et moisissures par comptage des colonies dans les produits, dont l'activité d'eau est inférieure ou égale 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 inférieure ou égale 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 19 Chaoual 1436 correspondant au 4 août 2015.

Bakhti BELAIB.

ANNEXE

**METHODE HORIZONTALE POUR
LE DENOMBREMENT DES LEVURES
ET MOISSURES PAR COMPTAGE DES
COLONIES DANS LES PRODUITS, DONT
L'ACTIVITE D'EAU EST INFÉRIEURE
OU ÉGALE A 0.95**

1. DOMAINE D'APPLICATION

La présente méthode spécifie une technique horizontale de dénombrement des levures osmophiles et des moisissures xérophiles dans les produits destinés à la consommation humaine ou animale, dont l'activité d'eau est inférieure ou égale à 0,95 au moyen de la technique par comptage des colonies à 25 °C ± 1°C [fruits secs, gâteaux, confitures, viande séchée, poisson salé, grains, céréales et produits à base de céréales, farines, noix, épices et condiments, etc].

La présente méthode ne s'applique pas aux produits déshydratés dont l'activité d'eau est inférieure ou égale à 0,60 (céréales déshydratées, produits oléagineux, épices, légumineuses, graines, poudres pour boissons instantanées, produits anhydres pour animaux domestiques, etc.) et ne permet pas le dénombrement des spores de moisissures. Cette méthode ne s'applique pas également, à l'identification de la flore fongique ou à l'examen des aliments pour la recherche de mycotoxines ; et elle n'est pas appropriée au dénombrement des moisissures halophiles xérophiles (*Polypaecilum pisce* et *Basipetospora halophila*), qui peuvent notamment se trouver dans le poisson séché.

2. TERMES ET DEFINITIONS

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 ou 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 filamenteux 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.

2.5 levure osmophile et moisissure xérophile :

Champignon capable de se développer avec une activité d'eau inférieure ou égale à 0,95.

3. PRINCIPE

3.1 Des boîtes de Petri préparées en utilisant un milieu de culture sélectif défini sont ensemencées. 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 suspension mère est utilisée.

Des boîtes de Petri supplémentaires peuvent être ensemencées 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 de Petri sont ensuite incubées en aérobiose à 25 °C ± 1°C pendant cinq (5) à sept (7) 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 levure et de bactérie), 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 de Petri 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

L'utilisation d'un diluant comportant une quantité suffisante de soluté [par exemple une solution de 20 % à 35 % (concentration en masse) de glycérol ou de D-glucose] est recommandée pour réduire le choc osmotique des moisissures xérophiles et des levures osmophiles lorsque des dilutions en série sont effectuées avant l'ensemencement.

Note : il est possible d'ajouter des agents tensioactifs, tel que le poly (oxyéthylène) sorbitan monooléate 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	1 g
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 ± 0,2 à 25 °C après stérilisation.

4.2 Milieu de culture

4.2.1 Gélose dichloran à 18% (concentration en masse) de glycérol (DG 18)

4.2.1.1 Composition

Digestat enzymatique de caséine	5 g
D-Glucose (C ₆ H ₁₂ O ₆)	10 g
Phosphate monopotassique (KH ₂ PO ₄)	1 g
Sulfate de magnésium (MgSO ₄ H ₂ O)	0,5 g
Dichloran (2,6-dichloro-4-nitro-aniline)	0,002 g
Glycérol anhydre	220 g
Gélose	12 g à 15g ^a
Chloramphénicol	0,1 g
Eau distillée ou déionisée	1000 ml
^a : en fonction du pouvoir gélifiant de la gélose	

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 ± 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, si nécessaire, la surface des boîtes de Petri. Utiliser immédiatement ou conserver dans l'obscurité, jusqu'à son utilisation.

Remarque : 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 problème, il est recommandé d'utiliser le chloramphénicol (50 mg/l) et la chlortétracycline (50 mg/l). Dans ce cas, préparer le milieu de base, comme décrit ci-dessus, (4.2.1.2), avec seulement 50 mg de chloramphénicol, le répartir par quantités 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 de Petri. 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 toute leur morphologie, notamment tous les pigments qu'elles produisent habituellement, elles ont besoin d'éléments trace qui ne sont pas présents dans le DG 18 (4.2.1).

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 :

- $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1 g ;
- $\text{Cu SO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0,5 g ;
- 100 ml d'eau distillée ou déionisée.

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

4.2.1.3.1 Généralités

Le milieu DG 18 (4.2.1) 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 °C ± 1 °C.

Souches :

- *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763
- *Wallemia sebi* ATCC 42694

— *Aspergillus restrictus* ATCC 42693

— *Eurotium rubrum* ATCC 42690

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

Milieux de référence : milieux de culture SDA (Sabouraud Dextrose Agar)

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 °C ± 1 °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 répond aux exigences spécifiées.

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

5.1 Etuve, pouvant fonctionner à 25 °C ± 1 °C

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

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

5.4 pH-mètre, précis à ± 0,1 unité de pH à 25 °C.

5.5 Bouteilles, 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 de cellules bactériennes (fond clair, grossissement de x 250 à x 1000).

5.8 Étaleurs, en verre ou en plastique (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 adhérant à la fin de l'étalement.

5.9 Loupe binoculaire, (grossissement de x 6.5 à x 50) pour distinguer et différencier les colonies ou cellules des levures et moisissures.

6. ECHANTILLONNAGE

Il convient qu'un échantillon représentatif, non endommagé ou altéré au cours du transport ou de l'entreposage, ait été envoyé au laboratoire. L'échantillon pour laboratoire ne doit pas être congelé.

7. MODE OPERATOIRE POUR LA PREPARATION DE L'ECHANTILLON POUR ESSAI

7.1 Prise d'essai, suspension mère et dilutions

Préparer la prise d'essai, la suspension mère (première dilution) et les dilutions suivantes selon les exigences réglementaires et normatives spécifiques et appropriées aux produits concernés.

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 un agitateur.

En raison de la sédimentation rapide des spores dans la pipette, maintenir la pipette (5.2) horizontale lorsqu'elle est remplie du volume approprié de la 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 DG 18 (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 DG 18 (4.2.1), transférer avec 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 de Petri.

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

Pour les aliments solides ou particuliers, tels que les noix ou les grains, l'ensemencement direct est recommandé.

Les échantillons de ces types de produits sont désinfectés en surface dans une solution de 0,35 % (1000 µg/g) d'hypochlorite de sodium pendant 2 min, puis rincés avec de l'eau distillée stérile, séchés sur un papier stérile et placés sur un milieu gélosé.

7.2.2 Étaler le liquide sur la surface de la boîte de gélose avec un étaleur (5.8) stérile jusqu'à ce que le liquide soit entièrement absorbé par les milieux.

L'ensemencement des boîtes par inclusion peut également être utilisée, 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) à sept (7) jours. Si nécessaire, laisser reposer les boîtes de gélose à la lumière du jour pendant un (1) à deux (2) jours.

Si la présence de *Xeromyces bisporus* est suspectée, incuber les boîtes pendant dix (10) jours.

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

7.3 Comptage et sélection des colonies pour confirmation

Après la période d'incubation spécifiée, sélectionner les boîtes (7.2.3) contenant moins de 150 colonies ou propagules ou germes et compter ces colonies ou propagules ou germes.

Si on observe un envahissement rapide des boîtes, compter les colonies ou propagules ou germes après deux (2) jours, puis de nouveau après cinq (5) à sept (7) 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'unités 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 petri. 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 pétri.

Remarque : les spores des moisissures se disséminent dans l'air aisément, 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 ou les 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 RESULTATS 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.