

JOURNAL OFFICIEL DE LA REPUBLIQUE DE DJIBOUTI

Arrêté n°2000-0728/PR/MAEM relatif aux critères microbiologiques auxquels doivent satisfaire certaines denrées animales ou d'origine animale.

LE PRESIDENT DE LA REPUBLIQUE, CHEF DU GOUVERNEMENT

VU la Constitution du 15 septembre 1992 ;

VU la délibération N° 472/6° L portant règlement d'hygiène et de voirie ;

VU la loi N° 154/AN/85 1ère L du 11 juin 1985 portant organisation de l'administration du Ministère de l'Agriculture et du Développement Rural ;

VU la loi N° 63/AN/89/2ème L du 03 avril 1989 modifiant la Loi 154/AN/85/1ère L du 11 juin 1985 portant organisation de l'administration du Ministère de l'Agriculture et du Développement Rural

VU le décret N° 99-0059/PRE du 12 mai 1999 portant nomination du Gouvernement et fixant leurs attributions ;

Sur proposition du Ministre de l'Agriculture, de l'Elevage et de la Mer, chargé des Ressources Hydrauliques ;

Le Conseil des Ministres entendu en sa séance du 19 septembre 2000 ;

ARRETE

Article 1er :

Pour être reconnues propres à la consommation, les denrées animales ou d'origine animale, ci-après énumérées doivent satisfaire aux critères microbiologiques fixés au présent arrêté et vérifiés selon les dispositions décrites en annexes. En outre, elles doivent être exemptes de micro-organismes ou toxines dangereuses pour la santé publique.

*Viandes de boucherie;

*Viandes hachées à l'avance, viandes cuites, produits de charcuterie, quenelles, plats cuisinés à l'avance, potages déshydratés;

*Viandes de volaille;

*Produits de la pêche;

*Ovoproduits, pâtisserie, crèmes pâtissières;

*Laits fermentés (yaourts, kéfir.), laits gélifiés, fromages frais pasteurisés, crèmes fraîches pasteurisées,

glaces et crèmes glacées, caséine et caséinates;

*Conserves à base de denrées animales ou d'origine animale;

*Semi-conserves à base de denrées animales ou d'origine animale;

Article 2 :

Au sens de l'article 1er , les critères microbiologiques relatifs aux viandes de boucherie sont les suivants :

Désignation	Micro-organismes aérobies à 30°C (par gramme)	Coliformes fécaux (par gramme)	Staphylocoques pathogènes (par gramme)	Anaérobies Sulfito-réducteurs à 46°C (par gramme)	Salmonelles dans 25 grammes
Carcasses ou coupes de demi-gros, réfrigérées ou congelées (1)	(3) 5.10 ²	-	-	2	Absence
	4	10 ²	-	2	Absence
Pièces conditionnées sous vide ou non, réfrigérées ou congelées (1)	(3) 5.10				
		3.10 ²	10 ²	10	Absence
Portions unitaire					

conditionnées, réfrigérées ou congelées et portions unitaires du commerce de détail réfrigérées ou congelées (2)	-				
--	---	--	--	--	--

(1) Le prélèvement est effectué en profondeur, après cautérisation de la surface.

(2) Le prélèvement concerne profondeur plus surface sans cauterisation.

(3) Seules les tolérances de caractère analytique sont acceptées (plan à deux classes).

Article 3 :

Les critères microbiologiques relatifs aux viandes hachées, aux viandes cuites, aux produits de charcuterie, aux plats cuisinés et aux potages déshydratés sont les suivants :

Désignation	Micro-organismes aérobies à 30°C (par gramme)	Coliformes à 30°C (par gramme)	Coliformes fécaux (par gramme)	Staphylopathogènes (par gramme)	Anaérobies Sulfito-réducteurs	Salmonelles dans 25 grammes
- Viande hachée à l'avance ou à la demande - Plats cuisinés	5 5.10		10 ²	10 ²	(1)30	Absence

à l'avance,	5	10 ²	10	10 ²	30	Absence
escargots	(2)3.10					
préparés, pièces						
de viandes						
cuites						
tranchées						
ou non		-				
- Produits de						
charcuterie	-		10 ²			
crus, haché :						
* Soumis à		-				
dessication et	-					
à consommer						
en l'état		-	3	5.10 ²	50	Absence
* à	(3) -		10			
Conso						
ommer après						
cuisson						
- Produits de		3				
salaison crus ou		10	3			
salés et/ou	5		10			
séchés, tranchés	(2)(3)3.10	10			10 ²	Absence
ou non		3		3		
-	4	10		10		
Produit de	10		10			
charcuterie						
cuits, tranchés	5		Absence			
ou non,	3.10					
quenelles					50	Absence

- Jambon cru entier			10	5.10 ²		
- Potages déshydratés					30	Absence
				10 ²		
					Absence	Absence
				Absence		
					30	Absence
				10 ²		

(1) Tolérance prévue en annexe comprise.

(2) Pour les pâtes farcies du type ravioli, cannelloni, lasagne, les quenelles et les plats cuisinés auxquels est incorporé du fromage, ce critère doit être interprété.

(3) Pour les produits de charcuterie conditionnés sous pellicule plastique et sous vide, le critère relatif aux micro-organismes aérobies à 30°C (3.105) par gramme ne s'applique qu'au stade de la fabrication (usine).

Article 4 :

Les critères microbiologiques relatifs aux viandes de volailles sont les suivants :

Désignation	Micro-organismes aérobies à 30°C (par gramme)	Coliformes Fécaux (par gramme)	Staphylocoques aureus (par gramme)	Anaérobies Sulfito-réducteurs à 46°C (par gramme)	Salmonelles
	-	-	-	-	Absence dans 25 grammes de muscles pectoraux
Volailles entières réfrigérées, congelées ou surgelées	5 5.10	3 10	5.10 ²	30	Absence dans 1 gramme
Rôtis, escalopes et paupiettes crus, panés ou non	5				
Rôtis cuits, entier ou tranchés	3.10				
et paupiettes cuites ou précuites grammes		10	10 ²	10	Absence dans 25
Viande crue séparée	6				
mécaniquement	10	3 5.10	3 10	10 ²	Absence dans 1 gramme (1)
Viande cuite séparée	6			30	
mécaniquement	3.10	10	10 ²		
					Absence dans 25

					grammes
--	--	--	--	--	---------

Article 5 :

Les critères microbiologiques relatifs aux ovoproduits, pâtisseries et crèmes pâtissières sont les suivants :

Désignation	Micro-organismes aérobies à 30°C (par gramme)	Coliformes à 30° C (par gramme)	Coliformes Fécaux (par gramme)	Staphylococcus aureus (par gramme)	Anaérobies Sulf. réducteurs à 46°C (par grammes)	Salmonelles dans 25 grammes
Pâtisseries, crèmes pâtissières	5 3.10	3 10	1	10 ²	10	Absence
Ovoproduits pasteurisés	5 10	-	10 (entérobact.)	10 ²	-	Absence
Blancs d'oeufs non pasteurisés	-	-	-	-	-	Absence

Article 6 :

Les critères microbiologiques relatifs aux produits de la pêche ci-dessous sont les suivants :

Désignation	Micro-organismes aérobies à 30°C (par gramme)	Coliformes Fécaux (par gramme)	Streptocoques Fécaux (par gramme)	Staphylococcus aureus (par gramme)	Anaérobies Sulfite réducteurs à 46°C (par gramme)	Salmonelles dans 25 grammes
Crustacés entiers cuits réfrigérés autres que crevettes	5					

Tous crustacés, y compris crevettes entières cuites ou crues, congelés ou surgelés	10	1	-	-	10	Absence
Crevettes cuites décortiquées, réfrigérées et décortiquées congelées ou surgelés	3	1	-	-	2	Absence
Coquillages bivalves et oursins présentés vivants	10	10	-	10 ²	10	Absence
Poissons tranchés panés ou non, filets de poissons frais réfrigérés	5					
Poissons tranchés filets de poissons congelés ou surgelés	10	3.10 ² (1)		-	-	Absence
Préparation à base de chair de poissons hachées, crues		10	3	10 ²	10	Absence
Cuisses de grenouille Escargots décoquillés congelés ou surgelés	-	10 ²	-	10 ²	10	Absence
		10 ²		10 ²	10	Absence
	5		-			
	10					
		-	-	-	<103	

						Absence
	5		-			
	5.10					
	5					
	5.10					
	-					

(1) pour 100 ml

(2) cette recherche est effectuée en cas de suspicion particulière, selon les commémoratifs, dans 100 ml de mélange "chair-liquide intervalvaire"

(3) la recherche de *Vibrio parahaemolyticus* et/ou de *Listeria* dépend de la demande des pays importateurs. Le seuil fixé est de 102/g

Article 7 :

Les normes sanitaires et qualitatives du lait cru sont les suivantes

Désignation	Micro-organismes aérobie à 30°C	Coliformes Féc aux ml par	Salmonella dans 1000 ml	Strepto-coques bêta-hémolytiques dans 0,1 ml	Stabilité à l'ébullition	Acidité en g d'acide lactique par litre
-------------	---------------------------------	---------------------------	-------------------------	--	--------------------------	---

Au jour du conditionnement	4 9.10	10 ²	Absence	Absence	-	-
A la date limite de consommation	5 9.10	3 10	Absence	Absence	stable	Entre 1,4 et 1,8

Sont retenus comme streptocoques bêta hémolytiques ceux appartenant aux groupes A, B, C, G, et de Lancefield.

Article 8 :

Les critères microbiologiques relatifs aux laits fermentés (yaourts, kefirs, etc...), aux laits gélifiés, aux fromages frais pasteurisés, aux crèmes fraîches pasteurisées, aux glaces et crèmes glacées, aux caséines et caséinates, sont les suivants :

Désignation	Micro-organismes aérobies à 30°C (par gramme)	Colifor-mes à 30°C (par gramme)	Colifor-mes Fécaux (par gramme)	Staphylo-coccus aureus (par gramme)	Salmonella dans 25 grammes	Acidité exprimée en acide lactique dans la partie non grasse
-------------	---	---------------------------------	---------------------------------	-------------------------------------	----------------------------	--

Laits fermentés (yaourt et kéfir)	-	10	1	-	Absence	-
Laits gélifiés et laits emprésurés aromatisés	3 10	10	1	-	Absence	-
Fromage frais pasteurisés		10	1	10	Absence	-
Crèmes de consommation pasteurisées	-	Conditionnée 10 vrac 100	1	10	Absence	≤ 2,5
Glaces et crèmes glacées	4 3.10 phosphatase négative	10 ²	1	10	Absence	-
Caséines caséinates			-	-	-	-
	5 3.10	Absence 0,1 g				
	4 3.10 et flore thermophile					

microscopiques observés sur une boîte incubée, et n0 le nombre de micro-organismes dénombrés sur une boîte non incubée, le rapport n/n0 doit être inférieur à 100.

En cas de doute, et notamment lors du contrôle de certains produits de la pêche, un examen bactériologique conduit avec toute la rigueur technique requise est effectué.

Article 10 :

Les critères microbiologiques relatifs aux semi-conserves à base de denrées animales ou d'origine animale sont les suivants :

Désignation	Micro-organismes aérobies à 30°C (par gramme)	Coliformes (par gramme)	Staphylococcus aureus (par gramme)	Anaérobies Sulfito-réducteurs à 46°C (par gramme)	Salmonella dans 25 grammes dans 0,1 ml
Semi-conserves pasteurisées (1)	4 10	Absence	Absence	Absence	Absence
Semi-conserves non pasteurisées (1) - Rollmops, hareng saurs, anchois, au sel ou à l'huile. - Saumon fumé, haddock et autres poissons légèrement salés et fumés	5 10 6 10 (3)	Absence Absence	Absence 1	Absence (2) Absence	Absence Absence

(1) revivification de la suspension mère pendant deux heures à la température du laboratoire pour les semi-conserves pasteurisées et pendant trente à quarante cinq minutes pour les semi-conserves non pasteurisées.

(2) Cas particulier des anchois en saumure : anaérobies sulfito-réducteurs à 46°C : moins de 10 par gramme

(3) Dénombrement en milieu à l'eau de mer ou à défaut à l'eau de salinité 35 p 1000 et à température d'incubation de 20°C pendant cinq jours.

Article 11 :

Les critères du présent arrêté, vérifiés selon les dispositions décrites en annexe, sont ceux des laboratoires officiels et des laboratoires choisis par les responsables d'entreprise lorsque les conditions d'hygiène dans lesquelles sont réalisées les opérations de réception, de transformation, de conditionnement, d'entreposage et de transport des denrées énumérées aux articles précédents font l'objet de contrôles obligatoires.

Article 12 :

Le Directeur des services vétérinaires est chargé de l'application du présent arrêté qui sera enregistré, publié au Journal Officiel de la République, et communiqué partout où besoin sera.

Fait à Djibouti, le 23 septembre 2000.

Le Président de la République,

chef du Gouvernement

ISMAÏL OMAR GUELLEH

ANNEXE I

Observations :

Les valeurs indiquées dans les tableaux du présent texte correspondent aux niveaux de contamination microbienne qu'il est habituel d'attendre de produits fabriqués, transportés et distribués dans des conditions de bonnes pratiques professionnelles en matière d'hygiène.

1. Echantillon pour laboratoire et technique de prise d'essai

1.1 Echantillon pour laboratoire

La taille de l'échantillon pour laboratoire d'un produit de même nature doit être comprise comme suit:

Portions unitaires de viande et denrées visées aux articles 2 et suivants tant au niveau de la fabrication que des points de vente: si possible, au moins cinq unités;

Conserves: cinq unités;

Coquillages: nombre suffisant pour obtenir au laboratoire cinq fois au moins 25 grammes de chair et de liquide inter-valvaire.

Nota. 1 – le laboratoire doit disposer, pour conduire les analyses complètes, d'environ 500 grammes de produits, soit cinq fois 100 grammes. Ces 100 grammes peuvent être fournis par une ou plusieurs pièces.

2 - cas particulier – lorsqu'il s'agit d'une production artisanale pour laquelle le prélèvement de cinq échantillons peut s'avérer trop important au regard de la quantité fabriquée, il pourra être procédé à un étalement dans le temps de la prise de ces échantillons.

Toutefois, dans l'éventualité où les premiers résultats se révéleraient d'emblée non satisfaisants, il serait procédé au prélèvement simultané de cinq échantillons.

1.2 technique de prise d'essai

La prise d'essai destinée à la préparation de la suspension mère et des dilutions décimales porte:

Sur les parties superficielles et profondes, notamment pour les produits en tranches, hachés, divisés, pour les plats cuisinés à l'avance;

Sur la partie profonde du produit pour les viandes (pièces), les produits de charcuterie (pièces) et les poissons entiers, après cautérisation de la surface.

Pour les produits laitiers et selon la nature des produits, elle porte sur le produit homogénéisé ou sur les parties superficielles et profondes.

Dans le cas d'examens microbiologiques, à la suite de toxi-infections alimentaires, il est nécessaire de pratiquer la recherche des germes pathogènes, toxigènes et/ou de leurs toxines, aussi bien en surface qu'en profondeur.

2. Interprétation des résultats

Remarque. – Il convient de retenir que la valeur des méthodes de dénombrement microbien n'est pas absolue, quelle que soit la nature des milieux de culture utilisés. Il est généralement admis que la variabilité peut atteindre ± 1 log. Avec les milieux solides et ± 1 log. Avec les milieux liquides.

2.1 Plan à trois classes

Principe:

Ce plan est ainsi désigné parce que les résultats des examens interprétés sur cette base permettent de fixer trois classes de contamination:

Celle inférieure ou égale au critère m;

Celle comprise entre le critère m et le seuil M;

Celle supérieure au seuil M;

m: critère fixé au présent texte. Tous les résultats égaux ou inférieurs sont considérés satisfaisants;

M: seuil limite d'acceptabilité, au-delà duquel les résultats ne sont plus considérés comme satisfaisants, sans que pour autant le produit soit considéré comme toxique. Les valeurs de M sont fixées à:

M = 10 m lors du dénombrement effectué en milieu solide;

M = 30 m lors du dénombrement effectué en milieu liquide;

n: nombre d'unités composant l'échantillon;

c: nombre d'unités de l'échantillon donnant des valeurs situées entre m et M.

Application pratique (tenant compte de variations liées à la technologie micro-biologique, remarque supra):

La qualité du lot est considérée comme satisfaisante ou acceptable en application de l'article 1er du présent texte lorsque aucun résultat ne dépassant M:

a) Les valeurs observées sont:

≤ 3 m lors d'emploi de milieu solide;

≤ 10 m lors d'emploi de milieu liquide; qualité satisfaisante

b) Les valeurs observées sont comprises

Entre 3 m et 10 m (=M) en milieu solide;

Entre 10 m et 30 m (=M) en milieu liquide;

qualité acceptable

Et c/n est $\leq 2/5$ avec le plan $n = 5$ et $c = 2$

(ou tout autre plan d'efficacité équivalente

ou supérieure)

Les résultats sont considérés comme non satisfaisants:

a) Lorsque c/n est $> 2/5$;

b) Dans tous les cas où des valeurs supérieures à M sont observées. Cependant, le seuil de dépassement pour les micro-organismes aérobies à + 30°C, alors que les autres critères sont respectés, doit faire l'objet d'une interprétation, notamment pour les viandes, volailles et produits crus.

Lorsque les valeurs sont supérieures à M, les résultats sont considérés comme non satisfaisants. Mais il est bien évident qu'au-delà d'un certain ordre de grandeur, la notion de toxicité s'impose de plus en plus; en tout état de cause, le produit doit être considéré comme toxique ou corrompu lorsque la contamination atteint la valeur microbienne valeur S qui est fixée dans le cas général à m.103. Pour *Staphylococcus aureus* cette valeur S ne doit jamais excéder 5.104. Les tolérances liées aux techniques d'analyse ne sont pas applicables aux valeurs de M et de S.

2.2 Plan à deux classes

Ce plan est ainsi désigné car les résultats des examens interprétés sur cette base permettent de déterminer seulement deux classes de contamination. Ce type de plan, qui n'accepte aucune tolérance, même de caractère analytique, correspond le plus souvent aux expressions:

"Absence dans": le résultat est considéré comme satisfaisant;

"Présence dans": le résultat est considéré comme non satisfaisant; le produit est déclaré impropre à la consommation.

En outre, dans certains cas particuliers mentionnés aux articles 2 et 5 du présent arrêté, il est fait application du plan à deux classes, avec tolérance analytique.

Nota – ce plan est en particulier applicable aux contaminations par salmonella. Cependant, pour les volailles, lorsqu'il s'agit de contamination superficielle, le lot est considéré comme satisfaisant lorsque le rapport $d/n \leq 5$, d étant le nombre d'unités de l'échantillon dont les résultats sont positifs.

2.3 Cas particulier des conserves

Lorsque les conserves à base de denrées animales et d'origine animale ne répondent pas aux épreuves de stabilité fixées à l'article 9 du présent texte, la transposition au lot d'origine ne pourra intervenir que dans la mesure où un plan d'échantillonnage préalablement défini aura été mis en œuvre.

3. Dispositions particulières relatives aux échantillons soumis à la congélation en vue d'une analyse microbiologique différée

Remarque – La congélation d'un échantillon (plat cuisiné, viande hachée...) provoque une diminution plus ou moins sensible, selon les cas, du nombre de germes servant de test pour le jugement de la qualité microbiologique telle que définie par la réglementation en vigueur.

Le fait de congeler un échantillon d'un produit réfrigéré peut être de nature à provoquer certains litiges (échantillon réfrigéré jugé inacceptable, alors qu'un échantillon du même lot, mais ayant subi une congélation, se révèle satisfaisant au plan bactériologique). Il convient, pour éviter au maximum l'apparition de cette disparité, de traiter les échantillons dans les conditions suivantes, lorsqu'ils doivent être congelés et conservés en l'état, préalablement à leur analyse bactériologique.

3.1 modalités de congélation et de décongélation

- a) Congélation précoce conduite de manière à atteindre la température de -18°C le plus rapidement possible;
- b) Stockage et transport à une température $\leq -18^{\circ}\text{C}$. La durée du stockage ne doit pas excéder un mois.
- c) Décongélation rapide à l'air ambiant à une température de l'ordre de 20°C pendant le temps le plus court possible (inférieur à trois heures) sans dépasser le stade où la consistance du produit permet le prélèvement nécessaire à la préparation de la suspension mère (température voisine de 0°C).

ANNEXE II

Méthodes générales d'analyse bactériologique

1. Préparation de l'échantillon pour essai – Prise d'essai

Chaque fois qu'il est nécessaire, il est procédé à une homogénéisation du produit à l'aide de techniques et d'appareils appropriés. (broyeur-homogénéisateur par exemple).

Les prises d'essai sont effectuées sur l'échantillon homogénéisé en tenant compte de la nature des produits et des opérations analytiques à conduire. Elles sont en principe de 10, 25 ou 50 grammes (dans ce dernier cas 25 grammes sont réservés à la recherche des salmonelles).

2. suspensions mères et dilutions décimales

dans un flacon taré contenant 90, 100 ou 225 ml de diluant, introduire aseptiquement 10 ou 25 grammes de produit afin de réaliser des suspensions au 1/5 ou 1/10. Homogénéiser.

Les diluants suivants sont préconisés:

2.1 cas général

Tryptone sel:

Tryptone.....	1 g
Chlorure de sodium.....	8,5 g
Eau distillée.....	1000 ml

Préparation: chauffer lentement jusqu'à complète dissolution, ajuster si nécessaire le PH à 7,0 (+ 0,1), répartir, puis stériliser vingt minutes à 121 °C + 1.

Eau peptonée tamponnée:

Bacto peptone.....	20 g
Chlorure de sodium.....	5 g
Phosphate disodique.....	9 g
Phosphate monopotassique.....	1,5 g
Eau distillée.....	1000 ml

Stériliser à 121 °C + 1 pendant vingt minutes; PH final: 7,2

2.2 Cas des produits laitiers

Eau peptonée pour le yaourt.

Tryptone-sel pour les laits gélifiés et emprésurés.

Phosphate dipotassique à 2 p 100 (PH final entre 7,4 et 7,6) pour les crèmes fraîches, les fromages frais et les caséinates.

A partir des suspensions mères, préparer les dilutions décimales en utilisant le diluant correspondant au produit à analyser.

3. Revivification

A l'exclusion des produits laitiers, si le produit a subi un traitement thermique ou s'il a été congelé ou encore s'il renferme des sels pouvant exercer une action inhibitrice (NaCl, NaNO₃, NaNO₂...) après homogénéisation laisser le flacon à la température de laboratoire (20 °C + 2 °C) pendant trente à quarante cinq minutes (optimum quarante minutes).

4. dénombrement des micro-organismes aérobies à 30 °C

Porter en double 1 ml de l'échantillon pour essai s'il est liquide ou 1 ml de la suspension mère dans le cas des autres produits dans les boîtes de Pétri stériles (90 à 100 mm de diamètre). Pratiquer de la même manière à partir des dilutions retenues en fonction du produit à analyser.

Couler dans chaque boîte 15 ml de gélose pour dénombrement préalablement fondue et ramenée à 47 °C (+ 1 °C). bien mélanger inoculum et milieu. Laisser solidifier.

L'ensemble de ces opérations ne doit pas durer plus de quinze minutes.

Nota. Il est indispensable d'employer des pipettes stériles changées pour chaque dilution et d'homogénéiser à l'aide d'un agitateur pour tubes à essai.

Placer les boîtes retournées dans une étuve à 30 °C (+ 1 °C). Les laisser soixante-douze heures (+ trois heures).

Ne retenir pour le dénombrement que les boîtes contenant moins de 300 colonies (et plus de 30 si possible).

En cas d'expertise, se conformer aux dispositions de la norme Afnor V 08-011.

5. Dénombrement des Enterobacteriaceae

Le dénombrement s'effectue en gélose au cristal violet, rouge neutre, bile, glucose (V.R.B.G.).

A partir du flacon contenant la suspension mère (1/5 ou 1/10) porter 1 ml dans deux boîtes de Pétri stériles (90 à 100 mm de diamètre).

Couler 12/13 ml de gélose sélective fondue et ramenée à 47 °C (+ 1 °C). Bien mélanger inoculum et milieu. Laisser solidifier. Couler en surface environ 9 ml de milieu sélectif vierge ramené à 47 °C (+ 1 °C). Laisser solidifier et placer les boîtes retournées dans une étuve à 30 °C (+ 1 °C). Les laisser vingt-quatre heures (+ deux heures). Dénombrer les colonies violettes et vérifier la nature de ces colonies (les entérobactéries sont oxydases et fermentent le glucose).

6. Dénombrement des coliformes

Les coliformes sont dénombrés soit en milieu solide (gélose désoxycholate lactose), soit en milieu liquide par la technique du nombre le plus probable (N.P.P.) à l'aide du bouillon lactosé billé au vert brillant réparti dans des tubes contenant des cloches de Durham (10 ml de bouillon par tube).

6.1 le dénombrement en milieu solide s'effectue à partir du produit s'il est liquide, des suspensions mères dans les autres cas et des divisions décimales retenues selon la nature du produit en portant 1 ml dans deux boîtes de Pétri stériles (90-100 mm de diamètre).

Couler ensuite 13 ml environ de gélose désoxychlorate lactose fondue et ramenée à 47°C (+ 1 °C). Bien mélanger inoculum et milieu. Laisser solidifier. Recouvrir d'une couche de gélose désoxychlorate lactose vierge (9 ml environ), laisser solidifier.

Porter les boîtes retournées à l'étuve à 30°C (+ 1 °C). Les laisser vingt-quatre heures (+ deux heures).

Dénombrer les colonies caractéristiques rouge foncé d'un diamètre supérieur à 0,5 mm en prenant si possible une série de deux boîtes où le nombre est compris entre 15 et 150.

6.2 le dénombrement en milieu liquide s'effectue en transférant dans trois tubes de milieu sélectif 1 ml du produit s'il est liquide ou de la suspension mère, puis en opérant de la même manière pour les suspensions suivantes:

Bien mélanger inoculum et milieu.

Porter les tubes à l'étuve à 30°C (+ 1 °C). Les laisser vingt-quatre-quarante huit heures (+ deux heures).

Pour chaque dilution (y compris suspension mère et produit liquide), compter les tubes positifs c'est à dire ceux qui présentent un dégagement gazeux dans la cloche de Durham et calculer le nombre le plus probable à l'aide des tables de référence.

En cas d'expertise, se conformer aux indications des normes Afnor V 08-015 et V 08-016.

7. dénombrement des coliformes fécaux (entérobactéries fermentant le lactose aux températures élevées)

Il s'effectue:

Soit en milieu solide, selon les mêmes modalités que pour les coliformes mais en portant les boîtes de Pétri ensemencées à 44°C (+ 0,5°C) durant vingt-quatre heures (+ deux heures).

Soit en milieu liquide (technique du N.P.P.) en repiquant à l'aide d'une anse bouclée les tubes de bouillon lactosé billé au vert brillant trouvés positifs lors du dénombrement des coliformes, dans les tubes de ce même bouillon.

Les tubes ensemencés sont incubés en bain chaud à 44 °C (+ 0,5°C) vingt-quatre-quarante-huit heures (+ deux heures).

Compter les tubes positifs, c'est à dire ceux présentant un dégagement gazeux dans les cloches de Durham et calculer le nombre le plus probable à l'aide des tables de référence.

8. Dénombrement de *Staphylococcus aureus*

A partir du produit s'il est liquide, de la suspension mère et/ou des dilutions retenues selon la nature du produit, porter 0,1 ml sur deux boîtes de Pétri contenant du milieu de Baird Parker et étaler l'inoculum à l'aide d'un étaleur de verre stérile sur la surface préalablement séchée du milieu. Ce dernier ne doit pas avoir plus de quarante-huit heures et doit être conservé au froid. Pour les produits laitiers, ensemencer 1 ml en milieu de Baird Parker.

Les boîtes sont incubées à l'étuve à 37 °C (+ 1 °C) pendant vingt-quatre puis quarante-huit heures.

Dénombrer les colonies caractéristiques c'est à dire noires, brillantes, d'un diamètre compris entre 0,5 et 2 mm présentant un liseré blanc opaque, entourées d'une auréole d'éclaircissement

du milieu. Certains staphylocoques retrouvés dans les produits laitiers peuvent donner des colonies noires dépourvues d'auréole.

Repiquer au moins cinq colonies pour les soumettre aux tests de la coagulase ou de la thermonucléase.

9 dénombrement des anaérobies sulfito-réducteurs à 46°C

Ce dénombrement peut s'effectuer en milieu S.P.S., T.S.N., ou T.S.C. (Tryptone Sulfite Cyclosérine), ce dernier milieu étant recommandé.

Préparation du milieu base:

Tryptone	15 g
Soytone	5 g
Extrait de levure	5 g
Métabisulfite de sodium anhydre (S ₂ O ₅ Na ₂)	1 g
Citrate de fer ammoniacal	1 g
Agar-agar	12 à 18 g
Eau	1000 ml

Ajuster le Ph de sorte qu'après stérilisation, il soit à 7,6 + 0,1 à 25°C. Répartir en tubes de 20 X 200 à raison de 19 ml par tube. Stériliser quinze minutes à 121 °C + 1 °C. Conserver à 4-5 °C au maximum quinze jours.

Solution de D cyclosérine:

D cyclosérine cristallisée	4 g
Eau	100 ml

Dissoudre la cyclosérine dans l'eau. Stériliser par filtration

Préparation de milieu complet:

Au moment de l'emploi, ajouter la solution de D cyclosérine pour obtenir une concentration finale de 400 µgrammes/ml, soit 1 ml pour 100 ml de milieu.