

NORME  
INTERNATIONALE

ISO  
4831

Deuxième édition  
1991-03-01

---

---

**Microbiologie — Directives générales pour le  
dénombrement des coliformes — Technique du  
nombre le plus probable**

iTeh STANDARD PREVIEW

*Microbiology — General guidance for the enumeration of coliforms —  
Most probable number technique*

ISO 4831:1991

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/a8f8dbcc-e4b0-42e2-ba1d-206aab4c8637/iso-4831-1991>



Numéro de référence  
ISO 4831:1991(F)

## Avant-propos

L'ISO (Organisation internationale de normalisation) est une fédération mondiale d'organismes nationaux de normalisation (comités membres de l'ISO). L'élaboration des Normes internationales est en général confiée aux comités techniques de l'ISO. Chaque comité membre intéressé par une étude a le droit de faire partie du comité technique créé à cet effet. Les organisations internationales, gouvernementales et non gouvernementales, en liaison avec l'ISO participent également aux travaux. L'ISO collabore étroitement avec la Commission électrotechnique internationale (CEI) en ce qui concerne la normalisation électrotechnique.

Les projets de Normes internationales adoptés par les comités techniques sont soumis aux comités membres pour vote. Leur publication comme Normes internationales requiert l'approbation de 75 % au moins des comités membres votants.

La Norme internationale ISO 4831 a été élaborée par le comité technique ISO/TC 34, *Produits agricoles alimentaires*.

Cette deuxième édition annule et remplace la première édition (ISO 4831:1978), dont elle constitue une révision technique.

Les annexes A et B font partie intégrante de la présente Norme internationale.

© ISO 1991

Droits de reproduction réservés. Aucune partie de cette publication ne peut être reproduite ni utilisée sous quelque forme que ce soit et par aucun procédé, électronique ou mécanique, y compris la photocopie et les microfilms, sans l'accord écrit de l'éditeur.

Organisation internationale de normalisation  
Case Postale 56 • CH-1211 Genève 20 • Suisse

Imprimé en Suisse

## Introduction

**0.1** La présente Norme internationale se propose de fournir des directives générales pour l'examen de produits non concernés par les Normes internationales existant actuellement, et pour l'étude par les organismes élaborant des méthodes d'essais microbiologiques destinées à être appliquées à des produits alimentaires ou à des aliments pour animaux. En raison de la grande diversité des produits entrant dans ce domaine d'application, il est possible que ces directives, dans tous leurs détails, ne conviennent pas exactement à certains produits et que, pour certains autres produits, il puisse être nécessaire d'employer des méthodes différentes. Néanmoins, il est à espérer que, dans tous les cas, tous les efforts seront faits pour appliquer, chaque fois qu'il sera possible, les directives données, et qu'on n'aura recours à des dérogations que si cela est absolument nécessaire pour des raisons techniques.

Lorsque la présente Norme internationale sera réexaminée, il sera tenu compte de tous les renseignements disponibles à ce moment-là, à savoir dans quelle mesure les directives auront été suivies et les raisons pour lesquelles il aura été nécessaire d'y déroger dans le cas de produits particuliers.

L'harmonisation des méthodes d'essai ne peut pas être immédiate et, pour certains groupes de produits, des Normes internationales et/ou des normes nationales existent peut-être. Dans le cas où des Normes internationales existent déjà pour le produit à contrôler, elles devront être appliquées, mais il serait souhaitable que, lorsqu'elles viendront en révision, elles soient alignées sur la présente Norme internationale, si bien que finalement les seules divergences restantes seront celles qui sont nécessaires pour des raisons techniques bien établies.

**0.2** La technique décrite dans la présente Norme internationale est moins précise que celle décrite dans l'ISO 4832:1990, *Microbiologie — Directives générales pour le dénombrement des coliformes — Méthode par comptage des colonies*, mais elle permet d'effectuer un examen microbiologique sur une prise d'essai plus importante et, par conséquent, de détecter un plus petit nombre de coliformes par gramme ou par millilitre de produit. D'autre part, la définition des «coliformes» adoptée dans les deux documents étant différente, on ne dénombre pas nécessairement les mêmes micro-organismes.

Pour chaque produit particulier, le choix de la technique sera précisé dans la Norme internationale concernant ce produit.

**0.3** Pour les besoins d'une méthode d'essai efficace, la définition des «coliformes», donnée dans l'article 3 et servant de base à la technique, n'est pas nécessairement identique aux définitions correspondantes données dans d'autres textes publiés. Une certaine proportion de souches des micro-organismes désignés sous le nom de «coliformes» (y

compris les *Escherichia coli*) dans d'autres textes publiés, ne produisent pas suffisamment de gaz pour pouvoir être décelées au moyen des cloches de Durham, (ce sont des souches anaérogènes). C'est pourquoi la technique décrite dans la présente Norme internationale ne détectera pas la totalité des souches des micro-organismes désignés, dans d'autres publications, sous le nom de «coliformes (présumés)» (par exemple, certaines souches de *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella*). (Voir Edwards, P.R. et Ewing, W.H. *Identification of Enterobacteriaceae*, 3ème édition, Burgess Publishing Company, Minneapolis, Minnesota, USA, 1972).

**iTeh STANDARD PREVIEW**  
**(standards.iteh.ai)**

[ISO 4831:1991](#)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/a8f8dbcc-e4b0-42e2-ba1d-206aab4c8637/iso-4831-1991>

# Microbiologie — Directives générales pour le dénombrement des coliformes — Technique du nombre le plus probable

## 1 Domaine d'application

La présente Norme internationale donne des directives générales pour le dénombrement des coliformes dans les produits destinés à la consommation humaine ou à l'alimentation animale, par calcul du nombre le plus probable (NPP) après incubation à 30 °C, 35 °C ou 37 °C en milieu liquide, cette température faisant l'objet d'un accord entre les parties concernées.

NOTE 1 La température d'incubation de 30 °C est retenue lorsque la finalité du dénombrement est technologique; la température de 35 °C ou 37 °C est retenue lorsque la finalité du dénombrement relève plutôt du domaine de la santé publique.

Des limites sont imposées aux possibilités d'application de la présente Norme internationale, du fait que cette méthode est sujette à de grandes variations. Il est recommandé d'appliquer cette méthode et d'interpréter les résultats à la lumière des renseignements donnés en 10.4.

## 2 Références normatives

Les normes suivantes contiennent des dispositions qui, par suite de la référence qui en est faite, constituent des dispositions valables pour la présente Norme internationale. Au moment de la publication, les éditions indiquées étaient en vigueur. Toute norme est sujette à révision et les parties prenantes des accords fondés sur la présente Norme internationale sont invitées à rechercher la possibilité d'appliquer les éditions les plus récentes des normes indiquées ci-après. Les membres de la CEI et de l'ISO possèdent le registre des Normes internationales en vigueur à un moment donné.

ISO 6579:1990, *Microbiologie — Directives générales concernant les méthodes de recherche des Salmonella*.

ISO 6887:1983, *Microbiologie — Directives générales pour la préparation des dilutions en vue de l'examen microbiologique*.

ISO 7218:1985, *Microbiologie — Directives générales pour les examens microbiologiques*.

## 3 Définition

Pour les besoins de la présente Norme internationale, la définition suivante s'applique.

**coliformes:** Bactéries qui, à la température spécifiée (c'est-à-dire 30 °C, 35 °C ou 37 °C, selon accord), provoquent la fermentation du lactose avec production de gaz, lorsque l'essai est effectué selon la méthode spécifiée dans la présente Norme internationale.

## 4 Principe

**4.1** Ensemencement de trois tubes de milieu d'enrichissement sélectif liquide double concentration [voir 5.3 a)] 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.

**4.2** Ensemencement de trois tubes de milieu d'enrichissement sélectif simple concentration [voir 5.3 b)] 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.

Puis, dans les mêmes conditions, ensemencement du milieu 5.3 b) avec les dilutions décimales obtenues à partir de l'échantillon pour essai ou de la suspension mère.

**4.3** Incubation à 30 °C, 35 °C ou 37 °C (selon accord) pendant 24 h pour les tubes de milieu double concentration [5.3 a)] et pendant 24 h ou 48 h pour les tubes de milieu simple concentration [5.3 b)] et examen de ces tubes.

**4.4** Repiquage, à partir des cultures des tubes de milieu 5.3 a) et des cultures provenant de la première série des tubes de milieu 5.3 b) opaques ou troubles ou ayant donné lieu à un dégagement gazeux, dans une série de tubes du milieu de confirmation (5.4).

**4.5** Incubation à 30 °C, 35 °C ou 37 °C (selon accord) pendant 24 h ou 48 h et examen de cette nouvelle série de tubes (4.4).

**4.6** A partir du nombre de tubes de cette nouvelle série (4.5) présentant une production de gaz, détermination du nombre le plus probable de coliformes par millilitre ou par gramme d'échantillon (c'est-à-dire le NPP), au moyen de la table NPP.

## 5 Milieux de culture et diluant

### 5.1 Généralités

Pour les pratiques courantes de laboratoire, voir l'ISO 7218.

### 5.2 Diluant

Voir l'ISO 6887 et la Norme internationale spécifique traitant du produit à examiner.

### 5.3 Bouillon à la tryptose et au lauryle sulfate (milieu d'enrichissement sélectif)

#### Composition

|  | a)                          | b)                          |
|--|-----------------------------|-----------------------------|
|  | Milieu double concentration | Milieu simple concentration |
| tryptose   | 40 g                        | 20 g                        |
| lactose  | 10 g                        | 5 g                         |
| hydrogénomonophosphate de potassium (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ) | 5,5 g                       | 2,75 g                      |
| dihydrogénophosphate de potassium (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )   | 5,5 g                       | 2,75 g                      |
| chlorure de sodium   | 10 g                        | 5 g                         |
| lauryl sulfate de sodium   | 0,2 g                       | 0,1 g                       |
| eau  | 1 000 ml                    | 1 000 ml                    |

#### Préparation

Dissoudre les composants ou le milieu complet déshydraté dans l'eau, en chauffant si nécessaire.

Ajuster le pH, si nécessaire, de sorte qu'après stérilisation, il soit de 6,8 à 25 °C.

Répartir les milieux, par quantités de 10 ml dans des tubes de 16 mm x 160 mm (6.4) contenant des cloches de Durham (6.5) dans le cas du milieu simple concentration, et dans des tubes de 20 mm x 200 mm (6.4) (sans cloches) dans le cas du milieu double concentration.

Stériliser à l'autoclave à 121 °C pendant 15 min.

Les cloches de Durham ne doivent pas contenir de bulles d'air après stérilisation.

### 5.4 Bouillon lactosé billé au vert brillant (milieu de confirmation)

#### Composition

|                             |           |
|-----------------------------|-----------|
| peptone                     | 10 g      |
| lactose                     | 10 g      |
| bile de boeuf déshydratée   | 20 g      |
| vert brillant <sup>1)</sup> | 0,013 3 g |
| eau                         | 1 000 ml  |

#### Préparation

Dissoudre les composants ou le milieu complet déshydraté dans l'eau en chauffant si nécessaire.

Ajuster le pH, si nécessaire, de sorte qu'après stérilisation, il soit de 7,2 à 25 °C.

Répartir les milieux, par quantités de 10 ml, dans des tubes à essais de 16 mm x 160 mm (6.4) contenant des cloches de Durham (6.5).

Stériliser à l'autoclave à 121 °C pendant 15 min.

Les cloches de Durham ne doivent pas contenir de bulles d'air après stérilisation.

**NOTE 2** Etant donné que le milieu complet déshydraté ne donne pas toujours les résultats attendus, il est nécessaire de contrôler ses propriétés avant utilisation.

## 6 Appareillage et verrerie

**NOTE 3** Le matériel à usage unique est acceptable au même titre que la verrerie réutilisable, si ses spécifications sont similaires.

Matériel courant de laboratoire de microbiologie, et notamment:

1) Répondant aux spécifications données dans l'ISO 6579:1981, annexe C.

## 6.1 Appareils pour la stérilisation en chaleur sèche (four) ou en chaleur humide (autoclave).

Voir l'ISO 7218.

**6.2 Étuve**, réglable à  $30\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ ,  $35\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$  ou  $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ .

**6.3 Anse bouclée**, en platine iridié ou en nickel-chrome, d'environ 3 mm de diamètre, ou **anses bouclées jetables**

**6.4 Tubes à essais**, de 16 mm × 160 mm et 20 mm × 200 mm, ou  **fioles** de capacité appropriée.

**6.5 Cloches de Durham**, de dimensions appropriées en vue de leur utilisation dans les tubes de 16 mm × 160 mm (6.4).

**6.6 Pipettes à écoulement total**, de 1 ml et 10 ml de capacité nominale.

**6.7 pH-mètre**, précis à  $\pm 0,1$  unité de pH à 25 °C.

## 7 Échantillonnage

L'échantillonnage doit avoir été effectué conformément à la Norme internationale spécifique du produit concerné. S'il n'existe pas de Norme internationale spécifique, il est recommandé que les parties concernées se mettent d'accord à ce sujet.

## 8 Préparation de l'échantillon pour essai

Préparer l'échantillon pour essai conformément à la Norme internationale spécifique du produit concerné. S'il n'existe pas de Norme internationale spécifique, il est recommandé que les parties concernées se mettent d'accord à ce sujet.

## 9 Mode opératoire (voir le schéma en annexe A)

Dans le cas de plusieurs échantillons examinés provenant d'un même lot, effectuer les opérations décrites ci-après pour chaque échantillon.

### 9.1 Prise d'essai, suspension mère et dilutions

Voir l'ISO 6887 et la Norme internationale spécifique du produit concerné.

Effectuer un nombre de dilutions suffisant, afin que tous les tubes de la dernière dilution soient négatifs.

### 9.2 Ensemencement<sup>2)</sup> et Incubation

**9.2.1** Prendre trois tubes de milieu d'enrichissement sélectif double concentration [5.3a)]. A l'aide d'une pipette stérile (6.6), transférer, dans chacun de ces tubes, 10 ml de l'échantillon pour essai s'il est liquide, ou 10 ml de la suspension mère dans le cas d'autres produits.

**9.2.2** Prendre ensuite trois tubes de milieu d'enrichissement sélectif simple concentration [5.3b)]. A l'aide d'une nouvelle pipette stérile (6.6), transférer, dans chacun de ces tubes, 1 ml de l'échantillon pour essai s'il est liquide, ou 1 ml de la suspension mère dans le cas d'autres produits.

**9.2.3** Pour chacune des dilutions suivantes (à partir de  $10^{-1}$  ou  $10^{-2}$ , selon l'échantillon pour essai), opérer comme en 9.2.2. Utiliser une nouvelle pipette stérile pour chaque dilution. Bien mélanger l'inoculum et le milieu.

**9.2.4** Incuber les tubes de milieu double concentration (9.2.1) à l'étuve (6.2) à 30 °C, 35 °C ou 37 °C (selon accord) pendant  $24\text{ h} \pm 2\text{ h}$ .

**9.2.5** Incuber les tubes de milieu simple concentration (9.2.2 et 9.2.3) à l'étuve (6.2) à 30 °C, 35 °C ou 37 °C (selon accord) pendant  $24\text{ h} \pm 2\text{ h}$ , ou si, à ce stade, on n'observe pas de formation de gaz ni de trouble empêchant d'apprécier un dégagement gazeux, pendant  $48\text{ h} \pm 2\text{ h}$ .

### 9.3 Confirmation

**9.3.1** A partir de chaque tube incubé selon 9.2.4, ensemencer avec une anse bouclée (6.3) un tube du milieu de confirmation (5.4). Incuber à 30 °C, 35 °C ou 37 °C (selon accord) pendant  $24\text{ h} \pm 2\text{ h}$ , ou si, à ce stade, on n'observe pas de dégagement de gaz, pendant  $48\text{ h} \pm 2\text{ h}$ .

**9.3.2** Opérer de même pour les tubes incubés selon 9.2.5 présentant un dégagement gazeux ou un trouble, dès que l'un de ces phénomènes est observé (c'est-à-dire après  $24\text{ h} \pm 2\text{ h}$  ou après  $48\text{ h} \pm 2\text{ h}$ ).

### 9.4 Interprétation

Pour chaque dilution, compter le nombre total de tubes où l'on note en 9.3 un dégagement gazeux (tubes positifs), après  $24\text{ h} \pm 2\text{ h}$  et, éventuellement, après  $48\text{ h} \pm 2\text{ h}$ .

2) On envisage ici la combinaison de trois tubes pour chaque série de dilution. Pour des produits particuliers et/ou chaque fois qu'une plus grande précision des résultats est demandée, il est nécessaire d'ensemencer des séries de cinq tubes (voir tableau B.2).

## 10 Expression des résultats

### 10.1 Choix des dilutions<sup>3)</sup>

Pour chaque échantillon examiné, retenir trois dilutions consécutives en se conformant à l'une des règles suivantes, selon le cas.

#### 10.1.1 Cas 1 — Au moins une dilution révèle trois tubes positifs

Choisir la dilution la plus élevée (c'est-à-dire celle ayant la plus faible concentration en échantillon) révélant trois tubes positifs, ainsi que les deux dilutions plus élevées suivant immédiatement (c'est-à-dire celles dont les concentrations en échantillon sont égales au 1/10 et au 1/100 de celle de la première dilution choisie) (voir exemple 1, tableau 1).

Voir également 10.1.3.

S'il a été préparé un nombre insuffisant de dilutions au-delà de la dilution la plus élevée révélant trois tubes positifs, choisir à la place les trois dilutions les plus élevées de la série (c'est-à-dire celles ayant la plus faible concentration en échantillon) (voir exemple 2, tableau 1).

#### 10.1.2 Cas 2 — Pas de dilutions révélant trois tubes positifs

Le cas 1 ne peut être appliqué. Choisir les trois dilutions les plus élevées de la série (c'est-à-dire celles ayant la plus faible concentration en échantillon)

qui contiennent au moins un réponse positive (voir exemple 3, tableau 1).

Voir également 10.1.3.

#### 10.1.3 Cas particuliers

Dans tous les cas où plus d'une des trois dilutions, selon 10.1.1 et 10.1.2, ne relève pas de tubes positifs (c'est-à-dire celle ayant la plus forte concentration en échantillon) et les deux plus faibles dilutions précédentes (c'est-à-dire celles dont les concentrations en échantillon sont égales à 10 et à 100 fois celle de la première solution choisie) (voir exemples 4 et 5, tableau 1), sauf lorsqu'on ne trouve des tubes positifs qu'au niveau de la première dilution préparée à partir de l'échantillon. Dans ce dernier cas, il est nécessaire de retenir les trois premières dilutions pour le calcul du NPP, même si cette série renferme deux dilutions ne révélant aucun tube positif.

Voir les exemples du tableau 1.

## 10.2 Détermination du coefficient NPP

10.2.1 Vérifier, selon le nombre d'échantillons examinés par lot, dans le tableau B.1 ou dans le tableau B.2, si les séquences de nombres de tubes positifs, correspondant aux dilutions sélectionnées selon 10.1, sont acceptables du point de vue statistique. Cette acceptabilité dépend à la fois du nombre d'échantillons analysés et de la décision d'accepter ou de refuser les résultats de la catégorie 2.

Tableau 1 — Exemples de choix de résultats positifs pour le calcul des valeurs de NPP

| Exemple | Nombre de tubes positifs obtenus à partir de trois tubes incubés pour les quantités suivantes d'échantillon inoculées par tube <sup>1)</sup> |              |                            |   |   | NPP <sup>2)</sup>                         |                                     |                                  |
|---------|--|--------------|----------------------------|---|---|---|-------------------------------------|----------------------------------|
|         | Produit liquide<br>Autre produit   | 10 ml<br>1 g | 1 ml<br>10 <sup>-1</sup> g | 10 <sup>-1</sup> ml<br>10 <sup>-2</sup> g | 10 <sup>-2</sup> ml<br>10 <sup>-3</sup> g | 10 <sup>-3</sup> ml<br>10 <sup>-4</sup> g | Produit liquide<br>ml <sup>-1</sup> | Autre produit<br>g <sup>-1</sup> |
| 1       |  | 3            | 3                          | 2   | 1   | 0   | 1,5 × 10 <sup>1</sup>               | 1,5 × 10 <sup>2</sup>            |
| 2       |  | 3            | 3                          | 3   | 0   |   | 2,4 × 10 <sup>1</sup>               | 2,4 × 10 <sup>2</sup>            |
| 3       |  | 2            | 2                          | 1   | 1   | 0   | 7,4                                 | 7,4 × 10 <sup>1</sup>            |
| 4       |  | 3            | 3                          | 0   | 0   | 0   | 2,4                                 | 2,4 × 10 <sup>1</sup>            |
| 5       |  | 2            | 2                          | 0   | 1   | 0   | 2,1 × 10 <sup>-1</sup>              | 2,1                              |

1) \_\_\_\_\_, combinaison choisie.

2) Calculé à partir du coefficient NPP pour trois tubes (tableau B.1).

3) Dans ce paragraphe, la suspension mère et, éventuellement, l'échantillon pour essai sont considérés comme étant des «dilutions».



Ainsi, par exemple, lorsque seulement les résultats de la catégorie 1 sont acceptés, la séquence 221 ne peut être retenue que si 10 échantillons (du lot considéré) ont été examinés. Par contre, lorsque les résultats moins probables de la catégorie 2 sont acceptés également, la séquence 221 sera retenue aussi dans le cas où seulement 2, 3 ou 5 échantillons ont été examinés. Si la séquence 221 est le résultat d'un essai unique, elle ne sera acceptable en aucune manière.

**10.2.2** Pour chaque séquence jugée acceptable selon 10.2.1, le coefficient NPP est obtenu au moyen du tableau B.1 et du tableau B.2.

### 10.3 Calcul du nombre le plus probable (NPP)

Le nombre de coliformes par millilitre ou par gramme est obtenu en multipliant le coefficient NPP (voir 10.2) par l'inverse du taux de la dilution la moins élevée (c'est-à-dire celle ayant la plus forte concentration en échantillon).

Dans le cas où la dilution retenue la moins élevée correspond aux tubes préparés à partir du milieu double concentration (ensemencement de 10 ml), diviser préalablement le coefficient NPP par 10.

Exprimer le résultat par un chiffre compris entre 1,0 et 9,9 multiplié par  $10^x$  où  $x$  est la puissance appropriée de 10.

### 10.4 Fidélité

Il est bien connu que des variations importantes peuvent être observées avec la technique du NPP. De ce fait, les résultats obtenus selon cette méthode doivent être utilisés avec prudence.

Les limites de confiance sont données dans les tableaux de l'annexe B.

#### EXEMPLE

Pour un échantillon solide, les limites de confiance avec une probabilité de 95 % sont comprises entre 13 et 200 coliformes par gramme, pour un NPP de  $7,4 \times 10^1$  coliformes par gramme et entre 4 et 99 coliformes par gramme, pour un NPP de  $2,4 \times 10^1$  coliformes par gramme.

### 11 Rapport d'essai

Le rapport d'essai doit indiquer la méthode utilisée, la température retenue selon la finalité de l'essai (technologique ou santé publique) et les résultats obtenus. Il doit, en outre, mentionner tous les détails opératoires non prévus dans la présente Norme internationale, ou facultatifs, ainsi que les incidents éventuels susceptibles d'avoir agi sur les résultats.

Le rapport d'essai doit donner tous les renseignements nécessaires à l'identification complète de l'échantillon.

ISO 4831:1991

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/a8f8dbcc-e4b0-42e2-ba1d-206aab4c8637/iso-4831-1991>