

JOURNAL OFFICIEL

DE LA REPUBLIQUE DE COTE D'IVOIRE

EDITION

LOIS ET ACTES REGLEMENTAIRES

paraissant le jeudi de chaque semaine

ABONNEMENTS	6 MOIS	UN AN	ABONNEMENTS ET INSERTIONS	ANNONCES ET AVIS
Côte d'Ivoire et pays de la CAPTEAO : voie ordinaire	10.000	19.000	Les abonnements et insertions seront adressés au Service des Journaux officiels de la République de Côte d'Ivoire, B.P. V 70 Abidjan.	La ligne 1.500 francs (Il n'est jamais compté moins de 15.000 francs pour les annonces).
voie aérienne	15.000	26.000		Chaque annonce répétée Moitié prix
Etranger : France et pays extérieurs communs : voie ordinaire	12.000	22.000	Toute demande de changement d'adresse devra être accompagnée de la somme de 85 francs.	Les annonces devront parvenir au plus tard le jeudi précédant la date de parution du « J.O. ».
voie aérienne	16.000	30.000		
Autres pays : voie ordinaire	12.000	22.000	Les abonnements et les annonces sont payables d'avance au Service des Journaux officiels de la République de Côte d'Ivoire C.C.P. 115-42 Abidjan.	
voie aérienne	18.000	34.000		
Prix du numéro de l'année courante		400		
Prix du numéro d'une année antérieure		500		
Par la poste : majoration de 85 F par numéro.				

SOMMAIRE

PARTIE OFFICIELLE

1989 ACTES DU GOUVERNEMENT

MINISTÈRE DE LA SANTÉ PUBLIQUE ET DE LA POPULATION

1988

18 nov. Arrêté n° 250 MSP. DSPH. fixant les normes à respecter pour la confection de certaines denrées alimentaires et de boissons non alcoolisées. 117

PARTIE NON OFFICIELLE

Sous-préfecture de Danané. — Avis d'enquête de *commodo et incommodo*. 124

Sous-préfecture de Danané. — Avis d'enquête de *commodo et incommodo*. 124

Sous-préfecture de Danané. — Avis d'enquête de *commodo et incommodo*. 124

Conservation de la Propriété et des Droits fonciers. — Bureau d'Abidjan. — Avis de demandes d'immatriculations. 124

Direction des Recettes domaniales et de la Conservation foncière. — Avis de bornage. 126

Ministère de l'Agriculture. — Sous-direction des Affaires domaniales rurales. — Concessions domaniales. — Avis de demandes de concessions rurales. 126

Avis et annonces. 128

PARTIE OFFICIELLE

ACTES DU GOUVERNEMENT

MINISTÈRE DE LA SANTÉ PUBLIQUE ET DE LA POPULATION

ARRETE n° 250 MSP. DSPH. du 18 novembre 1988 MSP. DSPH. fixant les normes à respecter pour la confection de certaines denrées alimentaires et de boissons non alcoolisées.

LE MINISTRE DE LA SANTÉ PUBLIQUE ET DE LA POPULATION,

Vu le décret n° 88-799 du 6 octobre 1988 portant nomination des membres du Gouvernement ;

Vu le décret n° 84-721 du 30 mai 1984 portant attributions du ministre de la Santé publique et de la Population ;

Vu le décret n° 84-947 du 3 août 1984 modifiant le décret n° 84-722 du 30 mai 1984 portant réorganisation du ministère de la Santé publique et de la Population ;

Vu la loi n° 63-301 du 26 juin 1963 relative à la répression des fraudes dans la vente et la fabrication des marchandises, denrées alimentaires et des produits agricoles ;

Vu le décret n° 73-437 du 1^{er} septembre 1973 portant application de la loi n° 63-301 du 26 juin 1963 ;

Vu les nécessités de services,

ARRETE :

Article premier. — Pour être reconnus propres à la consommation, les eaux minérales, les eaux de distribution, les boissons aqueuses non alcoolisées, les dérivés du lait, les plats cuisinés et les conserves alimentaires doivent satisfaire aux critères microbiologiques fixés au présent arrêté et vérifiés selon les dispositions décrites en annexe. En outre, ils doivent être exempts de toxines et doivent être conformes à la composition qualitative et quantitative indiquée par les fabricants.

Art. 2. — Les eaux minérales et eaux d'alimentation humaine, les boissons aqueuses non alcoolisées et les boissons sucrées (Fanta, orangina, jus de fruit, etc.) doivent satisfaire aux critères microbiologiques suivants :

Désignation	Micro-organismes aérobies dans 100 millimètres	Coliformes par gramme	Coliformes fécaux par gramme	Staphylococcus aureus par gramme	Salmonella dans 25 grammes
Eaux minérales et eaux pour alimentation	100	0	0	0	0
Boissons aqueuses non alcoolisées, boissons sucrées	100	0	0	0	0

2° La présence d'un seul germe pathogène suffit pour déclarer l'eau ou la boisson incriminée impropre à la consommation.

Art. 3. — Les laits fermentés (yaourts, dèguès, kéfir, etc.), les fromages frais pasteurisés et les crèmes fraîches doivent satisfaire aux critères microbiologiques suivants :

Désignation	Micro-organismes aérobies à 30° C (par gramme)	Coliformes 30° C (par gramme)	Coliformes fécaux (par gramme)	Staphylococcus aureus (par gramme)	Salmonella dans 25 grammes	Acidité exprimée en acide lactique dans la partie non grasse
Laits fermentés (yaourt, dèguès)		10	1		Absence	
Laits gélifiés et laits pasteurisés aromatisés	10 ³	10	1		Absence	
Fromage frais pasteurisé		10	1	10	Absence	
Crème de consommation pasteurisée	3.10 ⁴ phosphate négative	conditionné 10 vrac 100	1	10	Absence	2,5
Glaces et crèmes glacées	3.10 ³	10 ²	1	10	Absence	
Caséines et caséinates	3.10 ⁴ et flore thermophile 5.10 ³	Absence dans 0,1 g			Absence	

Art. 4. — Les critères microbiologiques relatifs aux viandes hâchées, aux viandes cuites, aux produits de charcuterie, aux plats cuisinés sont les suivants :

Désignation	Micro-organismes aérobies 30° C (par gramme)	Coliformes 30° C (par gramme)	Coliformes fécaux par gramme	Staphylococcus aureus par gramme	Anaérobies sul. réducteurs 46° C (par gramme)	Salmonella dans 25 grammes
Viandes hâchées à l'avance ou à la demande	5.10 ³	10 ³	10 ²	10 ²	(1) 30	Absence
Plats cuisinés à l'avance	(2) 3.10 ⁵	10 ³	10	10 ²	30	Absence
Produits de charcuterie crus, hâchés :						
— Soumis à dessiccation et à consommation en l'état	3.10 ⁵	10 ³	10 ¹	5.10 ¹	50	Absence
— A consommer après cuisson	3.10 ⁵	10 ³	10 ¹	10 ¹	10 ²	Absence
Produits de salaison crus salés et ou séchés tranchés ou non	(3) 3.10 ⁵	10 ³	10 ³	5.10 ²	50	Absence
Produits de charcuterie cuits, tranchés ou non, quenelles	(2)(3) 3.10 ⁵	10 ³	10	10 ²	30	Absence
Jambon cuit entier	10 ⁴	10	Absence	Absence	Absence	Absence
Potages déshydratés	3.10 ⁵	10 ³	10	10 ²	30	Absence

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 30° C ($3 \cdot 10^5$) par gramme ne s'applique qu'au stade de la fabrication (usine).

Art. 5. — Les critères microbiologiques relatifs aux produits de la pêche ci-dessous mentionnés sont les suivants :

Désignation	Micro-organismes aérobies 30° C (par gramme)	Coliformes fécaux (par gramme)	Streptococcus fécaux (par gramme)	Staphylococcus aureus (par gramme)	Anaérobies sul. réducteurs 46° C (par gramme)	Salmonella dans 25 grammes
Crustacés entiers cuits réfrigérés autres que crevettes	10^1	1	—	—	2	Absence dans 25 grammes
Tous crustacés y compris crevettes entières cuites ou crues, congelés ou surgelés, crabes	10^1	1	—	—	2	Absence dans 25 grammes
Crevettes cuites décortiquées, réfrigérées et décortiquées congelées ou surgelées ...	10^1	10	—	10^2	10	Absence dans 25 grammes
Coquillages bivalves et oursins présentés vivants	—	$3 \cdot 10^2$ pour 100 ml	2,5 5.10 ² pour 100 ml (1)	—	—	Absence dans 25 grammes
Cuisses de grenouilles, escargots décoquillés surgelés ou congelés	—	—	—	—	10^2	Absence dans 1 gramme
Poissons tranchés, panés ou non, filets de poissons frais réfrigérés	10^4	10	—	10^3	10	Absence dans 25 grammes
Poissons tranchés, panés ou non, filets de poissons congelés ou surgelés	10^4	1	—	10^2	2	Absence dans 25 grammes
Préparations à base de chair de poissons hachés, crues	$5 \cdot 10^4$	10^3	—	10^1	10	Absence dans 25 grammes
Coquilles Saint-Jacques et moules précuites	10^6	10	—	10^2	30	Absence dans 25 grammes

1° Cette recherche est effectuée en cas de suspicion particulière, selon les commémoratifs, dans 100 millilitres de mélange « chair-liquide intervalvaire ».

Art. 6. — Les critères microbiologiques relatifs aux ovoproduits, pâtisseries et crèmes pâtissières sont les suivants :

Désignation	Micro-organismes aérobies 30° C (par gramme)	Coliformes 30° C (par gramme)	Coliformes fécaux (par gramme)	Staphylococcus aureus (par gramme)	Anaérobies sul. réducteurs 46° C (par gramme)	Salmonella dans 25 grammes
Pâtisserie, crèmes pâtissières	$3 \cdot 10^5$	10^1	1	10^1	10	Absence
Ovoproduits pasteurisés	10^5	—	10 entérobactéries	10^1	—	Absence
Blancs d'œufs non pasteurisés	—	—	—	—	—	Absence

Art. 7. — Les critères microbiologiques relatifs aux conserves et semi-conserves sont les suivants :

Désignation	Micro-organismes aérobies 30° C (par gramme)	Coliformes 30° C (par gramme)	Coliformes fécaux (par gramme)	Staphylococcus aureus (par gramme)	Anaérobies sul. réducteurs 46° C (par gramme)	Salmonella dans 25 grammes
Conserves et semi-conserves pasteurisées (1)	10 ⁴	Absence	Absence	Absence	Absence	Absence
Semi-conserves pasteurisées (1)	10 ⁴	Absence	Absence	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.

Art. 8. — L'inspection des établissements fabricants de produits visés à l'article premier du présent arrêté est effectuée par la direction des Services pharmaceutiques et l'Institut d'Hygiène qui peuvent recourir au Laboratoire national de la Santé publique, au Laboratoire de Nutrition et de Diététique de l'Institut national de la Santé publique, au laboratoire de l'Institut d'Hygiène et à tout autre laboratoire compétent pour le contrôle analytique effectif des normes précitées.

A l'occasion des visites d'inspection, les responsables de ces établissements sont tenus de présenter aux inspecteurs, les résultats de contrôle de qualité des produits visés à l'article premier du présent arrêté.

Art. 9. — Les conclusions des rapports d'inspection seront, le cas échéant, transmises aux différents ministères dont relèvent les statuts des établissements concernés.

Art. 10. — Le non respect des normes fixées dans le présent arrêté expose l'établissement concerné aux sanctions prévues par la loi n° 63-301 du 26 juin 1963 et par le décret n° 73-437 du 1^{er} septembre 1973.

Art. 11. — La direction des Services pharmaceutiques et l'Institut d'Hygiène sont chargés de veiller à l'application du présent arrêté qui sera publié au *Journal officiel* de la République de Côte d'Ivoire.

Abidjan, le 18 novembre 1988.

Alphonse DJEDJE MADY.

ANNEXE

à l'arrêté n° 250 du 18 novembre 1988 MSP. DSPH. fixant les normes à respecter pour la confection de certaines denrées alimentaires et de boissons non alcoolisées.

Observations :

a) Les résultats des dénombrements doivent être rapportés au gramme ou au millilitre. En cas de recherche, le poids ou le volume d'inoculum doit être précisé ;

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

c) Malgré les contraintes liées en particulier à la diversité des fabrications dans notre pays, il a été tenu le plus grand compte possible dans la présente annexe de l'esprit des travaux menés actuellement au sein des instances internationales dans les domaines de l'échantillonnage et de l'interprétation des résultats, notamment quant aux

modalités d'interprétation des résultats d'analyses microbiologiques, dans le but d'éviter que des conclusions non justifiées ne soient tirées des résultats obtenus ;

d) En milieu solide les dénombrements donnant un nombre de colonies inférieur à 10 ne peuvent conduire qu'à une approximation numérique de la contamination d'un gramme de produit. Dans ce cas, il convient d'exprimer le nombre de colonies observées pour l'inoculum réellement utilisé ;

e) Afin d'améliorer la fiabilité des résultats, il est recommandé d'utiliser les milieux complets déshydratés ou des composants de base déshydratés et de suivre scrupuleusement les prescriptions du fabricant.

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 3, 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 intervalvaire.

Il est à noter que 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.

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.

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 tranche, hachés ou divisés, ainsi que 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 toxiféctions 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 1/2 log. avec les milieux solides et 1 log. avec les milieux liquides.

2.1. — Plan à trois classes :

Principes :

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 arrêté. Tous les résultats égaux ou inférieurs sont considérés comme 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 des variations liées à la technique microbiologique, remarque supra) :

a) La qualité du lot est considérée comme satisfaisante ou acceptable en application de l'article premier du présent arrêté lorsque, aucun résultat ne dépasse M :

- Les valeurs observées sont :

$\leq 3 m$ lors d'emploi de milieu solide		Qualité satisfaisante
$\leq 10 m$ lors d'emploi de milieu liquide		

— 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
- et $\frac{c}{n}$ est $\leq 2/5$ avec le plan $n = 5$ et $c = 2$: qualité acceptable (ou tout autre plan d'efficacité équivalente ou supérieure).

b) Les résultats sont considérés comme non satisfaisants :

— Lorsque les valeurs observées sont comprises :

- Entre $3 m$ et $10 m$ en milieu solide ;
- Entre $3 m$ et $10 m (= M)$ en milieu solide
- et $\frac{c}{n} \leq 2/5$.

— Dans tous les cas où les valeurs supérieures à M sont observées. Cependant, le seuil de dépassement pour les micro-organismes aérobies à $+ 30^\circ C$, 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 limite S qui est fixée dans le cas général à 10^7 . Les tolérances liées aux techniques d'analyses 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 la tolérance analytique.

Nota. — Ce plan est en particulier applicable aux contaminations par salmonelle. Cependant, pour les volailles, lorsqu'il s'agit de contamination superficielle, le lot est considéré comme satisfaisant lorsque le rapport $\frac{d}{n} \leq 1/5$, 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 ou d'origine animale ne répondent pas aux épreuves de stabilité fixées à l'article 7 du présent arrêté 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 le 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 devront 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 $- 10^\circ C$ le plus rapidement possible ;

b) Stockage et transport à une température $\geq - 18^\circ C$. La durée de stockage ne doit pas excéder un mois ;

c) Décongélation rapide à l'air ambiant à une température de l'ordre de $20^\circ C$ 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 $0^\circ C$).

ANNEXE II

METHODES GENERALES D'ANALYSES BACTERIOLOGIQUES

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 technique 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 contenant 90, 100 ou 125 millilitres de diluant, introduire aseptiquement 10 ou 25 grammes de produit afin de réaliser des suspensions au 1/5 ou 1/10. Homogénéisés.

Les diluants suivants sont préconisés :

2.1. — Cas général :

Tryptone sel :

Tryptone	1 g
Chlorure de sodium	8,5 g
Eau distillée	1 000 ml

Préparation :

Chauffer lentement jusqu'à complète dissolution, ajuster si nécessaire le PH à 7,0 ($\pm 0,1$), répartir puis stériliser vingt minutes à 121° C ± 1 .

Eau peptonnée tamponnée :

Bacto peptone	20 g
Chlorure de sodium	5 g
Phosphate disodique	9 g
Phosphate monopotassique	1,5 g
Eau distillée	1 000 ml

Stériliser à 121 °C ± 1 pendant vingt minutes ; pH final : 7,2.

2.2. — Cas des produits laitiers :

Eau peptonnée 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.

3° Rectification

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 (Na No 3, NaNo 2)... après homogénéisation, laisser le flacon à la température du 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 millilitre de l'échantillon pour essai s'il est liquide ou 1 millilitre de suspension mère dans le cas des autres produits, dans des boîtes de Pétri stériles (90 à 100 millimètres de diamètre). Pratiquer de la même manière à partir des dilutions retenues en fonction du produit à analyser.

Couler dans chaque boîte 15 millilitres de gélose pour dénombrement préalablement fondue et ramenée à 47° C (± 1 ° C). Bien mélanger inoculum et milieu.

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 (\pm trois heures).

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

5° Dénombrement des entérobactériacées

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 millilitre dans une boîte de Pétri stérile (90 à 100 millimètres de diamètre). Faire l'essai en double.

Couler 12/13 millilitre de gélose sélective fondue et ramenée à 47° C (± 1 ° C). Bien mélanger inoculum et milieu. Laisser solidifier. Couler en surface environ 9 millilitres de milieu sélectif vierge ramené à 47° C (± 1 ° C). Les laisser vingt-quatre heures (\pm deux heures). Dénombrer les colonies (les entérobactéries sont oxydases et fermentent le glucose).

6° Dénombrement des coliformes

Les coliformes sont dénombrées, 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 bilié au vert brillant réparti dans des tubes contenant des cloches de Durham (10 millilitres 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 dilutions décimales retenues selon la nature du produit en portant 1 millilitre dans une boîte de Pétri stérile (90 — 100 millimètres de diamètre). Réaliser chaque encencement en double.

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

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

Dénombrer les colonies caractéristiques rouge foncé d'un diamètre supérieur à 0,5 millimètre 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 triple essai en transférant dans chaque tube de milieu sélectif 1 millilitre du produit s'il est liquide ou de la suspension mère puis en opérant de la même manière pour les dilutions suivantes :

— Porter les tubes à l'étuve à 30° C (± 1 ° C). Les laisser vingt-quatre quarante-huit heures (\pm 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.

7° Dénombrement des coliformes fécaux

Entérobactéries permettant le lactose aux températures élevées. Il s'effectue :

— Soit en milieu solide, selon les mêmes modalités que pour les coliformes mais portant les boîtes de Pétri ensemençées à + 44° C ($\pm 0,5$ ° C) durant vingt-quatre heures (\pm 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 bilé au vert brillant trouvés positifs lors du dénombrement des coliformes, dans des tubes de ce même bouillon.

Les tubes ensemencés sont incubés en bain d'eau à 44° C ($\pm 0,5^\circ$ C) vingt-quatre — quarante-huit heures (\pm 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 millilitre sur une boîte de Pétri contenant du milieu de *Baird Parker* et étaler l'inoculum à l'aide d'un étaleur de verre sur la surface préalablement séchée du milieu. Ce dernier ne doit pas avoir plus de quarante-huit heures et doit être conservé au froid. Effectuer chaque ensemencement en double. Pour les produits laitiers, ensemencer 1 millilitre en milieu de *Baird Parker*.

Les boîtes sont incubées à l'étuve à 37° C ($\pm 1^\circ$ 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 millimètres, présentant un liseré blanc opaque, entourées d'une auréole d'éclaircissement du milieu. Certains staphylocoques retrouvés dans les produits laitiers peuvent donner des colonies dépourvues d'auréole.

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

En cas d'expertise, se conformer aux indications de la norme AFNOR V OS-014.

9° Dénombrement des anaérobies sulfite-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. En raison de sa relative nouveauté, sa composition est rappelée ci-après :

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 :

Agar-agar	12 à 18 g
Eau	1 000 ml

Ajuster le pH de sorte qu'après stérilisation, il soit à $7,6 \pm 0,1$ à 25° C. Répartir en tube de 20 x 200 à raison de 19 millilitres par tube. Stériliser quinze minutes à 121° C $\pm 1^\circ$ C. Conserver à 45° C au maximum quinze jours.

Solutions de *D cyclosérine* :

<i>D cyclosérine</i> cristallisée	4 g
Eau	100 ml

Dissoudre la cyclosérine dans l'eau, stériliser par filtration. Préparation du milieu complet.

Au moment de l'emploi, ajouter la solution de *D cyclosérine* pour obtenir une concentration finale de 400/1g/millilitre, soit 1 millilitre pour 100 millilitres de milieu, soit 0,20 millilitre pour 20 millilitres ou 0,25 millilitre pour 25 millilitres de milieu.

10° Dénombrement des streptocoques fécaux (ne concerne que les produits de la pêche)

Il s'effectue en milieu liquide par la technique du nombre le plus probable (N.P.P.).

Ensemencer chaque tube de 10 millilitres de milieu de tothe avec 1 millilitre de suspension mère ou des différentes dilutions au 1/20, 1/200, 1/2000 (ensemencer trois tubes par dilution).

Faire incuber les tubes à 37° C ($\pm 1^\circ$ C) vingt-quatre — quarante-huit heures.

Repiquer les tubes positifs, c'est-à-dire ceux montrant une croissance bactérienne, dans des tubes contenant du milieu de litsky (une anse bouclée).

Faire incuber les tubes à 37° C ($\pm 1^\circ$ C) vingt-quatre — quarante-huit heures.

Compter les tubes positifs (troubles et/ou avec pastille violette au fond des tubes) pour chaque dilution et calculer le N.P.P. en utilisant les tables de référence.

Recherche de salmonella

En cas d'expertise se conformer aux indications de la norme AFNOR V 08-13. Dans les autres cas, utiliser la technique suivante :

Préenrichissement : s'effectue en eau peptonée tamponnée (voir annexe 2, 2.1), pendant quatre heures à 37° C ($\pm 1^\circ$ C) pour les ovoproduits et ceux dont la teneur microbienne initiale est présumée importante, et pendant seize à vingt heures à 37° C ($\pm 1^\circ$ C) dans les autres cas.

Le rapport entre la prise d'essai et le volume du milieu doit être 1/10.

Enrichissement : à partir du milieu de préenrichissement, porter 1 millilitre dans 10 millilitres de tétrathionate de Na et vert brillant (T.V.B.) et 1 millilitre dans 10 millilitres de bouillon en sélénite de Na. Faire incuber à 37° C ($\pm 1^\circ$ C) pendant vingt-quatre heures.

Isolement : après vingt-quatre heures et éventuellement quarante-huit heures d'incubation effectuer, à partir des milieux d'enrichissement, des isolements à la surface d'un deuxième milieu sélectif.

Faire incuber les boîtes à 37° C ($\pm 1^\circ$ C) pendant vingt heures (\pm deux heures). Si le développement est insuffisant, poursuivre l'incubation.

S'il y a présence de colonies caractéristiques ou douteuses, en repiquer un nombre suffisant et les soumettre aux essais biochimiques classiques.

Nota : Dans l'éventualité où l'analyse porte sur de nombreux échantillons d'un même lot, une technique simplifiée peut être mise en œuvre. Elle comporte :

— Préenrichissement (sans changement) ;

— Enrichissement :

Un tube de bouillon tétrathionate incubé à 43° C ($\pm 0,5^\circ$ C).

— Isolement :

Sur gélose au vert brillant et rouge de phénol seulement.