**Méthode horizontale pour le dénombrement des micro-organismes — Technique par comptage des colonies à 30 °C « ISO 4833 »**

**1. Domaine d'application**

La présente Norme internationale spécifie une méthode horizontale pour le dénombrement des microorganismes par comptage des colonies obtenues en milieu solide après incubation en aérobiose à 30 °C. En dehors des limitations exposées en introduction, la présente Norme internationale est applicable aux produits destinés à la consommation humaine ou à l’alimentation animale.

**2. Termes et définitions**

Micro-organisme : bactéries, levures ou moisissures formant des colonies dénombrables, se développant dans les conditions spécifiées dans la présente norme internationale.

**3. Principe**

* **ISO 4833 (1) :** Ensemencement en profondeur d’un milieu de culture défini, coulé dans deux boîtes de Petri, avec une quantité déterminée de l’échantillon pour essai si le produit à examiner est liquide, ou avec une quantité déterminée de suspension mère dans le cas d’autres produits. Préparation d’autres paires de boîtes de Petri, dans les mêmes conditions, à partir de dilutions décimales de l’échantillon pour essai ou de la suspension mère.
* **ISO 4833 (2) :** Ensemencement en surface d’une quantité déterminée de l'échantillon pour essai, ou une quantité déterminée de suspension mère dans le cas d’autres produits sur un milieu de culture gélosé contenu dans des boîtes de Pétri.
* Incubation en aérobiose des boîtes à 30 °C, pendant 72 h.
* Calcul du nombre de micro-organismes par millilitre ou par gramme d’échantillon, à partir du nombre de colonies obtenues dans les boîtes de Petri choisies (moins de 300 colonies).

**4. Milieux de culture et diluants**

* Diluants **«**ISO 6887 » :

- Solution de peptone-sel : composée de : Digestat enzymatique de caséine (1,0 g), Chlorure de sodium (8,5 g), Eau (1000 ml) ; **ou**

- Eau peptonée tamponnée : composée de : Digestat enzymatique de tissus animaux (10,0 g), Chlorure de sodium (NaCl) (5,0 g), Hydrogénophosphate disodique dodécahydraté (9,0 g), Dihydrogénophosphate de potassium (1,5 g), Eau (1000 ml).

* Gélose pour dénombrement (PCA) : sa composition : Digestat enzymatique de caséine (5,0 g), extrait de levure (2,5 g), glucose anhydre (1,0 g), agar (9 g à 18 g), Eau (1000 ml).

**5. Appareillage et verrerie**

* Appareils pour la stérilisation en chaleur sèche (four) ou en chaleur humide (autoclave)
* Étuve, réglable à 30 °C ± 1 °C.
* Boîtes de Petri, en verre ou en plastique, de 90 mm à 100 mm de diamètre.
* Pipettes, de 1 ml et 0.1 ml.
* Bain d’eau, réglable à une température comprise entre 44 °C et 47 °C.
* Appareil de comptage de colonies, constitué par exemple d’une base éclairée avec un fond noir, muni d'une lentille grossissante de grossissement approprié d'environ × 1,5 et d’un compteur numérique mécanique ou électronique.
* Tubes à essais ou fioles, de capacité appropriée et ne dépassant pas 500 ml.

**6. Échantillonnage**

Il est important que le laboratoire reçoive un échantillon réellement représentatif, non endommagé ou modifié pendant le transport ou le stockage.

**7. Préparation de l'échantillon pour essai**

Les échantillons doivent être manipulés de façon à éviter tout risque de contamination. Pour cela, les précautions suivantes doivent être prises:

- dans le cas où l´on ne travaille pas sous hotte de sécurité, prélever la prise d´essai à proximité d´une flamme;

- pour un produit placé dans un emballage, nettoyer la partie extérieure qui sera ouverte avec de l´éthanol à 70 %; flamber si possible;

- tout instrument servant à ouvrir un emballage (ouvre-boîtes, paire de ciseaux, etc.) doit être stérile;

- tout instrument servant à prélever l´échantillon (spatule, pince, pipette, etc.) doit être stérile;

- reporter soigneusement la référence de l´échantillon de laboratoire sur les récipients, les sachets en matière plastique, etc. renfermant l´échantillon pour essai.

**8. Mode opératoire**

**8.1. Prise d’essai, suspension mère et dilutions «**ISO 6887 » :

* Dans un bol ou dans un sac en plastique stériles, peser une masse m g, ou mesurer un volume V ml (au minimum 10 g ou 10 ml, sauf spécification contraire) représentatifs de l'échantillon pour essai (Prise d’essai). Ajouter une quantité de diluant égale à 9 x m g ou 9 x V ml. Cette quantité peut être mesurée de préférence en masse ou en volume. Pour éviter d'endommager les micro-organismes par de brusques changements de température, la température du diluant doit être proche de la température ambiante.
* Homogénéiser le mélange (prise d’essai et diluant) par l’utilisation d’un homogénéisateur de type péristaltique avec des sacs stériles en plastique et comportant éventuellement un variateur de vitesse et un minuteur (1 min à 2 min).
* Si nécessaire, laisser les grosses particules se déposer durant 15 min au maximum.
* Transvaser, à l'aide d'une pipette stérile 1 ml de la suspension mère dans un tube contenant 9 ml de diluant stérile à la température appropriée. Pour une précision optimale, ne pas introduire la pipette dans la suspension mère de plus de 1 cm. Éviter tout contact entre la pipette contenant l'inoculum et le diluant stérile.
* Mélanger soigneusement la prise d'essai et le diluant, en utilisant de préférence un agitateur mécanique pendant 5 s à 10 s, pour obtenir la dilution 10–2.
* Si nécessaire, répéter ces opérations sur la dilution 10–2 et les dilutions décimales suivantes en utilisant à chaque dilution une nouvelle pipette stérile afin d'obtenir les dilutions 10–3, 10–4, etc., jusqu'à obtention du nombre approprié de micro-organismes.

**8.2. Ensemencement et incubation**

**8.2.1. Ensemencement dans la masse (ensemencement en profondeur)**

* Prendre deux boîtes de Petri stériles. À l’aide d’une pipette stérile, transférer, dans chacune des boîtes, 1 ml de l’échantillon pour essai si le produit est liquide, ou 1 ml de la suspension mère dans le cas d’autres produits (dilution à 10−1).
* Prendre deux autres boîtes de Petri stériles. À l’aide d’une nouvelle pipette stérile, transférer, dans chacune des boîtes, 1 ml de la première dilution décimale (10−1) de l’échantillon pour essai (si le produit est liquide) ou 1 ml de la première dilution décimale (10−2) de la suspension mère (dans le cas d’autres produits).
* Recommencer, si nécessaire, ces opérations avec les dilutions suivantes, à l’aide d’une nouvelle pipette stérile, pour chaque dilution décimale.
* Si approprié et si possible, sélectionner les dilutions critiques (au moins deux dilutions décimales successives) afin d'ensemencer des boîtes de Petri sur lesquelles croîtront entre 15 et 300 colonies par boîte.
* Couler, dans chaque boîte de Petri, environ 12 ml à 15 ml de la gélose pour dénombrement, entre 44 °C et 47 °C. Le temps qui s’écoule entre la fin de la préparation de la suspension mère (ou de la dilution 10−1 dans le cas d’un produit liquide) et le moment où les dilutions sont coulées sur le milieu de culture ne doit pas dépasser 45 min.
* Mélanger soigneusement l’inoculum au milieu de culture en faisant tourner les boîtes de Petri de façon à obtenir une répartition homogène des microorganismes dans la masse du milieu, laisser le mélange se solidifier en posant les boîtes de Petri sur une surface fraîche et horizontale (le temps de solidification de la gélose ne doit pas dépasser 10 min).
* Après solidification complète et uniquement dans le cas où il est suspecté que le produit à examiner contient des micro-organismes dont les colonies envahissent la surface du milieu (par exemple *Proteus* spp.), couler à la surface du milieu ensemencé environ 4 ml du milieu double couche, entre 44 °C et 47 °C. Laisser se solidifier comme décrit ci-dessus.
* Retourner les boîtes ainsi préparées et les placer à l’étuve à 30 °C ± 1 °C pendant 72 h ± 3 h. Ne pas empiler plus de 6 boîtes. Les piles de boîtes doivent être séparées les unes des autres, ainsi que des parois et du haut de l'étuve.

**8.2.2. Ensemencement en surface**

* Tout d’abord, il faut couler le milieu de culture gélosé en surfusion dans les boîtes de Petri de façon à obtenir une épaisseur d´au moins 2 mm (par exemple pour des boîtes de 90 mm de diamètre, au moins 12 ml de gélose sont normalement nécessaire).
* Laisser refroidir et solidifier le milieu gélosé en posant les boîtes de Petri sur une surface fraîche et horizontale.
* Déposer l´inoculum (0.1 ml) au centre de la boîte de Petri identifiée, sur le milieu de culture gélosé. L´étaler de façon uniforme et le plus rapidement possible à la surface du milieu à l´aide d´un étaleur stérile en verre ou en matière plastique, jusqu´à ce qu´il ne reste plus de liquide visible à la surface du milieu, en essayant de ne pas toucher les côtés de la boite de Petri.

**8.3. Comptage des colonies**

* Après la période d’incubation spécifiée, procéder, à l’aide de l’appareil de comptage, au comptage des colonies si nécessaire. Examiner chaque boîte en lumière tamisée. Il est important d'inclure dans le comptage les colonies en tête d'épingle. Mais il est essentiel que l'opérateur évite de confondre les particules non dissoutes ou précipitées avec des colonies en tête d'épingle. Examiner avec attention les éléments douteux, en utilisant un fort grossissement si nécessaire, afin de distinguer les colonies des particules étrangères.
* Les colonies envahissantes doivent être comptées comme une seule colonie. Si moins d'un quart de la boîte est envahi par de telles colonies, compter les colonies de la partie de la boîte non envahie et calculer le nombre de colonies correspondant à la boîte entière. Si plus d'un quart de la boîte est envahi, ne pas tenir compte de la boîte.

**9. Expression des résultats**

**9.1 Mode de calcul «**ISO 7218:1996 »

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 minimum 15 colonies.

Calculer le nombre N de microorganismes présents dans l´échantillon pour essai, en tant que moyenne pondérée à partir de deux dilutions successives, à l´aide de la formule:

∑ C

N = -------------------------

V (n1 + 0.1 n2) d

Où :

- ∑ C : est la somme des colonies comptées sur toutes les boîtes retenues de deux dilutions successives et dont au moins une contient 15 colonies;

- V : est le volume de l´inoculum appliqué à chaque boîte, en millilitres;

- n1 : est le nombre des boîtes retenues à la première dilution;

- n2 : est le nombre des boîtes retenues à la seconde dilution;

- d : est le taux de dilution correspondant à la première dilution retenue.

Arrondir les résultats calculés à deux chiffres significatifs. Pour cela, si le dernier chiffre est inférieur à 5, le chiffre précédant n´est pas modifié; si le dernier chiffre est supérieur ou égal à 5, le chiffre précédant est augmenté d´une unité. Procéder de proche en proche jusqu´à ce que l´on ait deux chiffres significatifs.

Retenir comme résultat le nombre de microorganismes par millilitre (produits liquides) ou par gramme (autres produits), exprimé par un nombre compris entre 1,0 et 9,9 multiplié par la puissance appropriée de 10.

Exemple :



N = 19182 : En arrondissant le résultat tel que prescrit ci-dessus, le résultat est 19 000 ou 1,9 x 104 microorganismes par gramme de produit.

**9.2. Interprétation des résultats**

Arrêté interministériel du 2 Moharram 1438 correspondant au 4 octobre 2016 fixant les critères microbiologiques des denrées alimentaires