



***LES METHODES  
D'ENSEMENCEMENT ET  
DE DENOMBREMENT EN  
MICROBIOLOGIE  
ALIMENTAIRE***



YOUCEFI. Fatma

## **I. Dénombrement**

### **I.1. Généralités**

Lors du contrôle de la qualité microbiologique et/ou de la sécurité microbiologique des aliments pour la consommation humaine et des aliments pour animaux, il n'est pas suffisant de connaître quels sont les micro-organismes présents. Dans la plupart des cas, la quantité dans laquelle ils sont présents est également un facteur important, d'où la nécessité de les dénombrer. Pour ce faire, il existe plusieurs manières de procéder: par exemple par examen direct (microscopie), en ensemençant des milieux solides ou liquides, par cytométrie en flux, par PCR en temps réel, etc.

Le dénombrement sur milieux solides se base sur la capacité qu'ont de nombreux micro-organismes à produire des colonies dans ou sur des milieux gélosés pouvant être détectées à l'œil nu ou à l'aide d'une simple loupe.

Si la matrice contient un niveau élevé de particules interférentes, il convient tout d'abord de séparer ces dernières par sédimentation ou à l'aide de sacs-filtres.

Si l'on s'attend à ce que le niveau de bactéries soit très faible (moins de 10 colonies dans ou sur une boîte à la dilution la plus faible), il est recommandé de procéder au dénombrement à l'aide de milieux liquides (par exemple NPP) pour améliorer la fiabilité statistique des résultats. La concentration par filtration, immunoséparation ou centrifugation peut être également utilisée.

### **I.2. Dénombrement sur milieu solide**

#### **I.2.1. Généralités**

Il est recommandé d'étiqueter les boîtes de Petri avec le numéro d'échantillon, la dilution, la date et toute autre information utile.

Il est recommandé de sélectionner les dilutions pour garantir que les boîtes contenant le nombre approprié de colonies sont obtenues et pour remédier aux éventuelles propriétés inhibitrices.

Pour le transfert de chaque dilution, utiliser une pipette stérile différente, à moins de procéder par ordre décroissant.

#### **I.2.2. Nombre de boîtes de Petri par dilution**

Pour les méthodes de dénombrement en microbiologie des aliments, une boîte par dilution doit être utilisée si au moins deux dilutions successives sont utilisées. Deux boîtes par dilution peuvent également être utilisées pour améliorer la fiabilité.

Si une seule dilution est utilisée, alors deux boîtes pour cette dilution doivent être utilisées pour améliorer la fiabilité des résultats.

#### **I.2.3. Techniques de dénombrement en profondeur**

Prélever les volumes définis de la dilution à examiner, en touchant l'embout de la pipette avec la paroi du tube afin d'ôter les surplus de liquide adhérant à l'extérieur de cet embout. Soulever suffisamment le couvercle de la boîte de Petri stérile pour y insérer la pipette, puis délivrer le contenu.

Après avoir ôté du bain d'eau thermostaté le milieu gélosé refroidi, sécher le flacon avec un chiffon propre afin d'éviter que l'eau ne contamine les boîtes. En versant, éviter de répandre le milieu à l'extérieur du récipient ou dans le couvercle de la boîte. Pour éviter la contamination des milieux, tenir le flacon en position quasi horizontale. Éviter également de poser le flacon entre les étapes du

coulage.

Verser le milieu gélosé fondu à une température comprise entre 44 °C et 47 °C dans chaque boîte de Petri (généralement, de 18 ml à 20 ml de gélose dans des boîtes de Petri de 90 mm, et de 45 ml à 50 ml dans des boîtes de Petri de 140 mm, afin d'obtenir au moins 3 mm d'épaisseur) dans les 15 min de l'ensemencement (pour éviter l'agrégation des colonies). Éviter de verser le milieu directement sur l'inoculum. Mélanger immédiatement et soigneusement le milieu en surfusion et l'inoculum, de façon à obtenir une répartition homogène des micro-organismes dans le milieu, par exemple en déplaçant doucement la boîte d'avant en arrière, d'un côté à l'autre et dans un sens circulaire. Laisser refroidir et 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). ( Figure 1)

Lorsque, dans le produit à examiner, la présence de micro-organismes donnant des colonies envahissantes est suspectée (par exemple *Proteus* spp.), couler sur les boîtes solidifiées une seconde couche de gélose non nutritive ou identique à celle du milieu de culture utilisé dans l'essai (généralement 5 ml de gélose dans des boîtes de Petri de 90 mm), afin de limiter voire d'inhiber l'envahissement par ces micro-organismes.

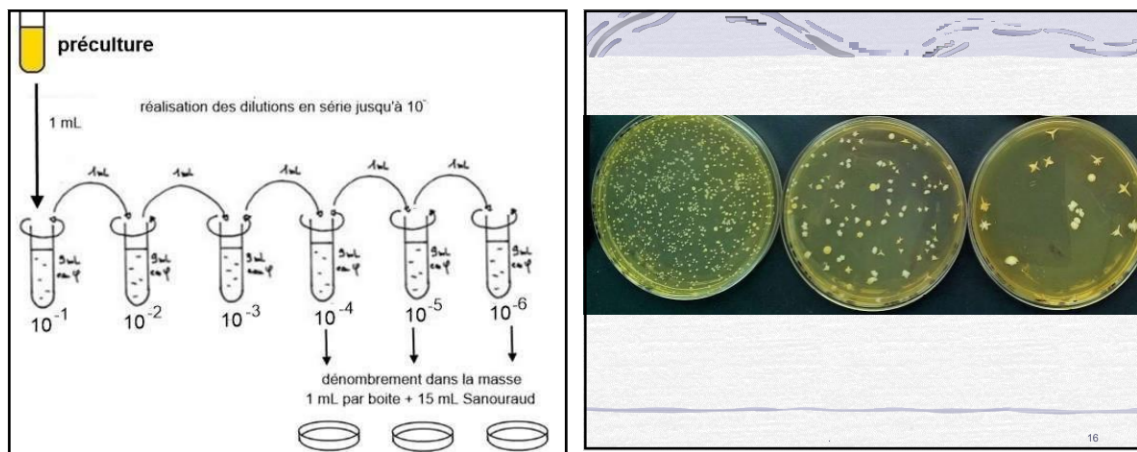


Fig 1 : isolement en profondeur

### I.3. Ensemencement en surface

#### I.3.1. Généralités

Les méthodes d'ensemencement conçues pour produire uniquement des colonies en surface dans les boîtes gélosées présentent certains avantages par rapport à la méthode dans la masse. La morphologie des colonies en surface est facile à observer, ce qui augmente la capacité de l'analyste à distinguer les différents types de colonies.

Les micro-organismes n'étant pas exposés à la chaleur du milieu gélosé en surfusion, il est donc possible d'obtenir des résultats de dénombrement plus importants.

Utiliser des boîtes précoulées, contenant un milieu gélosé d'au moins 3 mm d'épaisseur, de niveau constant, ne contenant aucune bulle d'air ni humidité en surface.

Afin de favoriser une répartition uniforme, il est recommandé de sécher la surface de la gélose solidifiée pour que l'inoculum soit absorbé en 15 min

### I.3.2. Étalement/méthode à l'étaleur

À l'aide d'une pipette stérile, transférer l'inoculum (habituellement 0,1 ml ou 0,5 ml) de l'échantillon liquide pour essai, ou de la suspension mère s'il s'agit d'autres échantillons, dans la boîte gélosée (respectivement d'un diamètre de 90 mm ou de 140 mm). Répéter cette étape pour la dilution décimale suivante (les colonies à dénombrer seront alors présentes à l'étape  $10^{-1}$  s'il s'agit d'un échantillon liquide et  $10^{-2}$  s'il s'agit d'un autre échantillon) puis, le cas échéant, répéter l'opération pour des dilutions décimales supplémentaires.

La limite de dénombrement peut être diminuée d'un facteur de 10 en ensemençant 1,0 ml de l'échantillon pour essai s'il s'agit de liquide, ou 1,0 ml de la suspension mère pour les autres produits, sur la surface d'une

grande boîte de gélose (140 mm) ou sur la surface de trois petites boîtes de gélose (90 mm). Dans chaque cas, si une seule dilution est utilisée, doubler les boîtes pour cette dilution en utilisant deux grandes boîtes ou six petites boîtes.

À l'aide d'un étaleur en verre, en plastique ou en acier (composé, par exemple, d'une tige en verre en forme de crosse de hockey, d'un diamètre d'environ 3,5 mm et longue d'environ 20 cm, coudée à environ 3 cm de l'extrémité et aplatie aux extrémités par chauffage), répartir uniformément l'inoculum aussi rapidement que possible sur la surface gélosée, sans toucher les parois de la boîte de Petri. Laisser sécher les boîtes, avec les couvercles en place, pendant environ 15 min à température ambiante.(figure 2)



Fig 2 : ensemencement méthode à l'étaleur

## I.4. Méthodes spirales

### I.4.1. Généralités

La méthode spirale pour la détermination du niveau de micro-organismes a été soumise à des essais interlaboratoires sur du lait, des produits laitiers et d'autres produits alimentaires.

### I.4.2. Préparation de la boîte gélosée

Pour la préparation des boîtes gélosées, il est recommandé d'utiliser un répartiteur automatique avec un système de distribution stérile afin de garantir que les boîtes ont une épaisseur régulière, ne contiennent aucune bulle d'air et sont stériles.

Verser la même quantité de gélose dans toutes les boîtes, de sorte que la même hauteur de gélose soit présentée à la pointe du stylet de l'ensemencement spiral, afin de maintenir l'angle de contact.

Sécher les boîtes avant utilisation et s'assurer qu'aucune gouttelette d'eau n'est visible à la surface du milieu.

### I.4.3. Mode opératoire d'ensemencement et comptage

Décontaminer la pointe du stylet et le tuyau flexible en faisant passer une solution d'hypochlorite de sodium (voir 5.24.4) puis de l'eau stérile dans le système avant de faire passer l'échantillon liquide dans le stylet. Sinon, remplacer la micro-seringue à usage unique dans l'appareil qui en utilise.

Placer une boîte de Petri précoulée sur le plateau tournant et abaisser le stylet. L'échantillon est déposé de façon différentielle lorsque la pointe du stylet parcourt la surface de la boîte gélosée en rotation. Ôter la boîte ensemencée et déplacer le stylet à sa position de départ. Décontaminer le stylet ou remplacer la micro-seringue et le/la remplir pour l'ensemencement d'une autre boîte.

Laisser sécher les boîtes, avec les couvercles en place, pendant environ 15 min à température ambiante, puis incubé

Après incubation, centrer la grille de comptage de l'ensemencement spiral. Utiliser la règle de comptage de 20 pour déterminer le nombre de colonies. Choisir un secteur et commencer le comptage des colonies depuis le bord extérieur du premier segment vers le centre, jusqu'à ce que 20 colonies aient été comptées. Continuer par le comptage des colonies restantes dans le segment qui contient la vingtième colonie. Compter une zone correspondante du côté opposé de la boîte et diviser le nombre de colonies comptées des deux côtés par le volume d'échantillon déposé dans ces deux zones. Les volumes d'échantillon associés à chaque portion de la grille de comptage sont indiqués dans le manuel d'utilisation fourni avec chaque ensemencement spiral. (figure 3)

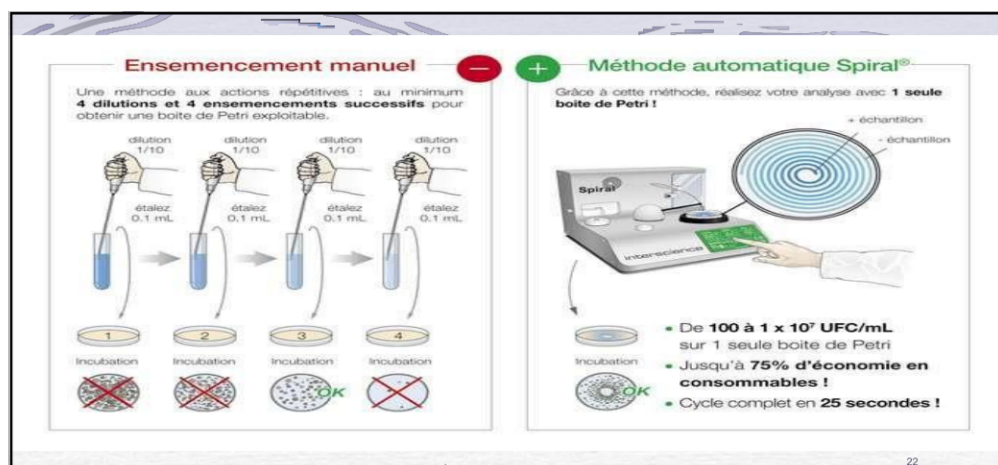


Fig 3 : ensemencement méthode spirale

#### **I.4.4. Incubation**

Sauf spécification contraire dans les normes spécifiques, retourner les boîtes après leur ensemencement et les placer rapidement dans l'étuve réglée à la température appropriée. Si une déshydratation excessive se produit (par exemple à 55 °C ou dans le cas d'une forte circulation d'air), envelopper les boîtes, sans les serrer, dans des sacs en matière plastique, avant l'incubation, ou utiliser tout système similaire d'efficacité équivalente.

Pendant la période d'incubation, de légères variations de température sont inévitables et tolérées, par exemple au moment de charger ou de décharger l'étuve, mais il est important que ces périodes soient réduites le plus possible. Il est recommandé de contrôler la durée de ces variations pour s'assurer qu'elles n'ont pas d'effet significatif sur le résultat.

Il peut être utile parfois, pour le fonctionnement du laboratoire, de réfrigérer les boîtes ensemencées avant l'incubation pendant une durée maximale de 24 h. Dans ce cas, le laboratoire doit s'assurer que cette pratique est sans incidence sur le nombre de colonies obtenues.

Généralement, il est recommandé que les piles ne dépassent pas six boîtes de Petri pour l'incubation en aérobiose et qu'elles soient séparées l'une de l'autre et des parois de l'incubateur par une distance d'au moins 25 mm. Toutefois, des piles plus hautes et moins espacées peuvent être tolérées pour les étuves équipées de systèmes de circulation de l'air; dans ce cas, il est recommandé de s'assurer de l'homogénéité de la répartition de la température.

Après incubation, il est normalement recommandé d'examiner les boîtes immédiatement. Elles peuvent cependant être conservées, sauf spécification contraire dans les normes spécifiques, jusqu'à 48 h au réfrigérateur. La conservation en réfrigérateur peut être tolérée uniquement s'il a été démontré que cela n'a aucune incidence sur le dénombrement, l'apparence ou la confirmation ultérieure des colonies. Pour certains milieux contenant des indicateurs colorés, il est recommandé de laisser les boîtes réfrigérées s'équilibrer à température ambiante avant leur examen, pour s'assurer de la récupération correcte de la couleur.

## **II. Calcul et expression des résultats sur milieu solide**

### **II.1. Comptage des colonies**

Après la période d'incubation mentionnée dans la norme spécifique, procéder au comptage des colonies (colonies en totalité, colonies caractéristiques ou colonies caractéristiques présumées) pour chaque boîte contenant jusqu'à et y compris 300 colonies (ou tout autre nombre indiqué dans la norme spécifique).

Dans le cas du comptage des colonies caractéristiques ou caractéristiques présumées, la description des colonies doit être celle indiquée dans la norme spécifique.

Dans certains cas, les colonies peuvent être difficiles à compter (par exemple en présence de micro-organismes envahissants). Considérer les colonies envahissantes comme des colonies uniques. Si moins d'un quart de la boîte est envahi, compter les colonies sur la partie non affectée de la boîte et calculer par extrapolation le nombre théorique de colonies correspondant à la boîte entière. Si plus d'un quart de la boîte est envahi, ne pas procéder au comptage. Considérer une chaîne de colonies comme une unité formant colonie.

**NOTE** Il peut être utile, dans certains cas, de prévoir des boîtes ensemencées supplémentaires, qui sont conservées à  $(3 \pm 2)$  °C pour les comparer, lors du comptage, avec les boîtes ensemencées incubées, afin de ne pas confondre les particules du produit examiné avec les colonies. Pour pouvoir faire la différence entre les particules du produit et les colonies, une loupe binoculaire peut également être utilisée.

Les différents modes de calcul doivent tenir compte des boîtes ne contenant aucune colonie, lorsque celles-ci ont été retenues, car elles sont significatives lors du calcul d'une moyenne pondérée.

## II.2. Expression des résultats

### II.2.1. Généralités

Dans le présent paragraphe, les cas traités correspondent aux cas généraux:

- ensemencement d'une boîte de Petri d'un diamètre de 90 mm par dilution et au moins deux dilutions successives sont réalisées;
- nombre maximal dénombrable pour la totalité des colonies présentes: 300 par boîte;
- nombre maximal de l'ensemble des colonies (caractéristiques et non caractéristiques) présentes dans une boîte dans le cas de comptage de colonies caractéristiques ou caractéristiques présumées: de préférence 300 par boîte;
- nombre maximal dénombrable pour les colonies caractéristiques ou caractéristiques présumées: 150 par boîte;
- nombre de colonies caractéristiques présumées ensemencées pour identification ou confirmation à partir de chaque boîte retenue: en général 5.

Ces nombres sont définis dans les normes spécifiques. Pour les micro-organismes produisant de grandes colonies, le nombre maximal de colonies dans une boîte est spécifié dans la norme spécifique.

En cas d'utilisation de boîtes d'un diamètre autre que 90 mm, le nombre maximal de colonies doit être augmenté ou diminué proportionnellement à la surface des boîtes (ou des membranes).

#### **EXEMPLE**

- Pour les boîtes ensemencées dans la masse de 55 mm de diamètre, le nombre maximal de colonies dénombrables doit être 110 (équivalent à un nombre total de 300 ufc sur une boîte de Petri de 90 mm).
- Pour les boîtes de 140 mm de diamètre, le nombre maximal de colonies dénombrables doit être de 730 (équivalent à un nombre total de 300 ufc sur une boîte de Petri de 90 mm).

Les modes de calcul définis ci-après prennent en compte les cas apparaissant le plus fréquemment lorsque les essais sont réalisés conformément à la bonne pratique de laboratoire. De rares cas particuliers peuvent apparaître (par exemple un rapport très différent de celui du facteur de dilution entre les boîtes de deux dilutions successives); il est alors nécessaire que les résultats de comptage obtenus soient examinés, interprétés ou éventuellement rejetés par un microbiologiste qualifié.

#### **II.2.2. Mode de calcul: cas général (comptage des colonies en totalité ou des colonies caractéristiques)**

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 moins 10 colonies [colonies en totalité, colonies caractéristiques ou colonies répondant aux critères d'identification

Calculer le nombre  $N$  de micro-organismes présents dans l'échantillon pour essai, en tant que moyenne pondérée à partir de deux dilutions successives, à l'aide de la Formule (1):

$$N = \frac{\sum C}{V \times 1,1 \times d} \quad (1)$$

où

$\sum C$  est la somme des colonies comptées sur les 2 boîtes retenues de deux dilutions successives et dont au moins une contient au moins 10 colonies;

$V$  est le volume de l'inoculum appliqué à chaque boîte, en millilitres;

$d$  est la dilution correspondant à la première dilution retenue [ $d = 1$  pour un produit liquide non dilué (échantillon pour essai)].

Si plus d'une dilution est utilisée, on s'attend à ce que le rapport entre le comptage des colonies de la dilution  $d_2$  et le comptage des colonies de la dilution  $d_1$  soit égal à 10 %. Il convient que les limites supérieure et inférieure soient spécifiées par le laboratoire pour le comptage des colonies de la dilution  $d_2$ . Ces limites peuvent être celles proposées dans l'ISO 14461-2<sup>[42]</sup>, par exemple. Lorsque ces limites ne sont pas suivies, il convient d'interpréter les résultats avec précaution.

**EXEMPLE** Si le comptage des colonies de la dilution  $d_1$  est de 250, il convient que le comptage des colonies de la dilution  $d_2$  ne soit pas inférieur à 13 (5,2 %) et pas supérieur à 39 (15,6 %). Voir l'ISO 14461-2<sup>[42]</sup>.

Arrondir le résultat calculé à deux chiffres significatifs. Pour cela, si le troisième chiffre est inférieur à 5, ne pas modifier le chiffre précédent; si le troisième chiffre est supérieur ou égal à 5, augmenter le chiffre précédent d'une unité.

Exprimer le résultat comme, de préférence, un nombre compris entre 1,0 et 9,9 multiplié par la puissance appropriée de 10, ou un nombre entier avec deux chiffres significatifs.

Exprimer le résultat comme le nombre  $N$  de micro-organismes par millilitre (produits liquides) ou par gramme (autres produits).

**EXEMPLE** Un comptage a donné les résultats suivants:

- à la première dilution retenue ( $10^{-2}$ ): 168 colonies;
- à la deuxième dilution retenue ( $10^{-3}$ ): 14 colonies.

$$N = \frac{\sum C}{V \times 1,1 \times d} = \frac{168 + 14}{1 \times 1,1 \times 10^{-2}} = \frac{182}{0,011} = 16\,545$$

En arrondissant le résultat tel que spécifié ci-dessus, le nombre de micro-organismes est de 17 000 ou  $1,7 \times 10^4$  par millilitre ou par gramme de produit.

### II.2.3. Mode de calcul: cas après identification (/confirmation)

Lorsque la méthode utilisée nécessite une identification (/confirmation), un nombre déterminé  $A$  (en général 5) de colonies caractéristiques présumées est identifié (/confirmé) à partir de chacune des boîtes retenues pour le comptage des colonies. Après identification (/confirmation), calculer, pour chacune des boîtes, le nombre  $a$  de colonies répondant aux critères d'identification (/confirmation), à l'aide de Formule (2):

$$a = \frac{b}{A} \times C \tag{2}$$

où

$b$  est le nombre de colonies répondant aux critères d'identification (/ de confirmation) parmi les  $A$  colonies identifiées;

$C$  est le nombre total de colonies caractéristiques présumées comptées sur la boîte.

Arrondir les résultats calculés au nombre entier le plus proche. Pour cela, si le premier chiffre après la virgule est inférieur à 5, le chiffre précédent n'est pas modifié; si le premier chiffre après la virgule est supérieur ou égal à 5, le chiffre précédent est augmenté d'une unité.

Calculer le nombre  $N$ ,  $N_E$  ou  $N'$  de micro-organismes identifiés ou confirmés présents dans l'échantillon pour essai, en remplaçant  $\sum C$  par  $\sum a$  dans la formule indiquée ou en remplaçant  $C$  par  $a$  dans les formules. Arrondir les résultats.



**EXEMPLE** Un comptage a donné les résultats suivants:

- à la première dilution retenue ( $10^{-3}$ ): 66 colonies;
- à la deuxième dilution retenue ( $10^{-4}$ ): 4 colonies.

Des colonies sélectionnées ont été soumises aux essais d'identification (*l* de confirmation):

- des 66 colonies, 8 colonies ont été soumises à essai, dont 6 ont répondu aux critères; d'où  $a = 50$ ;
- des 4 colonies, les 4 ont toutes répondu aux critères; d'où  $a = 4$ .

$$N = \frac{\sum a}{V \times 1,1 \times d} = \frac{50 + 4}{1 \times 1,1 \times 10^{-3}} = \frac{54}{1,1 \times 10^{-3}} = 49\,090$$

En arrondissant le résultat tel que spécifié en 10.3.2.2, le nombre de micro-organismes est de 49 000 ou  $4,9 \times 10^4$  par millilitre ou par gramme de produit.

## II.2.4. Mode de calcul: estimation des petits nombres

### Cas d'une boîte (échantillon pour essai ou suspension mère ou première dilution) contenant moins de 10 colonies

Les comptages compris entre 10 et la limite supérieure de chaque méthode correspondent à l'étendue de fidélité optimale. La fidélité diminue rapidement lorsque le nombre de colonies diminue au-dessous de 10. Toutefois, selon la finalité de l'essai, une limite inférieure de détermination peut être définie comme ci-dessous pour un nombre inférieur à 10.

Conformément à l'ISO/TR 13843<sup>[40]</sup>, la définition de la limite de détermination est: «concentration de particules moyenne la plus faible  $x$  par prise analytique, lorsque l'incertitude type relative prévue est égale à une valeur spécifiée ». Le coefficient de variation,  $C_V$ , est calculé en divisant l'estimation de l'écart-type  $s$  d'une population, obtenue à partir d'un échantillon de cette population, par la moyenne  $\bar{x}$  de cet échantillon. Par conséquent,  $C_V = s / \bar{x}$ .

Dans le cas d'une distribution de Poisson,  $x$  est calculé à l'aide de la Formule (3):

$$x = \frac{1}{C_V^2} \tag{3}$$

Si un  $C_V$  de 50 % est défini comme étant la limite acceptable de fidélité relative (ce qui paraît être raisonnable en microbiologie), la limite inférieure de détermination sera le nombre de colonies donné par:

$$x = \frac{1}{0,50^2} = 4$$

Ainsi, il est recommandé de traiter les résultats fondés sur les comptages inférieurs à quatre comme une simple détection de la présence de micro-organismes.

En résumé:

Si la boîte contient moins de 10 colonies, mais au moins 4, calculer le résultat à l'aide de la formule:

$$N_E = \frac{C}{V \times d}$$

et l'exprimer comme le nombre estimé  $N_E$  de micro-organismes par millilitre (produits liquides) ou par gramme (autres produits).

NOTE L'expression «nombre estimé» signifie une estimation moins précise de la valeur vraie.

Si le total est compris entre 3 et 1, la fidélité des résultats est si faible que l'on doit exprimer le résultat comme suit:

«Le micro-organisme est présent, mais avec moins de  $4/Vd$  par gramme ou par ml».

### **II.2.5. Cas d'une boîte (échantillon pour essai ou suspension mère ou première dilution) ne contenant aucune colonie**

Si la boîte contenant l'échantillon pour essai (produits liquides), ou la suspension mère (autres produits) ou la première dilutionensemencée ou retenue, ne contient aucune colonie, reporter le résultat comme suit:

«moins de  $1/Vd$  micro-organismes par millilitre» (produits liquides) ou

«moins de  $1/Vd$  micro-organismes par gramme» (autres produits)

où

$d$  est le taux de dilution de la suspension mère ou de la première dilutionensemencée ou retenue [ $d = 10^0 = 1$  pour un produit liquide non dilué (échantillon pour essai)];

$V$  est le volume de l'inoculum appliqué à chaque boîte, en millilitres.

#### **Cas particuliers**

##### **Généralités**

Ces cas concernent le comptage des colonies caractéristiques ou caractéristiques présumées à confirmer.

##### **Cas 1**

Si le nombre de colonies caractéristiques ou non caractéristiques dans la boîte contenant une première dilution  $d_1$  est supérieur à 300 (ou tout autre nombre indiqué dans la norme spécifique), avec des colonies caractéristiques visibles ou des colonies identifiées/confirmées et si la boîte contenant la dilution suivante  $d_2$  contient moins de 300 colonies (ou tout autre nombre indiqué dans la norme spécifique), et aucune colonie caractéristique ou identifiée/confirmée n'est visible, reporter le résultat comme suit:

«moins de  $1/V_2d_2$  et plus de  $1/V_1d_1$  micro-organismes par millilitre» (produits liquides) ou

«moins de  $1/V_2d_2$  et plus de  $1/V_1d_1$  micro-organismes par gramme» (autres produits)

où

$d_1$  et  $d_2$  sont les taux de dilution correspondant aux dilutions  $d_1$  et  $d_2$ ;

$V_1$  est le volume de l'inoculum utilisé dans la boîte de la première dilution  $d_1$ , en millilitres;

$V_2$  est le volume de l'inoculum utilisé dans la boîte de la dilution ultérieure  $d_2$ , en millilitres.

**EXEMPLE** Un comptage a donné les résultats suivants:

— à la première dilution retenue ( $10^{-2}$ ): plus de 300 colonies sur la boîte, avec des colonies caractéristiques ou identifiées/confirmées présentes;

— à la deuxième dilution retenue ( $10^{-3}$ ): 33 colonies, sans colonie caractéristique ou identifiée/confirmée présente.

Le résultat, exprimé en micro-organismes, est moins de 1 000 et plus de 100 par millilitre ou par gramme de produit.

## Cas 2

Si le nombre de colonies caractéristiques ou non caractéristiques dans la boîte contenant une première dilution  $d_1$  est supérieur à 300 (ou tout autre nombre indiqué dans la norme spécifique), ne comprenant aucune colonie caractéristique visible ou identifiée/confirmée et si la boîte contenant la dilution suivante  $d_2$  contient jusqu'à et y compris 300 colonies (ou tout autre nombre indiqué dans la norme spécifique), et aucune colonie caractéristique ou identifiée/confirmée n'est visible, reporter le résultat comme suit:

«moins de  $1/V_2d_2$  micro-organismes par millilitre» (produits liquides); ou

«moins de  $1/V_2d_2$  micro-organismes par gramme» (autres produits)

où

$d_2$  est le taux de dilution correspondant à la dilution  $d_2$ ;

$V_2$  est le volume de l'inoculum utilisé dans la boîte de la dilution ultérieure  $d_2$ , en millilitres;

**EXEMPLE** Un comptage a donné les résultats suivants:

- à la première dilution retenue ( $10^{-2}$ ): plus de 300 colonies sur la boîte, sans colonie caractéristique ou identifiées/confirmées présentes;
- à la deuxième dilution retenue ( $10^{-3}$ ): 33 colonies, sans colonie caractéristique ou identifiée/confirmée présente;

Le résultat, exprimé en micro-organismes, est inférieur à 1 000 par millilitre ou par gramme de produit.

### II.2.6. Mode de calcul: cas particuliers

Si le nombre de colonies comptées (colonies en totalité, colonies caractéristiques ou colonies caractéristiques présumées) est supérieur au nombre maximal comptable (300 ou tout autre nombre indiqué dans la norme spécifique) pour la boîte contenant la première dilution  $d_1$ , avec un nombre de colonies (colonies en totalité, colonies caractéristiques ou répondant à des critères d'identification) inférieur à 10 (limite de l'estimation des petits nombres) pour la boîte contenant la dilution suivante  $d_2$ , exprimer les résultats comme suit:

- a) Si le nombre de colonies pour la boîte contenant la dilution  $d_1$  est compris dans l'intervalle [nombre maximal comptable + 1, limite supérieure de l'intervalle de confiance du nombre maximal comptable] (par exemple 301-334) et que le comptage des colonies de la dilution  $d_2$  est au moins égal à la limite inférieure spécifiée, utiliser la méthode de calcul pour les cas généraux

**EXEMPLE 1** Un comptage (dans le cas d'un nombre maximal fixé à 300 pour le comptage des colonies) a donné les résultats suivants:

- à la première dilution retenue ( $10^{-2}$ ): 310 colonies (comptage inférieur à 334, limite supérieure de l'intervalle de confiance pour 300);
- à la deuxième dilution retenue ( $10^{-3}$ ): 8 colonies. La limite inférieure pour le comptage des colonies à la dilution ( $10^{-3}$ ) est de 18 colonies, obtenue à partir des 310 colonies de la dilution ( $10^{-2}$ ).

Le résultat de ce comptage de colonies n'est pas acceptable.

**EXEMPLE 2** Un comptage (dans le cas d'un nombre maximal fixé à 150 pour le comptage des colonies) a donné les résultats suivants:

- à la première dilution retenue ( $10^{-2}$ ): 160 colonies (comptage inférieur à 174, limite supérieure de l'intervalle de confiance pour 150);
- à la deuxième dilution retenue ( $10^{-3}$ ): 8 colonies. La limite inférieure pour le comptage des colonies à la dilution ( $10^{-3}$ ) est de 7 colonies, obtenue à partir des 160 colonies de la dilution  $10^{-2}$ .

Utiliser le mode de calcul pour les cas généraux (10.3.2.2) à partir des boîtes contenant les deux dilutions retenues.

- b) Si le nombre de colonies pour la boîte de la dilution  $d_1$  est supérieur à la limite supérieure de l'intervalle de confiance du nombre maximal comptable (par exemple 334) et que le comptage des colonies de la dilution  $d_2$  est au moins égal à la limite inférieure spécifiée et calculée à partir de la limite supérieure de l'intervalle de confiance du nombre maximal comptable, ne retenir que le résultat du comptage de la dilution  $d_2$  puis calculer un nombre estimé.

**EXEMPLE 1** Un comptage (dans le cas d'un nombre maximal fixé à 300 pour le comptage des colonies) a donné les résultats suivants:

- à la première dilution retenue ( $10^{-2}$ ): plus de 334 colonies dans la boîte;
- à la deuxième dilution retenue ( $10^{-3}$ ): 9 colonies. La limite inférieure pour le comptage des colonies à la dilution ( $10^{-3}$ ) est de 20 colonies, obtenue à partir des 334 colonies de la dilution  $10^{-2}$ .

Le résultat de ce comptage de colonies n'est pas acceptable.

**EXEMPLE 2** Un comptage (dans le cas d'un nombre maximal fixé à 150 pour le comptage des colonies) a donné les résultats suivants:

- à la première dilution retenue ( $10^{-2}$ ): plus de 174 colonies dans la boîte;
- à la deuxième dilution retenue ( $10^{-3}$ ): 9 colonies. La limite inférieure pour le comptage des colonies à la dilution ( $10^{-3}$ ) est de 8 colonies, obtenue à partir des 174 colonies de la dilution  $10^{-2}$ .

Établir un nombre estimé sur la base des colonies comptées dans la boîte de la dilution  $10^{-3}$

**EXEMPLE 3** Un comptage (dans le cas d'un nombre maximal fixé à 150 pour le comptage des colonies) a donné les résultats suivants:

- à la première dilution retenue ( $10^{-2}$ ): plus de 174 colonies dans la boîte;
- à la deuxième dilution retenue ( $10^{-3}$ ): 5 colonies. La limite inférieure pour le comptage des colonies à la dilution ( $10^{-3}$ ) est de 8 colonies, obtenue à partir des 174 colonies de la dilution  $10^{-2}$ .

Le résultat de ce comptage n'est pas acceptable.

Lorsque le comptage des colonies (colonies en totalité, caractéristiques ou caractéristiques présumées) de chacune des boîtes pour toutes les dilutionsensemencées donne un nombre supérieur à 300 (ou tout autre nombre indiqué dans la norme spécifique), reporter le résultat comme suit:

«plus de  $300/Vd$ » (cas de colonies en totalité ou caractéristiques); ou

«plus de  $(300/Vd) \times (b/A)$ » (cas de colonies confirmées), exprimé en micro-organismes par millilitre (produits liquides) ou en micro-organismes par gramme (autres produits)

où

$d$  est la dilution correspondant à la dernière dilutionensemencée;

$V$  est le volume de l'inoculum appliqué à chaque boîte, en millilitres;

$b$  est le nombre de colonies répondant aux critères d'identification parmi les  $A$  coloniesensemencées.

Lorsque seule la boîte de la dernière dilutionensemencée peut être comptée et contient plus de 10 et moins de 300 (ou tout autre nombre indiqué dans la norme spécifique) colonies (colonies en totalité, caractéristiques ou caractéristiques présumées), calculer le nombre  $N'$  de micro-organismes présents en utilisant la Formule (4):

$$N' = \frac{c}{Vd} \tag{4}$$

où

$c$  est le nombre de colonies comptées dans la boîte;

$V$  est le volume de l'inoculum appliqué à chaque boîte, en millilitres;

$d$  est la dilution correspondant à la dilution retenue.

Arrondir les résultats

Exprimer le résultat comme le nombre  $N'$  de micro-organismes par millilitre (produits liquides) ou par gramme (autres produits).

EXEMPLE Un comptage a donné les résultats suivants:

— à la dernière dilutionensemencée ( $10^{-4}$ ): 120 colonies.

$$\text{Par conséquent } N' = \frac{120}{1 \times 10^{-4}} = 1200\ 000$$

En arrondissant le résultat tel que spécifié en 10.3.2.2, le nombre  $N'$  de micro-organismes est de 1 200 000 ou  $1,2 \times 10^6$  par millilitre ou par gramme de produit.

### **III. Dénombrement des levures et moisissures**

#### **III.1. Généralités**

Il est recommandé généralement de toujours dénombrer les levures et moisissures soit par la technique dans la masse, qui permet un dénombrement plus aisé, soit par la technique d'ensemencement en surface, avec laquelle les cellules sont soumises à une exposition optimale à l'oxygène atmosphérique et qui évite le stress thermique de la gélose en surfusion. Il est recommandé de sécher les boîtes gélosées précoulées avant de les ensemercer (voir l'ISO 11133).

Certaines levures et moisissures peuvent être pathogènes ou peuvent provoquer des réactions allergiques, parfois même chez des personnes en bonne santé. C'est pourquoi, il est important d'être raisonnablement prudent en travaillant avec les champignons. Idéalement, il est recommandé de conserver les boîtes dans une étuve, et non dans une pièce ouverte. Il est recommandé d'ouvrir les boîtes le moins possible, normalement uniquement dans un objectif critique tel que la préparation d'une lame pour un examen au microscope. Il est recommandé de refroidir les aiguilles traitées à la flamme avant d'effectuer des repiquages, afin d'éviter la dispersion de conidies et d'autres cellules. Il est recommandé de désinfecter les plans de travail et les étuves régulièrement.

Étant donné que tout mouvement peut entraîner un relargage de conidies ou de spores de moisissures pouvant provoquer le développement de colonies satellites susceptibles de fausser les résultats en donnant une surestimation de la population, il est recommandé d'incuber les boîtes de Petri en position non retournées et stables, jusqu'à ce qu'elles soient prêtes pour le comptage.

#### **III.2. Comptage des colonies pour les levures et moisissures**

Les boîtes contenant de 10 à 150 colonies sont généralement comptées. Si la mycoflore est essentiellement composée de moisissures, sélectionner des boîtes parmi celles contenant la population la plus faible; si elle est essentiellement composée de levures, il est possible de sélectionner des boîtes atteignant la limite supérieure pour le comptage.

S'il existe un doute sur l'identité des colonies, examiner les états frais ou les colorations des cellules d'au moins 5 colonies par échantillon afin de confirmer l'absence de bactéries.

##### **II.2.1. Dénombrement en milieu liquide**

###### **a- Principe**

Les prises d'essai sont ensemencées dans un milieu liquide, conçu pour favoriser la croissance d'un micro-organisme ou d'un groupe particulier de micro-organismes, et, le plus souvent, pour inhiber la prolifération d'autres types de micro-organismes.

Pour déterminer s'il y a eu croissance des micro-organismes recherchés, il existe différents critères, tels que l'apparition de turbidité, la production de gaz, les changements de couleur, et l'isolement des micro-organismes sur un milieu de culture gélosé sélectif avec une atmosphère et une température d'incubation déterminées. La composition des milieux de culture et les critères permettant de distinguer un résultat positif d'un résultat négatif sont définis dans les normes afférentes.

En utilisant cette approche, seule une valeur qualitative peut être attribuée à chaque prise d'essai, c'est-à-dire un résultat positif ou négatif. Pour obtenir une estimation de la quantité de micro-organismes présente, il est nécessaire d'examiner les diverses prises d'essai, la suspension mère et les différentes dilutions et d'utiliser des procédures statistiques pour déterminer le nombre le plus probable (NPP).

Si le NPP est utilisé pour l'analyse des échantillons solides (y compris les poudres), une seule prise d'essai doit être prélevée pour préparer la suspension mère. À partir de cette suspension mère, il est recommandé d'utiliser des aliquotes pour les examens.

## b- Ensemencement

### - Généralités

Si un milieu de culture sélectif est utilisé, il est recommandé que l'ajout de la prise d'essai ne réduise pas ses propriétés sélectives (ce qui permettrait la croissance de micro-organismes autres que les micro-organismes recherchés). Dans la plupart des normes, la compatibilité d'une matrice spécifique avec le milieu liquide est décrite dans le domaine d'application. Il est recommandé cependant de prendre des précautions pour certaines matrices telles que les épices, le cacao, le bouillon, etc., car elles contiennent des substances inhibant la croissance, nécessitant l'ajout de composés neutralisants, l'application de taux de dilution plus importants, une centrifugation, une filtration ou une séparation immunomagnétique pour séparer les micro-organismes cibles de la matrice, même si ce n'est pas toujours spécifié dans les normes correspondantes. L'incompatibilité peut également être due à la composition biologique de la matrice: les échantillons environnementaux fortement contaminés, les produits fermentés ou les produits contenant des bactéries probiotiques représentent manifestement un défi plus important pour la microbiologie analytique que pour les échantillons qui ne contiennent qu'un petit nombre de micro-organismes. Pour ces matrices qui posent problème, il est recommandé d'effectuer des expériences de contamination artificielle avec des micro-organismes représentatifs, pour valider que la méthode est bien compatible avec la matrice.

### - Mode opératoire

Sauf indication contraire dans les normes correspondantes, des volumes de prise d'essai inférieurs ou égaux à 1 ml sont normalement ajoutés à cinq à dix fois le volume du milieu à concentration simple. Les prises d'essai comprises entre 1 ml et 100 ml sont normalement ajoutées à un volume égal de milieu double concentration.

Pour les volumes supérieurs à 100 ml, un milieu plus concentré peut être utilisé. Pour des besoins spécifiques, les milieux déshydratés stériles peuvent être dissous dans l'échantillon froid (ou préchauffé à 30 °C) pour l'analyse.

Sauf spécification contraire, il est recommandé que le laps de temps entre la préparation de la suspension mère d'un échantillon et l'ensemencement du dernier tube, des microplaques ou du flacon, soit inférieur à 30 min.(Figure 4)

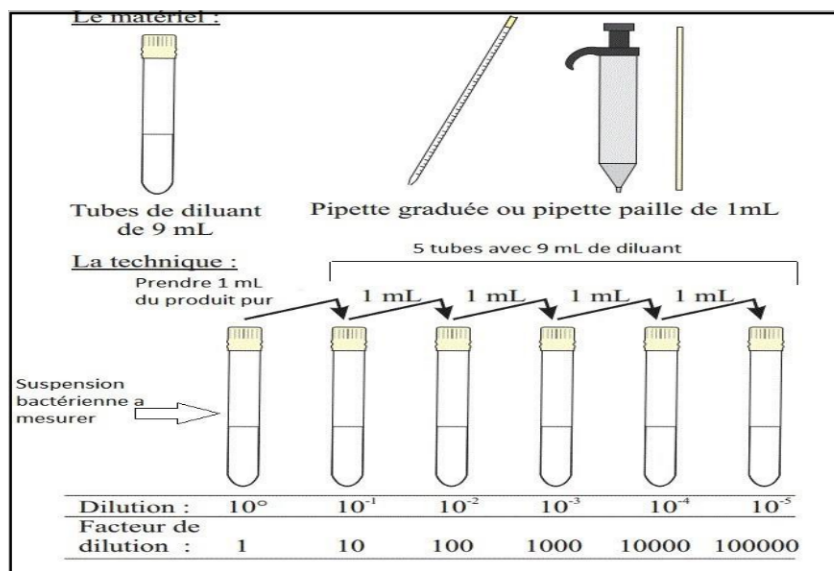


Fig 4 : Dénombrement en milieu liquide

### c- Choix du système d'ensemencement

Le principe de la méthode NPP est la dilution d'un échantillon à un niveau tel que les inoculats contiennent, la plupart du temps mais pas toujours, des micro-organismes cibles viables. Le «résultat», c'est-à-dire le nombre d'inoculats produisant une croissance à chaque dilution, permettra une estimation de la concentration initiale des bactéries dans l'échantillon. Afin d'obtenir des estimations sur une large gamme de concentrations possibles, les microbiologistes utilisent des dilutions en série en incubant plusieurs tubes (ou boîte, etc.) à chaque dilution. Le NPP de micro-organismes présents dans l'échantillon initial, ainsi que la fidélité de l'estimation, peuvent être calculés par des procédures statistiques, sur la base des nombres de tubes positifs et négatifs observés après incubation.

Choisir parmi les différentes configurations de NPP disponibles, selon

- le nombre escompté de micro-organismes dans l'échantillon examiné;
- les exigences réglementaires;
- la fidélité requise; et
- toute autre considération pratique.

L'incertitude de mesure dépend du nombre de prises d'essai positives observées dans des conditions similaires, tout comme l'incertitude de mesure d'un dénombrement de colonies dépend du nombre de colonies sur une boîte. L'incertitude de mesure varie en fonction de la racine carrée du nombre de tubes utilisés, car la fidélité augmente avec l'augmentation du nombre de répétition des essais; mais il est nécessaire de multiplier le nombre de tubes par quatre pour diviser par deux l'incertitude de mesure. L'incertitude de mesure relative est élevée lorsque les systèmes ne comportent qu'un petit nombre de tubes par dilution.



En fonction de leur taille, les prises d'essai peuvent êtreensemencées dans des tubes ou des flacons contenant la quantité requise de milieu liquide. Pour les prises d'essai de petite taille, des microplaques peuvent également être utilisées.

#### **d- Système de dilution simple**

Lorsque la concentration prévue en micro-organismes est faible ou peu variable, le système d'ensemencement le plus approprié est une seule série de prises d'essai égales. Lorsque le rapport attendu entre le nombre maximal et minimal de micro-organismes est inférieur à environ 25, il est prévu au moins dix prises d'essai parallèles pour fournir des informations utiles; avec 50 tubes en parallèle, le rapport est limité à 200. Si la concentration réelle est proche de l'extrême des valeurs NPP possibles, alors la chance que tous les tubes montrent une croissance ou une absence de croissance est probablement trop élevée. Des exemples de dilution unique des NPP

#### **e- système de dilution multiple**

Lorsque la concentration des micro-organismes dans l'échantillon est inconnue ou présumée très variable, il peut être nécessaire d'ensemencer des séries de tubes à partir de différentes dilutions. Ensemencer un nombre suffisant de dilutions afin de garantir un système obtenant des résultats positifs et négatifs. Le nombre de dilutions à utiliser dépend également de la méthode de calcul utilisée pour estimer la valeur NPP. S'il est nécessaire d'utiliser les tables NPP, alors les configurations des systèmes sont limitées à celles disponibles dans les tables. Si des programmes informatiques sont utilisés, le nombre de dilutions et de tubes parallèles n'est pas limité, ce qui est important pour l'utilisation de nouveaux kits commerciaux d'analyse utilisant le NPP.

#### **f- Système de dilution symétrique**

Le système NPP symétrique le plus fréquemment appliqué utilise trois ou cinq tubes parallèles par dilution. La fidélité de ce système avec un petit nombre de tubes par dilution est très faible. Les résultats à partir d'un système à trois tubes donnent à peine plus qu'un ordre de grandeur de la concentration. Pour une plus grande fidélité, il est recommandé de choisir cinq tubes parallèles ou plus.

#### **g- Système de dilution asymétrique**

Les systèmes de dilution asymétrique ont différents nombres de tubes à différents niveaux de dilution et il convient de ne les utiliser que pour estimer le nombre de micro-organismes présents dans une gamme bien définie (voir par exemple l'ISO 8199). Un tube peut parfois être perdu ou brisé, ce qui conduit à un système asymétrique. Toutefois, certains kits commerciaux d'essai sont basés sur des systèmes asymétriques. Il est recommandé d'évaluer les données issues de ces systèmes à l'aide d'un logiciel informatique approprié

#### **h- Incubation**

Incuber les tubes, flacons ou bouteillesensemencés dans une étuve ou un bain d'eau. Les microplaques sont placées dans une étuve.

Choisir la durée et la température d'incubation après s'être référé à une méthode normalisée spécifique, puisque ces paramètres sont fonction du micro-organisme ou du groupe de micro-organismes recherché.

Certains micro-organismes peuvent nécessiter une procédure d'incubation en deux étapes et/ou une étape de confirmation. Pour des informations détaillées, consulter les normes spécifiques, mais noter que cela peut ajouter un degré de complication supplémentaire à la déduction des valeurs NPP.

### **II.2.3. Interprétation des résultats**

Les critères permettant de distinguer les résultats positifs des résultats négatifs varient en fonction de chaque micro-organisme ou groupe de micro-organismes et sont définis dans les normes correspondantes. En utilisant ces critères, compter et enregistrer le nombre de résultats positifs obtenus avec toutes les prises d'essai provenant de l'échantillon.

### II.3. Détermination des valeurs NPP

Il existe trois méthodes différentes de détermination de la valeur NPP: le calcul avec des formules mathématiques, la consultation des tables NPP ou l'utilisation de programmes informatiques spécifiques. Étant donné que ces méthodes sont basées sur des considérations statistiques identiques, elles ont une validité équivalente. Ces trois méthodes sont détaillées ci-dessous.

#### II.3.1. Formules mathématiques

##### a. Formule approximative pour tous les cas

Les valeurs NPP approximatives ( $M$ ) pour tout nombre de dilutions et de tubes parallèles peuvent être dérivées de l'application de la Formule (5):

$$M / g = \frac{Z_p}{\sqrt{m_s m_t}} \quad (5)$$

où

$Z_p$  est le nombre de tubes positifs;

$m_s$  est la masse totale, en grammes, de l'échantillon dans tous les tubes présentant une réaction négative;

$m_t$  est la masse totale, en grammes, de l'échantillon dans tous les tubes.

#### EXEMPLE

À supposer que l'on soumet à essai 10 prises d'essai de chacune 0,1 g, 0,01 g et 0,001 g et que l'on trouve 10, 4 et 2 résultats positifs, alors pour les réponses fractionnaires uniquement (c'est-à-dire 4 et 2,) le nombre total de tubes positifs est  $Z_p = 6$ . La masse totale soumise à essai est  $m_t = 10 \times 0,01 + 10 \times 0,001 = 0,11$  g; et la masse totale dans les tubes négatifs est  $m_s = 6 \times 0,01 + 8 \times 0,001 = 0,068$ .

$$M / g = \frac{6}{\sqrt{0,068 \times 0,11}} = \frac{6}{\sqrt{0,0075}} = \frac{6}{0,0865} = 69,4$$

Ce résultat est comparable à la valeur tabulée pour 10 – 4 – 2, qui correspond à un NPP par gramme de 70.

##### b. Solution «exacte» pour une série de tubes

La valeur NPP ( $M$ ) d'une seule série de tubes est dérivée de la Formule (6):

$$M / g = - \frac{1}{m} \ln \left[ \frac{S}{N} \right] \quad (6)$$

où

$m$  est la masse, en grammes, de l'échantillon dans chaque tube de la série;

$\ln$  est le logarithme népérien;

$N$  est le nombre de tubes de la série;

$S$  est le nombre de tubes présentant une réaction négative.

