

**Arrêté du 26 Jomada El Oula 1438 correspondant au 23 février 2017 rendant obligatoire la méthode de dénombrement des unités formant colonie de levures et/ou de moisissures dans le lait et les produits laitiers par la technique de comptage des colonies à 25 °C.**

-----

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 présidentiel n° 17-25 du 19 Rabie Ethani 1438 correspondant au 18 janvier 2017 chargeant le ministre de l'habitat, de l'urbanisme et de la ville de l'intérim du ministre du commerce ;

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° 05-465 du 4 Dhou EL Kaâda 1426 correspondant au 6 décembre 2005 relatif à l'évaluation de la conformité ;

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 microbiologique ;

**Arrête :**

Article 1er. — En application des dispositions de l'article 19 du décret exécutif n° 90-39 du 30 janvier 1990, modifié et complété, susvisé, le présent arrêté a pour objet de rendre obligatoire la méthode de dénombrement des unités formant colonie de levures et/ou de moisissures dans le lait et les produits laitiers par la technique de comptage des colonies à 25 °C.

Art. 2. — Pour le dénombrement des unités formant colonie (UFC) de levures et/ou de moisissures dans le lait et les produits laitiers par la technique de comptage des colonies à 25 °C, les laboratoires 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, 26 Joumada El Oula 1438 correspondant au 23 février 2017.

Abdelmadjid TEBBOUNE.

ANNEXE

**Méthode de dénombrement des unités formant colonie (UFC) de levures et/ou de moisissures dans le lait et les produits laitiers par la technique de comptage des colonies à 25 °C.**

**1. Objet et domaine d'application :**

La présente méthode spécifie une technique de dénombrement des unités formant colonie (UFC) de levures et/ou de moisissures dans le lait et les produits laitiers par la technique de comptage des colonies à 25 °C.

Cette méthode s'applique aux produits suivants :

- lait, produits laitiers liquides ;
- lait sec, poudre de lactosérum non acide, babeurre en poudre, lactose ;
- fromages, beurre, caséine acide, caséine lactique, caséine-présure, caséinates, poudre de lactosérum acide ;
- produits laitiers congelés (y compris les glaces de consommation) ;
- flans, desserts, laits fermentés et crèmes.

**Note 1 :**

Cette méthode n'est pas applicable à la détermination d'un très grand nombre de levures thermolabiles (dans le fromage frais). Dans ce cas, il est préférable d'utiliser la technique d'ensemencement en surface.

**2. Termes et définitions :**

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

**Levures et moisissures :** micro-organismes qui, à 25 °C, forment des colonies dans un milieu sélectif selon le mode opératoire fixé dans la présente méthode.

**3. Principe :**

**3.1.** Ensemencement en profondeur d'un milieu de culture sélectif bien défini, coulé dans des boîtes de petri avec :

- une quantité spécifiée de l'échantillon pour essai, quand le produit à examiner est liquide ;
- une quantité déterminée de la suspension mère dans le cas d'autres produits.

Préparation d'autres boîtes dans les mêmes conditions, en utilisant des dilutions décimales de l'échantillon pour essai ou de la suspension mère.

**3.2.** Incubation des boîtes en aérobiose à 25 °C pendant 5 jours.

**3.3.** Calcul du nombre d'unités formant colonie (UFC) de levures et/ou de moisissures par gramme ou par millilitre d'échantillon en se basant sur le nombre de colonies obtenues dans des boîtes choisies à des niveaux de dilution permettant d'obtenir un résultat significatif.

**4. Diluants :**

Il convient de préparer les diluants conformément aux méthodes d'analyses spécifiées dans la réglementation en vigueur relative à la préparation de l'échantillon, de la suspension mère et des dilutions décimales en vue de l'examen microbiologique.

**5. milieux de culture :**

**5.1.** Milieu à l'extrait de levure, dextrose, oxytétracycline et agar-agar :

**5.1.1** Milieu de base :

**5.1.1.1** Composition :

Extrait de levure en poudre.....	5 g
Glucose (C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub> ).....	20 g
Agar-agar.....	10 g à 15 g <sup>1</sup>
Eau.....	900 ml.
1: selon le pouvoir gélifiant de l'agar-agar.	

**5.1.1.2 Préparation :**

Dissoudre les composants du milieu de base ou du milieu deshydraté en chauffant, si nécessaire.

Ajuster, si nécessaire, le pH de sorte qu'après stérilisation, il soit de 6,6 à 25 °C.

Stériliser à l'autoclave (6.1) à 121 °C ± 1 °C pendant 15 min.

**5.1.2 solution au chlorhydrate d'oxytétracycline :****5.1.2.1 Composition :**

Chlorhydrate d'oxytétracycline (C <sub>22</sub> H <sub>30</sub> O <sub>11</sub> ·HCl).....	50 mg
Eau.....	50 ml.

**5.1.2.2. Préparation :**

Dissoudre le chlorhydrate d'oxytétracycline dans l'eau. La solution doit être préparée juste avant l'emploi. Stériliser cette solution par filtration.

**5.1.3 Milieu complet :****5.1.3.1 Composition :**

Solution de chlorhydrate d'oxytétracycline.....	10 ml
Milieu de base.....	90 ml.

**5.1.3.2 Préparation :**

Refroidir le milieu de base stérilisé (5.1.1) à 45 °C. Amener juste avant l'emploi, la solution de chlorhydrate d'oxytétracycline (5.1.2) à 45 °C. Ajouter 10 ml de cette solution aseptiquement à 90 ml du milieu de base.

**5.2. Milieu à l'extrait de levure, glucose, chloramphénicol et agar-agar :****5.2.1 Composition :**

Extrait de levure.....	5g
Glucose (C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub> ).....	20 g
Chloramphénicol (C <sub>11</sub> H <sub>12</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub> ).....	0,1 g <sup>1</sup>
Agar-agar.....	12 g à 15 g <sup>2</sup>
Eau.....	1000 ml.
1: En vue d'obtenir une concentration finale de 100 µg/ml du milieu.	
2 : Selon le pouvoir gélifiant de l'agar-agar.	

**5.2.2 Préparation :**

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

Ajuster, si nécessaire, le pH de sorte qu'après stérilisation, il soit de 6,6 à 25 °C ;

Répartir le milieu gélosé dans des fioles ou flacons (6.8) de capacité appropriée ;

Stériliser à l'autoclave (6.1) à 121 °C ± 1 °C pendant 15 min.

Une préparation commerciale, prête à l'emploi, peut également être utilisée. Suivre scrupuleusement les instructions du fabricant.

**6 . Appareillage et verrerie :**

Le matériel courant de laboratoire de microbiologie, le matériel nécessaire à la préparation des échantillons pour essais et aux dilutions et notamment ce qui suit :

**6.1 Appareils pour la stérilisation en chaleur sèche (four) ou en chaleur humide (autoclave).**

**6.2 Etuve** réglable à 25 °C ± 1 °C.

**6.3 Boîtes de petri** de 90 mm à 100 mm de diamètre.

**6.4 Pipettes graduées** bouchées avec du coton, étalonnées pour délivrer 1 ml ± 0,02 ml ou 10 ml ± 0,2 ml ou 11 ml ± 0,2 ml.

**6.5 Bain d'eau** réglable à 45 °C ± 1 °C.

**6.6 Appareil de comptage de colonies** comportant un système d'éclairage avec fond noir, équipé d'une loupe d'un grossissement de 1,5 X et d'un compteur numérique, mécanique ou électronique.

**6.7 pH-mètre** à température compensée, précis à ± 0,1 unité de pH à 25 °C.

**6.8 Fioles ou flacons** de culture munis de couvercle à vis.

**Note 2 :**

Le matériel à usage unique est acceptable au même titre que la verrerie réutilisable, à condition que ses spécifications soient adéquates.

**7. Echantillonnage :**

L'échantillon destiné au laboratoire doit être représentatif et non endommagé ou modifié lors du transport et de l'entreposage.

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

**Note 3 :**

Dans les fromages affinés possédant une croûte de levures ou de moisissures, il est préférable d'exclure la croûte de l'échantillon pour l'analyse. Dans ce cas précis, la croûte peut être enlevée à l'aide d'un scalpel ou d'un couteau stérile avant de procéder à l'échantillonnage.

## 8. Mode opératoire :

### 8.1 Généralités :

Les facteurs influant sur la fidélité sont les suivants :

- le type d'appareillage pour l'homogénéisation ;
- le temps d'homogénéisation ;
- le diluant ;
- le temps de décantation des grosses particules ;
- le temps d'agitation lors de la préparation des dilutions décimales.

#### Note 4 :

Prendre les précautions courantes d'asepsie. Ne pas effectuer les opérations décrites en (8.1) et en (8.2) à la lumière directe du soleil.

### 8.2 Préparation de l'échantillon pour essai, de la suspension mère et des dilutions décimales :

La préparation de l'échantillon pour essai, de la suspension mère et des dilutions décimales doit être faite conformément aux méthodes d'analyses spécifiées dans la réglementation en vigueur.

En ce qui concerne la durée des opérations relatives à la préparation des échantillons, il y a lieu de se conformer au point (6.3) de la méthode d'analyse, fixée par l'arrêté du 28 Rajab 1435 correspondant au 28 mai 2014 rendant obligatoire la méthode de la préparation des échantillons, de la suspension mère et des dilutions décimales en vue de l'examen microbiologique.

### 8.3 Ensemencement et incubation :

**8.3.1** Prendre deux boîtes de petri stériles (6.3). Transférer à l'aide d'une pipette stérile (6.4), dans chaque boîte, 1 ml de l'échantillon pour essai si le produit est liquide ou 1 ml de la suspension mère dans le cas d'autres produits.

**8.3.2** Prendre deux autres boîtes de petri stériles. Transférer à l'aide d'une nouvelle pipette stérile dans chacune des boîtes, 1 ml de la dilution  $10^{-1}$  dans le cas de produit liquide ou 1 ml de la dilution  $10^{-2}$  pour les autres produits.

**8.3.3** Recommencer, si nécessaire, cette opération avec les dilutions décimales qui suivent.

**8.3.4** Couler dans chaque boîte de petri environ 15 ml de gelose au chlorhydrate d'oxytétracycline (5.1) ou de gélose au chloramphénicol (5.2) à 45 °C, préalablement fondue et maintenue dans un bain d'eau (6.5).

**8.3.5** Mélanger soigneusement l'inoculum au milieu de culture et le laisser se solidifier en posant les boîtes de petri sur une surface fraîche et horizontale.

**8.3.6** Il ne faut pas dépasser 15 min entre la préparation de la première dilution et le mélange de l'inoculum avec le milieu de culture.

**8.3.7** Préparer un nombre suffisant de boîtes témoins pour vérifier la stérilisation.

**8.3.8** Après retournement des boîtes de petri ainsi préparées (8.3.5) les placer à l'étuve (6.2) réglée à 25 °C pendant 5 jours .

Il est recommandé de prendre toutes les précautions utiles pour éviter les risques d'envahissement par des levures et des moisissures, par exemple :

- en plaçant un couvercle sur les boîtes de culture après solidification ;
- ou en ajoutant une goutte de glycérol sur le papier-filtre dans le couvercle de la boîte.

**8.3.9** Ne pas empiler plus de six boîtes. Les piles de boîtes ne doivent ni se toucher, ni être en contact avec les parois et la partie supérieure de l'étuve.

### 8.4 Interprétation :

**8.4.1** Compter les colonies dans chaque boîte, à l'exception de la colonie bactérienne, qui pourraient se développer éventuellement. Distinguer, si nécessaire, les colonies de levures et les colonies de moisissures en se basant sur les caractéristiques morphologiques ( 8.5).

**8.4.2** Ne retenir que les boîtes contenant entre 10 et 150 colonies au maximum. Si des parties de boîtes sont envahies par des moisissures ou s'il est difficile de compter les colonies bien isolées, compter les colonies dans des boîtes à la dilution suivante plus élevée et ce, même si leur nombre risque d'être inférieur à 10. Dans ce dernier cas, procéder comme en indique (9.2).

### 8.5 Confirmation :

L'identité de colonies ayant une taille d'une tête d'épingle ou douteuse doit être recherchée par un examen microscopique.

A l'aide d'un examen microscopique, confirmer, le nombre  $n$  des colonies où  $n$  représente les colonies dénombrées.

## 9. Expression des résultats :

**9.1** Considérer les dénombrements à partir des boîtes contenant entre 10 et 150 colonies au maximum.

Calculer le nombre  $N$  d'UFC de levures et/ou de moisissures par gramme ou par millilitre de produit à l'aide de l'équation suivante :

$$N = \frac{\sum C}{V(n_1 + 0.1n_2)d}$$

Où :

$\Sigma C$  : Est la somme des colonies comptées dans les boîtes retenues.

$V$  : Le volume de l'inoculum en millilitre.

$n_1$  : Est le nombre de boîtes retenues où l'on compte entre 10 et 150 colonies à la première dilution.

$n_2$  : Est le nombre de boîtes retenues où l'on compte entre 10 et 150 colonies à la deuxième dilution.

$d$  : Est le facteur de dilution correspondant à la première dilution.

S'il y a plus de deux dilutions retenues donnant un résultat de 10 à 150 colonies, l'équation peut être modifiée pour prendre en compte la dilution suivante. Pour trois dilutions, l'équation devient :

$$N = \frac{\Sigma C}{V(n_1 + 0.1n_2 + 0.01n_3) d}$$

Où :

$n_3$  : est le nombre de boîtes retenues où l'on compte entre 10 et 150 colonies à la troisième dilution.

Arrondir le résultat obtenu à deux chiffres significatifs. Lorsque le nombre à arrondir est 5, sans autres chiffres significatifs, arrondir de manière que le chiffre placé immédiatement à gauche soit pair. Par exemple 28 500 est arrondi à 28 000, et 11 500 est arrondi à 12 000.

Prendre comme résultat le nombre d'UFC de levures et/ou de moisissures par millilitre ou par gramme de produit, exprimé par un nombre compris entre 1 et 9,9 multiplié par  $10^x$ , où  $x$  est la puissance appropriée de 10.

**Exemple :** un dénombrement d'UFC de levures et/ou de moisissures a donné les résultats suivants (deux boîtes de petri par dilution ont été incubées) :

— à la première dilution retenue ( $10^{-2}$ ), 83 et 97 colonies ;

— à la seconde dilution retenue ( $10^{-3}$ ), 33 et 28 colonies :

$$N = \frac{\Sigma C}{V(n_1 + 0.1n_2) d}$$

$$= \frac{83 + 97 + 33 + 28}{1 [2 + (0.1 \times 2)] 10^{-2}} = \frac{241}{0.022} = 10954.$$

En arrondissant le résultat comme spécifié en (9.1), on obtient 11 000 ou  $1,1 \times 10^4$  UFC de levures et/ou de moisissures par gramme ou par millilitre de produit.

**9.2** Si les deux boîtes de petri correspondant à l'échantillon pour essai (produits liquides) ou à la suspension mère (autres produits) contiennent moins de 10 colonies, reporter les résultats comme suit :

— moins de 10 (UFC) de levures et/ou de moisissures par millilitre (produits liquides) ;

— moins de  $10 \times 1/d$  (UFC) de levures et/ou de moisissures par gramme (autres produits), où  $d$  est le facteur de dilution correspondant à la première dilution.

**9.3** S'il n'y a que des dénombrements supérieurs à 150, calculer un nombre estimé à partir des boîtes ayant un nombre de colonies proche de 150 colonies et le multiplier par l'inverse de la valeur correspondant à la dilution la plus élevée [exprimer ce résultat en tant que « nombre estimé d'unités formant colonie de levures et/ou de moisissures par gramme ou par millilitre de produit ».

## 10. Répétabilité :

La différence absolue entre deux résultats d'essai individuels indépendants, obtenus à l'aide de la même méthode sur un matériau identique soumis à l'essai dans le même laboratoire par le même opérateur utilisant le même appareillage et dans un court intervalle de temps, ne dépasse pas 30 % du résultat le plus bas dans plus de 5 % des cas.