

Arrêté du 21 décembre 1979
relatif aux critères microbiologiques auxquels doivent satisfaire certaines denrées
animales ou d'origine animale (mod. par ...)

(JONC du 19 janvier 1980)

Le ministre de l'agriculture et le ministre des transports,

Vu le décret no 71-636 du 21 juillet 1971, pris pour l'application des articles 258, 259 et 262 du code rural et relatif à l'inspection sanitaire et qualitative des animaux vivants et des denrées animales ou d'origine animale, et notamment son article 3 ainsi conçu : « Des arrêtés du ministre de l'agriculture et, lorsqu'il s'agit de produits de la mer, des arrêtés conjoints du ministre de l'agriculture et du ministre chargé des pêches maritimes fixeront les normes sanitaires et qualitatives auxquelles devront satisfaire les animaux, les denrées animales et les denrées d'origine animale, pour être reconnus propres à la consommation » ;

Vu l'arrêté du 15 mai 1974 concernant les viandes hachées destinées à la consommation humaine ;

Vu l'arrêté du 26 juin 1974 réglementant les conditions d'hygiène relatives à la préparation, la conservation, la distribution et la vente des plats cuisinés à l'avance ;

Vu l'arrêté du 8 juillet 1977 sur les ovoproduits destinés à la consommation humaine,

Arrêtent :

Art. 1 - 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 annexe. 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, pâtisseries, crèmes pâtisseries ;
- laits fermentés (yaourts, kéfir,...), laits gélifiés, fromages frais pasteurisés, crèmes fraîches pasteurisées, glaces et crèmes glacées, caséines et caséinates ;
- conserves à base de denrées animales ou d'origine animale ;
- semi-conserves à base de denrées animales ou d'origine animale ;
- graisses animales ;
- (Arr. 17 sept. 1984) « lait de producteur destiné à un traitement thermique ou à la transformation » ;
- (Arr. 23 mars 1993, art. 1er) « camemberts fabriqués à partir de lait cru à l'exception de ceux bénéficiant d'une appellation d'origine ».

Art. 2 - Au sens de l'article 1er, les critères microbiologiques relatifs aux viandes de boucherie sont les suivants :

Désignation	Micro-organismes aérobies 30 °C (par gramme)	Califormes fécaux (par gramme)	Staphylococcus aureus (par gramme)	Anaérobies sulfito-réducteurs 46 °C (par gramme)	Salmonella dans 25 grammes
Carcasses ou coupes de demi-gros, réfrigérées ou congelées (1)	(3) 5.102	»	»	2	Absence

Pièces conditionnées sous vide ou non, réfrigérées ou congelées (1)	(3) 5.104	102	»	2	Absence
Portions unitaires conditionnées réfrigérées ou congelées et portions unitaires du commerce de détail réfrigérées ou congelées (2)	»	3.102	102	10	Absence
(1) Le prélèvement est effectué en profondeur, après cautérisation de la surface. (2) Le prélèvement concerne profondeur plus surface sans cautérisation. (3) Seules les tolérances de caractère analytique sont acceptées (plan à deux classes).					

Art. 3 - (Arr. 29 févr. 1996, art. 40) « Les critères microbiologiques relatifs aux viandes cuites, aux produits de charcuterie, aux plats cuisinés et aux potages déshydratés 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 sulfito-réducteurs 46 °C (par gramme)	Salmonella dans 25 grammes
Plats cuisinés à l'avance, escargots préparés, pièces de viandes cuites tranchées ou non	(2) 3.105	103	10	102	30	Absence
Produits de charcuterie crus, hachés :						
Soumis à dessiccation et à consommer en l'état	»	»	102	5.102	50	Absence
Produits de	(3) »	»	103	5.102	50	Absence

salaison crus salés et/ou séchés, tranchés ou non						
Produits de charcuterie cuits, tranchés ou non, quenelles	(2) (3) 3.105	103	10	102	30	Absence
Jambon cuit entier	104	10	Absence	Absence	Absence	Absence
Potages déshydratés	3.105	103	10	102	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 (3.105) par gramme ne s'applique qu'au stade de la fabrication (usine).

Art. 4 - Les critères microbiologiques relatifs aux viandes de volaille sont les suivants :

Désignation	Micro-organismes aérobies 30 °C (par gramme)	Coliformes fécaux (par gramme)	Staphylococcus aureus (par gramme)	Anaérobies sulfito-réducteurs 46 °C (par gramme)	Salmonella
Volailles entières réfrigérées, congelées ou surgelées	»	»	»	»	Absence dans 25 grammes de muscles pectoraux
Rôtis, escalopes et paupiettes crus, panés ou non	5.105	103	5.102	30	Absence dans 1 gramme (1)
Rôtis cuits, entiers ou tranchés et paupiettes cuites ou précuites	3.105	10	102	10	Absence dans 25 grammes
Viande crue séparée mécaniquement	106	5.103	103	102	Absence dans 1 gramme (1)

.....					
Viande cuite séparée mécaniquement	3.105	10	102	30	Absence dans 25 grammes
..... (Arr. 5 mars 1985, art.1)Viande crue séparée mécaniquement traitée par rayonnements ionisants (3)	104	50	10	1	Absence dans 25 grammes
.....					
(1) Critère provisoire. (3) (Arr. 5 mars 1985, art. 2) « Seules les viandes crues séparées mécaniquement répondant aux critères microbiologiques les rendant propres à la consommation, à l'exception de ceux visant les salmonelles, pourront être traitées par rayonnements ionisants conformément aux dispositions réglementaires en vigueur. »					

Art. 5 - Les critères microbiologiques relatifs aux produits de la pêche ci-dessous mentionnés sont les suivants (1) :

Désignation	Micro-organismes aérobies 30 °C (par gramme)	Coliformes fécaux (par gramme)	Streptocoques fécaux (par gramme)	Staphylococcus aureus (par gramme)	Anaérobies sulfito-réducteurs 46 °C (par gramme)	Salmonella
Crustacés entiers cuits réfrigérés autres que crevettes	105	1	»	»	2	Absence dans 25 grammes
Tous crustacés, compris crevettes entières cuites ou crues, congelés ou surgelés	103	1	»	»	2	Absence dans 25 grammes
Crevettes cuites décortiquées réfrigérées et décortiquées congelées ou surgelées	105	10	»	102	10	Absence dans 25 grammes

(Arr. 2 juin 1988, art. 1)Escargots décoquillés surgelés ou congelés	»	»	»	»	103 (2)	Absence dans 1 gramme (3)
(Arr. 13 mars 1989, art. 1)Cuisses de grenouilles fraîches, congelées ou surgelées (6)	5.105	102	»	102 (2)	»	Absence dans 25 grammes
Poissons tranchés, panés ou non, filets de poisson frais réfrigérés ...	105	10	»	102 (2)	10	Absence dans 25 grammes
(Arr. 13 mars 1989, art. 1)Poissons tranchés, panés ou non, filets de poisson congelés ou surgelés	5.104	0	»	102	2	Absence dans 25 grammes
Préparations à base de chair de poisson, hachées, crues	5.105	10	»	102	2	Absence dans 25 grammes
Coquilles Saint-Jacques et moules précuites	106	10	»	102	30	Absence dans 25 grammes

- (1) Cette recherche est effectuée en cas de suspicion particulière, selon les commémoratifs, dans 100 ml de mélange « chair-liquide intervalvaire ».
- (2) Seules les tolérances d'origine analytique sont acceptées (plan à deux classes).
- (3) Critère provisoire.
- (5) Seules les cuisses de grenouilles répondant aux critères mentionnés, à l'exception de ceux visant les Salmonella, peuvent être destinées au traitement par rayonnements ionisants (art. 2 de l'arrêté du 2 juin 1988).
- (6) Ces critères s'appliquent aussi aux cuisses de grenouilles congelées ou surgelées traitées par rayonnements ionisants.

Art. 6 - Les critères microbiologiques relatifs aux ovoproduits, pâtisseries et crèmes pâtisseries 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 sulfito-réducteurs 46 °C (par gramme)	Salmonella dans 25 grammes
Pâtisseries, crèmes pâtisseries	3.105	103	1	102	10	Absence

	Micro-organismes aérobies 30 °C (par gramme)	Entérobactéries par gramme ou par ml	Staphylococcus aureus par gramme ou par ml	Salmonella dans 25 grammes ou 25 ml		
(Arr. du 11 mars 1998, art. 1) Ovoproduits traités thermiquement	104	10	Absence	Absence		

Art. 7 - (Arr. 20 déc. 2000, art. 1er) Les produits visés au présent article doivent être exempts de micro-organismes ou toxines à des niveaux dangereux pour la santé publique. En outre, les critères microbiologiques et biochimiques applicables aux laits de consommation ou aux produits laitiers non revêtus d'une estampille de salubrité communautaire, d'une part, et, d'autre part, aux laits de consommation ou aux produits laitiers revêtus d'une marque de salubrité communautaire jusqu'à leur date limite de consommation (DLC) 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)	Salmonella (par gramme)	Entérobactéries (par gramme)	Coliformes fécaux (par gramme)
Lait pasteurisé conditionné jusqu'à J + 4.	30 000	10	Absence dans 1 ml	10	Absence dans 250 ml	Négative	

Art. 8 - Les conserves à base de denrées animales ou d'origine animale, quelle que soit la nature de leur emballage, doivent satisfaire à des épreuves permettant de vérifier leur stabilité.

Ne doivent pas être soumis à ce contrôle les boîtes métalliques ou les bocaux en verre à couvercles déformables présentant des défauts majeurs tels que bombement, flocage, fuitage. Il en va de même pour les conserves présentées en emballage en matière plastique ou complexes métalloplastiques qui présenteraient une modification apparente de l'emballage.

Les épreuves comportent les opérations suivantes :

- étuvage d'individus à 37 °C (± 1 °C) durant sept jours et à 35 °C (± 1 °C) durant dix jours ;
- étuvage d'individus à 55 °C (± 2 °C) durant sept jours.

A l'issue de ces épreuves aucun bombement ou fuitage ne doit être constaté.

Une appréciation de la variation du pH entre les unités étuvées et des unités non étuvées témoins, laissées à la température du laboratoire pendant les durées précitées, cette température devant être cependant inférieure à 25 °C. La variation de pH ne doit pas dépasser 0,5 unité.

Une appréciation de la variation de la flore microbienne entre unités étuvées et non étuvées. Soit n le nombre de micro-organismes dénombrés sur 20 champs microscopiques observés sur une boîte incubée, et n_0 le nombre de micro-organismes dénombrés sur une boîte non incubée, le rapport doit être inférieur à 100.

Nota. - 1. Ce rapport apparemment élevé n'a pas pour but de tolérer une multiplication même modérée des micro-organismes. Il n'est établi à cette valeur qu'en raison de l'inconstance de la reproductibilité de l'examen bactérioscopique.

2. 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.

3. En cas de litige, il peut être fait application des normes Afnor V 08-401 et V 08-402 relatives au contrôle de la stabilité des conserves.

Art. 9 - Les critères microbiologiques relatifs aux semi-conserves à base de denrées animales ou d'origine animale sont les suivants :

Art. 10 - Les critères microbiologiques relatifs aux graisses animales sont les suivants :

Art. 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.

Annexe I

Observations

Les valeurs indiquées dans les tableaux du présent arrêté 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.

Malgré les diverses contraintes liées en particulier à la disparité 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.

1 - Échantillon pour laboratoire et technique de prise d'essai

1.1 - Échantillon 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 intervalvaire.

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, toxicogènes 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

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 arrêté. 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 technique microbiologique, remarque supra).

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

a) Les valeurs observées sont (qualité satisfaisante) :

£ 3 m lors d'emploi de milieu solide ;

£ 10 m lors d'emploi de milieu liquide ;

b) Les valeurs observées sont comprises (qualité acceptable) :

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

- entre 10 m et 30 m (= M) en milieu liquide,

et est £ 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 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 limite S qui est fixée dans le cas général à m 103. Pour *Staphylococcus aureus*, cette valeur S ne doit jamais pouvoir 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 £ 1/5, 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 ou d'origine animale ne répondent pas aux épreuves de stabilité fixées à l'article 8 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 oeuvre.

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 \pm -18 °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 °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 1 000 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 \pm 1.

Eau peptonée 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 \pm 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 (Na Cl, Na NO₃, Na NO₂...) après homogénéisation laisser le flacon à la température du laboratoire (20 °C \pm 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 (VRBG).

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 (NPP) à l'aide du bouillon lactosé bilié 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 dilutions 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 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 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 dilutions 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 ($\pm 0,5$ °C) durant vingt-quatre heures (\pm deux heures) ;
- soit en milieu liquide (technique du NPP) en repiquant à l'aide d'une anse bouclée les tubes de bouillon lactosé bilié 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 ($\pm 0,5$ °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 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.

En cas d'expertise, se conformer aux indications de la norme Afnor V 08-014.

9 - Dénombrement des anaérobies sulfite-réducteurs (à 46 °C)

Ce dénombrement peut s'effectuer en milieu SPS, TSN ou TSC (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 1 g
- agar-agar 12 g 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 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 du milieu complet :

Au moment de l'emploi, ajouter la solution de D cyclosérine pour obtenir une concentration finale de 400 mg/ml soit 1 ml pour 100 ml de milieu soit 0,20 pour 20 ml ou 0,25 pour 25 ml 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 (NPP).

Ensemencer successivement trois tubes de milieu de Rothe avec 1 ml de suspension mère ou des différentes dilutions au 1/20, 1/200, 1/2 000 (trois tubes par dilution).
Faire incuber les tubes 37 °C (± 1 °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 37 °C (± 1 °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 NPP en utilisant les tables de référence.

11 - Recherche des Salmonella

En cas d'expertise se conformer aux indications de la norme Afnor V 08-013. 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 (± 1 °C) pour les ovo-produits et ceux dont la teneur microbienne initiale est présumée importante, et pendant seize à vingt heures à 37 °C (± 1 °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 2 ml :

- dans deux tubes de bouillon Muller Kauffmann au tétrathionate et vert brillant (20 ml par tube) ;

- dans deux tubes de bouillon au sélénite (20 ml par tube).

Faire incuber à 37 °C (± 1 °C) : un tube de bouillon au tétrathionate et un tube de bouillon au sélénite.

Faire incuber à 43 °C (± 1 °C) : un tube de bouillon au tétrathionate et un tube de bouillon au sélénite.

Isolement :

Après vingt-quatre heures et éventuellement quarante-huit heures d'incubation, effectuer, à partir des milieux d'enrichissement, des isolements à la surface de géloses au vert brillant et au rouge de phénol et, si possible, à la surface d'un deuxième milieu sélectif.

Faire incuber les boîtes à 37 °C (± 1 °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.

Adresser les souches repiquées sur gélose nutritive au service des entérobactéries du laboratoire central d'hygiène alimentaire, 43, rue de Dantzig, 75015 Paris.

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

Elle comporte :

- préenrichissement (sans changement) ;

- enrichissement :

- un tube de bouillon tétrathionate incubé à 43 °C ($\pm 0,5$ °C) ;

- isolement :

- sur gélose au vert brillant et rouge de phénol seulement.

Remarques générales

Expression des résultats

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 précis.

Valeur de certains résultats

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.

Milieux de culture

Afin d'améliorer la fidélité 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.