

## ARRETES, DECISIONS ET AVIS

### 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 profondeur.**

— — — —

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 des spécifications microbiologiques des denrées alimentaires ;

Vu l'arrêté interministériel du 2 Moharram 1438 correspondant au 4 octobre 2016 fixant les critères microbiologiques 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 horizontale pour le dénombrement des micro-organismes par comptage des colonies à 30 °C par la technique d'ensemencement en profondeur.

Art. 2. — Pour le dénombrement des micro-organismes par comptage des colonies à 30 °C par la technique d'ensemencement en profondeur, 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

**Méthode horizontale pour le dénombrement des micro-organismes par comptage des colonies à 30 °C par la technique d'ensemencement en profondeur**

**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 dans un milieu solide après incubation en condition aérobie à 30 °C.

La méthode est applicable aux :

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

Cette méthode prend en charge :

- 1) Les produits qui exigent un comptage fiable lorsqu'une limite inférieure de détection est spécifiée (inférieure à 10<sup>2</sup>/g ou 10<sup>2</sup>/ml pour des échantillons liquides ou inférieure à 10<sup>3</sup>/g pour des échantillons solides);
- 2) Les produits supposés contenir des colonies envahissantes qui masquent les colonies d'autres micro-organismes, par exemple le lait et les produits laitiers susceptibles de contenir diverses espèces envahissantes de Bacillus.

**Note :**

Pour certaines matrices, la technique spécifiée dans la présente méthode peut donner des résultats différents de ceux obtenus avec la technique spécifiée dans la méthode horizontale pour le dénombrement des micro-organismes par comptage des colonies à 30 °C par la technique d'ensemencement en surface.

**2. DEFINITION :**

Micro-organisme : Entité de taille microscopique, comprenant les bactéries, les champignons (levures et moisissures), les protozoaires et les virus.

**3. PRINCIPE :**

Une quantité déterminée de l'échantillon pour essai liquide ou une quantité déterminée de suspension mère dans le cas d'autres produits, est déposée dans une boîte de Petri vide et mélangée à un milieu de culture gélosé fondu spécifié, constituant ainsi une boîte de gélose ensemencée en profondeur.

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 les 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 obtenues 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 exigences spécifiées dans les méthodes relatives à la préparation des échantillons pour essai, de la suspension mère et des dilutions décimales en vue de l'examen microbiologique, fixées par la réglementation en vigueur.

**4.2 Milieu gélosé : gélose pour dénombrement (PCA) :****4.2.1 Composition**

Digestat enzymatique de caséine	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 d'analyse de produits laitiers, ajouter 1g 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 milieu complet déshydraté, en chauffant si nécessaire ;
- mélanger soigneusement et laisser reposer plusieurs minutes ;
- ajuster le pH (5.4), si nécessaire, de sorte qu'après stérilisation, il soit de  $7 \pm 0,2$  à  $25\text{ °C}$  ;
- répartir le milieu dans des tubes, des fioles ou des flacons (5.8) de capacité appropriée ;
- stériliser pendant 15 min à l'autoclave (5.1) à  $121\text{ °C}$  ;
- si le milieu est utilisé extemporanément, le refroidir dans un bain d'eau (5.3) maintenu entre  $44\text{ °C}$  et  $47\text{ °C}$ , avant utilisation, sinon, stocker ce milieu dans l'obscurité pendant 3 mois au plus, à une température de  $5 \pm 3\text{ °C}$ , et dans des conditions qui n'altèrent ni sa composition ni ses propriétés ;
- avant de commencer l'examen microbiologique, faire fondre complètement le milieu, puis le refroidir entre  $44\text{ °C}$  et  $47\text{ °C}$  dans un bain d'eau (5.3) avant utilisation ;
- utiliser la gélose fondue dès que possible, il est recommandé de ne pas la conserver pendant plus de 4 h.

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

##### 4.2.3.1 Généralités :

La gélose pour dénombrement (PCA) est un milieu non sélectif, utilisé dans la présente méthode comme milieu ensemencé en profondeur.

##### 4.2.3.2 Productivité :

Incubation	$(72 \pm 3)$ h à $(30 \pm 1)\text{ °C}$
Souches témoins	<i>Bacillus subtilis subsp. spizizenii</i> <i>Staphylococcus aureus</i>
Milieu de référence	Gélose tryptone soja
Méthode de contrôle	Quantitative
Critère	Rapport de productivité $(RP) \geq 0,7$

#### 4.3 Milieu pour seconde couche (voir 8.2.7) :

##### 4.3.1 Composition :

Gélose *	12 g à 18 g
Eau	1 000 ml
* En fonction du pouvoir gélifiant de la gélose.	

#### 4.3.2 Préparation :

- ajouter la gélose dans l'eau et porter à ébullition, tout en mélangeant fréquemment de façon à dissoudre complètement la gélose ou placer dans un flux de vapeur pendant environ 30 min ;
- ajuster le pH (5.4), si nécessaire, de sorte qu'après stérilisation, il soit de  $7 \pm 0,2$  à  $25\text{ °C}$  ;
- répartir le milieu dans des tubes, des fioles ou des flacons (5.8) de capacité appropriée ;
- stériliser dans un autoclave à  $121\text{ °C}$  pendant 15 min ;
- si le milieu est utilisé extemporanément, le refroidir dans un bain d'eau (5.3) maintenu entre  $44\text{ °C}$  et  $47\text{ °C}$ , avant utilisation, sinon, stocker ce milieu dans l'obscurité pendant 3 mois au plus à une température de  $5 \pm 3\text{ °C}$  et dans des conditions qui n'altèrent ni sa composition ni ses propriétés ;
- avant de commencer l'examen microbiologique, faire fondre complètement le milieu, puis le refroidir entre  $44\text{ °C}$  et  $47\text{ °C}$  dans un bain d'eau (5.3) avant utilisation.

#### 5. APPAREILLAGE :

Le matériel à usage unique est acceptable au même titre que la verrerie et le matériel en plastique réutilisables, si ses 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** pouvant être maintenue à une température de  $(30 \pm 1)\text{ °C}$ .

**5.3 Bain d'eau** pouvant maintenir une température comprise entre  $44\text{ °C}$  et  $47\text{ °C}$ .

**5.4 pH-mètre** d'une précision de lecture de  $\pm 0,1$  unité pH à  $25\text{ °C}$ .

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

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

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

**5.8 Tubes, fioles ou flacons**, de capacité appropriée et ne dépassant pas 500 ml.

#### 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 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 dilutions :

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 microbiologique, fixées par la réglementation en vigueur.

### 8.2 Ensemencement et incubation :

**8.2.1** Prendre deux (2) boîtes de Petri stériles (5.5). Au moyen d'une pipette stérile (5.6), transférer dans chaque boîte, 1 ml d'échantillon pour essai si le produit est liquide, ou 1 ml de la suspension mère dans le cas d'autres produits (dilution à  $10^{-1}$ ). Si des boîtes sont préparées à partir de plus d'une dilution, le nombre de boîtes par dilution peut être réduit à une seule boîte.

**8.2.2** Prendre une autre boîte de Petri stérile (5.5). Utiliser une autre pipette stérile (5.6) pour déposer 1 ml de la dilution à  $10^{-1}$  (produit liquide) ou 1 ml de la dilution à  $10^{-2}$  (autres produits).

**8.2.3** Répéter, si nécessaire, le mode opératoire décrit ci-dessus avec les dilutions qui suivent, à l'aide d'une nouvelle pipette stérile pour chaque dilution décimale.

**8.2.4** Sélectionner uniquement les dilutions critiques (au moins deux dilutions décimales successives) afin d'ensemencer des boîtes de Petri sur lesquelles pourront être dénombrées entre 10 et 300 colonies par boîte.

**8.2.5** Verser dans chaque boîte de Petri, environ 12 ml à 15 ml de gélose pour dénombrement (4.2) à une température comprise entre 44 °C et 47 °C. La durée entre la fin de la préparation de la suspension mère (ou de la dilution à  $10^{-1}$  dans le cas d'un produit liquide) et le moment où le milieu (4.2) est versé dans les boîtes ne doit pas dépasser 45 min.

**8.2.6** Mélanger soigneusement l'inoculum au milieu de culture en faisant tourner les boîtes de Petri et laisser le mélange se solidifier en posant les boîtes de Petri sur une surface horizontale et froide.

**8.2.7** Après solidification complète, verser environ 4 ml du milieu pour seconde couche (4.3) ou de la gélose pour dénombrement (4.2) à une température comprise entre 44 °C et 47 °C en surface du milieu ensemencé et ce, uniquement dans le cas où le produit à examiner est suspecté de contenir des micro-organismes, dont les colonies envahissent la surface du milieu. Laisser se solidifier comme spécifié en (8.2.6)

**8.2.8** Retourner les boîtes ainsi préparées et les placer dans l'étuve (5.2) réglée à  $(30 \pm 1)$  °C. Incuber pendant  $(72 \pm 3)$  h.

## 8.3 Dénombrement des colonies :

**8.3.1** Après la période d'incubation spécifiée en (8.2.8), choisir les boîtes gélosées comportant moins de 300 colonies. Compter toutes les colonies sur les boîtes, à l'aide d'un appareil de comptage (5.7), si nécessaire. Examiner les boîtes sous une lumière diffuse.

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 non dissoutes ou les matières présentes sous forme de précipité avec ces colonies en tête d'épingle.

Examiner avec attention les éléments douteux, en utilisant un grossissement plus fort, si nécessaire, afin de distinguer les colonies des particules étrangères.

**8.3.2** Les colonies envahissantes doivent être considérées comme une seule colonie. Si moins d'un quart de la boîte est envahi par de telles colonies, compter les colonies de la partie non envahie de la boîte et calculer le nombre de colonies correspondant à la boîte entière. Si plus d'un quart de la boîte est recouvert de colonies envahissantes, ne pas tenir compte de cette boîte pour le comptage.

## 9. EXPRESSION DES RESULTATS :

### 9.1 Méthode de calcul :

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, 10 colonies .

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

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

Où :

$\sum C$  : la somme des colonies comptées sur les deux (2) boîtes retenues de deux dilutions successives et dont, au moins, une boîte contenant, au moins, 10 colonies ;

V : le volume de l'inoculum appliqué 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 dilution  $d_2$  et le comptage des colonies de la dilution  $d_1$  soit égal à 10%. Il convient que les limites supérieure et inférieure soient spécifiées par le laboratoire pour le comptage des colonies de la 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 dilution  $d_2$  ne soit pas inférieur à 13 (5,2 %) et pas supérieur à 39 (15,6%).

Arrondir le résultat calculé à deux 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, de préférence, le résultat comme un nombre compris entre 1 et 9,9 multiplié par la puissance appropriée de 10, ou un nombre entier avec deux 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.

## 9.2 Fidélité :

### 9.2.1 Généralités :

Les données de fidélité ont été calculées pour des boîtes contenant plus de 15 et moins de 300 colonies. Les données de fidélité dépendent des flores en association et de la matrice de l'échantillon.

### 9.2.2 Répétabilité :

La différence absolue entre deux résultats d'essai indépendants, obtenus suivant la même méthode sur un matériau d'essai identique, dans un même laboratoire et par un même opérateur utilisant le même appareillage dans un court intervalle de temps, ne dépassera pas la limite de répétabilité,  $r = 0,25$ , exprimée en  $\log_{10}N$ , où N est le nombre de micro-organismes par millilitre (correspondant à un facteur 1,8 en nombre naturel de micro-organismes par millilitre).

### 9.2.3 Reproductibilité :

La différence absolue entre deux résultats d'essais obtenus suivant la même méthode, sur un matériau d'essai identique, dans des laboratoires différents et par des opérateurs différents utilisant un appareillage différent, ne dépassera pas la limite de reproductibilité  $R = 0,45$ , exprimée en  $\log_{10}N$ , où N est le nombre de micro-organismes par millilitre (correspondant à un facteur 2,8 en nombre naturel de micro-organismes par millilitre).

## 9.3 Interprétation des résultats d'essai :

### 9.3.1 Généralités :

Dans les exemples (9.3.2 et 9.3.3), les données de fidélité moyennes, un niveau de probabilité de 95 % et l'analyse d'un seul échantillon sont considérés. Il convient de noter que, dans la pratique, la moyenne de plusieurs échantillons est souvent utilisée. Les chiffres sont exprimés en nombre des micro-organismes par millilitre.

### 9.3.2 Conditions de répétabilité :

Premier résultat :  $10^5 = 100\ 000$

Il convient que la différence entre le premier et le deuxième résultat ne dépasse pas  $0,25 \log_{10}N$ .

Deuxième résultat :

Limite inférieure :  $10^{4,75} = 56\ 000$

Limite supérieure :  $10^{5,25} = 178\ 000$

La différence entre le premier résultat et le deuxième résultat est acceptable si le deuxième résultat n'est pas inférieur à 56 000 ou supérieur à 178 000.

### 9.3.3 Conditions de reproductibilité :

Résultats obtenus dans le premier laboratoire (moyenne des déterminations en double) :  $10^5 = 100\ 000$

Il convient que la différence entre le premier et le deuxième résultat, obtenus dans le deuxième laboratoire, ne dépasse pas  $0,45$  unité de  $\log_{10}N$ .

Deuxième résultat :

Limite inférieure :  $10^{4,55} = 36\ 000$

Limite supérieure :  $10^{5,45} = 280\ 000$

La différence entre les résultats obtenus par le premier et le deuxième laboratoire est acceptable, si le deuxième laboratoire obtient un résultat qui n'est pas inférieur à 36 000 ni supérieur à 280 000.

La différence critique (CD), utilisée pour l'interprétation des résultats, est présentée comme suit :

### Utilisation de la différence critique pour l'interprétation des résultats :

#### Généralités :

Dans les exemples ci-dessous, la moyenne des données de fidélité, un niveau de probabilité de 95%, et l'analyse d'un seul échantillon sont considérés. Il convient de noter que, dans la pratique, la moyenne de plusieurs échantillons est souvent utilisée. Les chiffres sont exprimés en nombre des micro-organismes par millilitre.

**Conditions de reproductibilité :**

Résultats obtenus dans le premier laboratoire (moyenne des déterminations en double) :  $10^5 = 100\ 000$

La différence entre ce résultat et un résultat obtenu par un deuxième laboratoire (moyenne de n déterminations dans cet exemple, n = 2) est acceptable si la valeur n'est pas supérieure à la différence critique, dC, en unités de log10N :

$$d_C = \sqrt{R^2 - r^2 \left(1 - \frac{1}{n}\right)} = \sqrt{R^2 - \frac{r^2}{2}} = \sqrt{0,45^2 - \frac{0,25^2}{2}} = 0,41$$

où :

r : est la limite de répétabilité;

R : est la limite de reproductibilité.

La différence entre les résultats obtenus par les deux laboratoires est acceptable si le deuxième laboratoire obtient un résultat qui n'est ni inférieur à  $10^{4,59} = 39000$ , ni supérieur à  $10^{5,41} = 257000$ .

**Comparaison à une limite (test unilatéral) :**

Limite:  $10^5 = 100\ 000$

Il est nécessaire de comparer la différence entre la limite et le résultat du laboratoire (moyenne de n déterminations, dans cet exemple, n = 2) avec la limite de différence critique, dCL :

$$d_{CL} = \frac{0,84}{\sqrt{2}} \times \sqrt{R^2 - r^2 \left(1 - \frac{1}{n}\right)} = \frac{0,84}{\sqrt{2}} \times \sqrt{R^2 - \frac{r^2}{2}} = 0,24$$

Les résultats d'essai jusqu'à  $10^{5,24} = 174\ 000$  sont acceptables, par rapport à la limite.