**Microbiologie des aliments — Méthode horizontale pour le dénombrement des coliformes — Méthode par comptage des colonies**

**1. Domaine d'application**

La présente Norme internationale donne des directives générales pour le dénombrement des coliformes. La présente Norme internationale s'applique à des produits destinés à la consommation humaine et à l'alimentation des animaux, et à des échantillons environnementaux au voisinage de la production et de la manipulation des aliments, par comptage des colonies après incubation à 30 °C ou 37 °C en milieu solide.

NOTE : Cette température faisant l'objet d'un accord entre les parties concernées. Dans le cas du lait et des produits laitiers, la température d'incubation est 30°C. Cette méthode est recommandée lorsque le nombre attendu est supposé être supérieur à 100 par millilitre ou par gramme d'échantillon testé.

**2. Termes et définitions**

Pour les besoins du présent document, les termes et définitions suivants s'appliquent.

**2.1. Coliformes**

Bactéries qui, à la température spécifiée (c'est-à-dire 30 °C ou 37 °C, selon accord), forment des colonies caractéristiques en gélose lactosée biliée au cristal violet et au rouge neutre et qui, lors de l'essai de confirmation, fermentent le lactose avec production de gaz, lorsque l'essai est effectué dans les conditions spécifiées dans la présente Norme internationale.

**3. Principe**

* Préparation de deux boîtes de Petri, en utilisant un milieu de culture sélectif solide et une quantité spécifiée de l'échantillon pour essai si le produit initial est liquide ou une quantité spécifiée de suspension mère dans le cas d'autres produits.
* Préparation d'autres boîtes de Petri, dans les mêmes conditions, en utilisant des dilutions décimales de l'échantillon pour essai ou de la suspension mère.
* Incubation des boîtes à 30 ◦C ou 37 ◦C (selon accord) pendant 24 h.
* Comptage des colonies caractéristiques et, si nécessaire, confirmation du nombre de colonies par fermentation du lactose.
* Calcul du nombre de coliformes par millilitre ou par gramme d'échantillon à partir du nombre de colonies caractéristiques dénombrées par boîte de Petri (voir l'ISO 7218).

**4. Milieux de culture et diluants**

**4.1. Diluants**

**4.2. Milieu sélectif solide**: gélose lactosée biliée au cristal violet et au rouge neutre (VRBL).

4.2.1. Composition : digestat enzymatique de tissus animaux (7 g), extrait de levure (3 g), lactose (C12H22O11, H2O) (10 g), chlorure de sodium (5 g), sels biliaires (1,5 g), Rouge neutre (0,03 g), cristal violet (0,002 g), agar-agar (12 g à 18 g), eau (1 000 ml).

4.2.2. Préparation :

* Procéder comme suit pour conserver au milieu son pouvoir sélectif et sa spécificité.
* Mélanger soigneusement les composants ou le milieu complet déshydraté dans l'eau et laisser reposer plusieurs minutes. Ajuster le pH de sorte qu'après ébullition, il soit de 7,4 ± 0,2 à 25 ◦C. Chauffer jusqu’à ébullition en agitant de temps en temps.
* Laisser bouillir 2 min. Mettre le milieu à refroidir immédiatement au bain d'eau de 44 ◦C à 47 ◦C.
* Éviter la surchauffe du milieu, un chauffage trop prolongé ou des chauffages répétés. En conséquence, ne pas stériliser à l'autoclave et contrôler la stérilité du milieu au moment de l'emploi.
* Utiliser le milieu dans les 4 h qui suivent sa préparation.

**4.3. Milieu de confirmation:** bouillon lactosé bilié au vert brillant.

4.3.1 Composition : digestat enzymatique de caséine (10 g), lactose (C12H22O11,H2O) (10 g), bile de bœuf déshydratée (20 g), vert brillant (0,013 3 g), eau (1 000 ml).

4.3.2. Préparation :

* Dissoudre les composants du milieu complet déshydraté dans l'eau en chauffant doucement si nécessaire dans un bain d'eau. Si nécessaire, ajuster le pH de sorte qu'après stérilisation, il soit 7,2 ± 0,2 à 25 ◦C.
* Répartir les milieux par quantités de 10 ml dans des tubes à essai contenant des cloches de Durham. Stériliser à l'autoclave à 121 ◦C pendant 15 min. Les cloches de Durham ne doivent pas contenir de bulles d'air après stérilisation.

**5. Appareillage et verrerie**

* Appareil pour la stérilisation en chaleur sèche (four) ou en chaleur humide (autoclave). Voir l'ISO 7218.
* Étuve, réglable à 30 ◦C ± 1 ◦C ou 37 ◦C ± 1 ◦C.
* Boîtes de Petri, en verre ou en plastique d'un diamètre de 90 mm à 100 mm.
* Pipettes à écoulement total, ayant une capacité nominale de 1 ml.
* Bain d'eau, ou dispositif similaire, capable de fonctionner de 44 ◦C à 47 ◦C ou à 100 ◦C.
* Appareil de comptage de colonies, comportant un système d'éclairage et un compteur numérique mécanique ou électronique.
* Tubes à essai, d'approximativement 16 mm × 160 mm.
* Cloches de Durham, de dimensions appropriées en vue de leur utilisation dans les tubes à essai.
* Flacons, pour porter à ébullition et conserver les milieux de culture.
* pH-mètre, précis à 0,1 unité de pH à 25 ◦C.
* Anse bouclée, en platine iridiée ou en nickel chrome ayant un diamètre d’environ 3 mm ou anses à usage unique.

**6. Échantillonnage**

Il est recommandé que l'échantillonnage soit effectué conformément à la Norme internationale spécifique du produit concerné. En l'absence de Norme internationale spécifique, il est recommandé que les parties concernées se mettent d'accord à ce sujet.

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

Préparer l'échantillon pour essai conformément à l'ISO 6887 (partie appropriée), à l'ISO 8261 et à la Norme internationale spécifique du produit concerné. En l'absence de Norme internationale spécifique, il est recommandé que les parties concernées se mettent d'accord à ce sujet.

**8. Mode opératoire**

**8.1 Prise d'essai, suspension mère et dilutions**

**8.2 Ensemencement et incubation**

* Prendre deux boîtes de Petri stériles pour le produit liquide et/ou pour chaque dilution choisie. Transférer 1 ml à l'aide d'une pipette stérile de liquide ou les dilutions appropriées au centre de chaque boîte. Utiliser une nouvelle pipette stérile pour inoculer chaque dilution dans les boîtes.
* Verser environ 15 ml du milieu VRBL, de 44 ◦C à 47 ◦C, dans chaque boîte de Petri. 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 le milieu est versé dans les boîtes ne doit pas dépasser 15 min. Mélanger soigneusement l'inoculum au milieu de culture et laisser le mélange se solidifier en posant les boîtes de Petri sur une surface fraîche et horizontale. Préparer également une boîte témoin avec environ 15 ml du milieu pour contrôler sa stérilité.
* Après solidification complète, couler à la surface du milieu ensemencé environ 4 ml du milieu VRBL, de 44 ◦C à 47 ◦C. Laisser solidifier comme décrit ci-dessus.
* Retourner les boîtes ainsi préparées et les incuber dans l'étuve réglée 30 ◦C à 37 ◦C ou (selon accord) pendant 24 h ± 2 h.

**8.3 Dénombrement**

Après la période d'incubation spécifiée, sélectionner les boîtes de Petri ayant, si possible, 10 ou plus de 10 et moins de 150 colonies. Procéder au comptage à l'aide du compteur des colonies violacées ayant un diamètre minimal de 0.5 mm (parfois entourées d'une zone rougeâtre due à la précipitation de sels biliaires). Ces colonies sont considérées comme des colonies typiques de coliformes et ne nécessitent pas de confirmation.

Dénombrer également et confirmer les colonies atypiques (par exemple celles de taille plus petite) et toutes les colonies dérivées des produits laitiers contenant des sucres autres que le lactose immédiatement après la période d’incubation. La conversion des sucres autres que le lactose peut entraîner la formation de colonies, ayant une apparence similaire aux colonies typiques de coliformes.

NOTE : L'aspect de la zone rougeâtre dû à la précipitation de bile entourant les colonies est fonction du type de coliformes et de la qualité du milieu.

**8.4 Confirmation**

Si nécessaire, inoculer cinq colonies atypiques dans des tubes de bouillon lactosé bilié au vert brillant.

Mettre les tubes à incuber dans l'étuve réglée à ou (selon accord des parties) pendant 24 h ± 2 h. Considérer les colonies présentant une formation de gaz dans les cloches de Durham comme des coliformes. Tenir compte des résultats dans le calcul.

**8.5. Expression des résultats**

Voir l'ISO 7218.

**8.6. Interprétation des résultats**

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

**Remarques :**

* La présence simultanée de cristal violet et de sels biliaires assure l’inhibition de la plupart des bactéries n’appartenant pas à la famille des entérobactéries.
* Les colonies sont violacées à cause de la fermentation du lactose qui se traduit par une acidification, révélée par le virage au rouge de l’indicateur pH (rouge neutre).
* Les colonies sont entourées d’un halo rougeâtre à cause de la précipitation de sels biliaires par les coliformes.
* Les entérobactéries lactose négatif (*Salmonella , Shigella , Proteus* ) et *Pseudomonas* donnent des colonies incolores.
* Les coliformes totaux représentent un groupe d'espèces de plusieurs genres, à savoir *Escherichia, Enterobacter, Klebsiella, Citrobacter* et probablement *Aeromonas* et *Serrati*a.
* Les coliformes thermo-tolérants (fécaux) groupe comprend principalement *E.Coli*, avec quelques espèces de *Klebsiella* et *Enterobacter* spp. Les coliformes non pathogènes sont éliminés en utilisant une température d'incubation élevée (44,5 ± 0,2 ou 45 ± 0,2 °C).