

TC 34

# NORME INTERNATIONALE 4832

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION • МЕЖДУНАРОДНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ ПО СТАНДАРТИЗАЦИИ • ORGANISATION INTERNATIONALE DE NORMALISATION

## Microbiologie — Directives générales pour le dénombrement des coliformes — Méthode par comptage des colonies obtenues à 30 °C

*Microbiology — General guidance for enumeration of coliforms — Colony count technique at 30 °C*

Première édition — 1978-02-01

CDU 663.1

Réf. no : ISO 4832-1978 (F)

**Descripteurs** : produit alimentaire, produit animal, analyse microbiologique, comptage, bactérie coliforme.

Prix basé sur 4 pages

## 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 confiée aux comités techniques de l'ISO. Chaque comité membre intéressé par une étude a le droit de faire partie du comité technique correspondant. Les organisations internationales, gouvernementales et non gouvernementales, en liaison avec l'ISO, participent également aux travaux.

Les projets de Normes internationales adoptés par les comités techniques sont soumis aux comités membres pour approbation, avant leur acceptation comme Normes internationales par le Conseil de l'ISO.

La Norme internationale ISO 4832 a été élaborée par le comité technique ISO/TC 34, *Produits agricoles alimentaires*, et a été soumise aux comités membres en juillet 1976.

Les comités membres des pays suivants l'ont approuvée :

|                         |          |                     |
|-------------------------|----------|---------------------|
| Afrique du Sud, Rép. d' | Ghana    | <del>Portugal</del> |
| Allemagne               | Hongrie  | Roumanie            |
| Australie               | Inde     | Royaume-Uni         |
| Autriche                | Iran     | Tchécoslovaquie     |
| Bulgarie                | Irlande  | Turquie             |
| Canada                  | Israël   | U.S.A.              |
| Chili                   | Mexique  | Yougoslavie         |
| Espagne                 | Pays-Bas |                     |
| France                  | Pologne  |                     |

Les comités membres des pays suivants l'ont désapprouvée pour des raisons techniques :

Nouvelle-Zélande  
Thaïlande

# Microbiologie — Directives générales pour le dénombrement des coliformes — Méthode par comptage des colonies obtenues à 30 °C

## 0 INTRODUCTION

0.1 La présente Norme internationale se propose de fournir des directives générales pour l'examen de produits non traités dans les Normes internationales existant actuellement et pour être étudiées par les organismes élaborant des méthodes d'essai 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 nationales et/ou des Normes internationales existent peut-être déjà, qui ne concordent pas avec ces directives. Au 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 modifiées de façon à se conformer à la présente Norme internationale si bien que, finalement, les seules divergences restantes seront celles qui auront été nécessaires pour des raisons techniques bien établies.

0.2 La technique décrite ci-après est plus précise que celle décrite dans l'ISO 4831, mais elle ne permet pas d'effectuer un examen microbiologique sur une prise d'essai aussi importante. Elle sera donc choisie de préférence lorsque les coliformes sont en grand nombre. D'autre part, la définition des coliformes étant différente, on ne dénombre pas nécessairement les mêmes micro-organismes par ces deux méthodes.

Pour les produits particuliers, le choix de la technique sera précisé dans les Normes internationales traitant des produits à examiner.

0.3 Pour les besoins d'une méthode d'essai efficace, la définition des «coliformes» donnée dans le chapitre 3 et servant de base au procédé n'est pas nécessairement identique aux définitions correspondantes données dans d'autres textes publiés. Ainsi, la méthode décrite dans la présente Norme internationale ne détectera qu'environ 90 % des souches de micro-organismes désignés, dans d'autres publications, sous le nom de «coliformes (présumés)» (*Citrobacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella*)<sup>1</sup>.

## 1 OBJET ET 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 comptage des colonies obtenues en milieu solide, après incubation à 30 °C.

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 norme et d'interpréter les résultats à la lumière des renseignements donnés en 10.2.

## 2 RÉFÉRENCES

ISO 2293, *Viandes et produits à base de viande — Dénombrement des germes aérobies à 30 °C (Méthode de référence)*.

ISO 3565, *Viandes et produits à base de viande — Recherche des salmonellae (Méthode de référence)*.

ISO 4831, *Microbiologie — Directives générales pour le dénombrement des coliformes — Technique du nombre le plus probable après incubation à 30 °C*.

ISO . . . , *Microbiologie — Directives générales pour la préparation des dilutions.*<sup>2)</sup>

1) Voir Edwards, P.R., et Erwing, W.H. (1972) : «*Identification of Enterobacteriaceae*», 3<sup>e</sup> édition, Burgess Publishing Company, Minneapolis, Minnesota, U.S.A.

2) En préparation.

### 3 DÉFINITION

Pour les besoins de la présente Norme internationale, la définition suivante est applicable :

**coliformes** : Bactéries qui, à 30 °C, forment des colonies caractéristiques en gélose lactosée biliée au cristal violet et au rouge neutre, dans les conditions opératoires décrites.

### 4 PRINCIPE

4.1 Ensemencement en profondeur d'un milieu sélectif solide, 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.

Dans les mêmes conditions, ensemencement des dilutions décimales obtenues à partir de l'échantillon pour essai ou de la suspension mère.

4.2 Incubation de ces boîtes à 30 °C durant 24 h.

4.3 Calcul du nombre de coliformes par millilitre ou par gramme d'échantillon, à partir du nombre de colonies caractéristiques obtenues dans des boîtes de Petri choisies aux niveaux de dilutions donnant un résultat significatif.

### 5 ÉCHANTILLONNAGE

Effectuer l'échantillonnage conformément à la Norme internationale du produit concerné.

### 6 APPAREILLAGE ET VERRERIE

Matériel courant de laboratoire de microbiologie, et notamment :

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

Le matériel en contact avec les milieux de culture, le diluant et l'échantillon, sauf s'il est livré stérile (particulièrement celui en plastique), doit être stérilisé

- soit au four en le maintenant à une température comprise entre 170 et 175 °C durant au moins 1 h,
- soit à l'autoclave en le maintenant à une température de 121 ± 1 °C durant au moins 20 min.

6.2 Étuve, réglable à 30 ± 1 °C.

6.3 Boîtes de Petri, en verre ou en plastique, diamètre de 90 à 100 mm.

6.4 Pipettes à écoulement total (pipettes à souffler), de capacité nominale 1 ml.

6.5 Bain d'eau, ou équipement similaire, réglable à 45 ± 0,5 °C.

6.6 Appareil de comptage de colonies, comportant un système d'éclairage avec fond noir, muni d'une loupe devant être utilisée à un grossissement de 1,5 et d'un compteur numérique mécanique ou électronique.

6.7 pH-mètre.

### 7 MILIEU DE CULTURE ET DILUANT

#### 7.1 Composants de base

Pour améliorer la reproductibilité des résultats, il est recommandé d'utiliser, pour la préparation du milieu de culture, des composants de base déshydratés ou un milieu complet déshydraté. Les prescriptions du fabricant doivent être suivies scrupuleusement.

Les produits chimiques utilisés doivent être de qualité analytique.

L'eau utilisée doit être de l'eau distillée ou déminéralisée, exempte de substances susceptibles d'inhiber la croissance des coliformes dans les conditions de l'essai.

#### 7.2 Diluant

Utiliser un diluant, tamponné ou non, à base de peptone et contenant du chlorure de sodium, par exemple diluant peptone-sel (voir 5.3 de l'ISO 2293) ou eau peptonée tamponnée (voir 6.2.1 de l'ISO 3565).

Si le diluant n'est pas utilisé extemporanément, il doit être conservé à l'obscurité entre 0 et + 5 °C durant 1 mois au maximum, dans des conditions évitant toute modification de sa composition.

#### 7.3 Milieu sélectif solide : violet, rouge neutre, bile, lactose (VRBL)

##### Composition

|                                      |                        |
|--------------------------------------|------------------------|
| peptone                              | 7 g                    |
| extrait de levure                    | 3 g                    |
| lactose                              | 10 g                   |
| chlorure de sodium                   | 5 g                    |
| sels biliaires                       | 1,5 g                  |
| rouge neutre                         | 0,03 g                 |
| cristal violet                       | 0,002 g                |
| agar-agar en poudre ou en paillettes | 9 à 18 g <sup>1)</sup> |
| eau                                  | 1 000 ml               |

##### Préparation

Opérer comme suit pour conserver au milieu son pouvoir sélectif et sa spécificité. Dissoudre dans l'eau les composants ou le milieu complet déshydraté et laisser reposer quelques minutes. Mélanger ensuite énergiquement et ajuster le pH (en contrôlant au pH-mètre) de sorte qu'après ébullition, il soit de 7,4 ± 0,1 à 25 °C.

Laisser bouillir durant 2 min. Refroidir immédiatement le milieu au bain d'eau (6.5) à 45 ± 0,5 °C.

1) Selon les prescriptions du fabricant.

Éviter la surchauffe du milieu ou 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 (9.2.1.3).

Utiliser le milieu dans les 3 h qui suivent sa préparation.

## 8 PRÉPARATION DE L'ÉCHANTILLON POUR ESSAI

Se reporter à la Norme internationale traitant du produit à examiner. S'il n'y a pas de Norme internationale disponible, il est recommandé que les parties concernées se mettent d'accord à ce sujet.

## 9 MODE OPÉRATOIRE

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

Se reporter à l'ISO . . . (voir chapitre 2) et à la Norme internationale traitant du produit à examiner.

Préparer la suspension mère et les dilutions au moyen d'un diluant répondant aux conditions décrites en 7.2.

### 9.2 Méthode par comptage

#### 9.2.1 Ensemencement

**9.2.1.1** Prendre deux boîtes de Petri stériles (6.3). Transférer, dans chacune de ces boîtes, à l'aide d'une pipette stérile (6.4), 1 ml de l'échantillon pour essai s'il est liquide, ou 1 ml de la suspension mère dans le cas d'autres produits.

**9.2.1.2** Prendre deux autres boîtes de Petri stériles. Transférer, dans chacune de ces boîtes, à l'aide d'une nouvelle pipette stérile, 1 ml de la dilution au 1/10 (produit liquide) ou 1 ml de la dilution au 1/100 (autres produits).

Recommencer les opérations décrites à l'alinéa précédent avec les dilutions suivantes.

**9.2.1.3** Couler, dans chaque boîte de Petri, environ 12 ml du milieu VRBL (7.3) à  $45 \pm 0,5$  °C. Le temps qui s'écoule entre la fin de la préparation de la suspension mère (ou de la dilution au 1/10 dans le cas d'un produit liquide) et le moment où les dilutions sont en contact avec le milieu (7.3), ne doit pas dépasser 15 min.

Mélanger soigneusement l'inoculum au milieu et laisser se solidifier en posant les boîtes de Petri sur une surface fraîche et horizontale.

Préparer également une boîte témoin avec 12 ml du milieu pour contrôler sa stérilité.

**9.2.1.4** Après solidification complète, couler, à la surface du milieuensemencé, environ 4 ml du milieu VRBL (7.3) à  $45 \pm 0,5$  °C. Laisser se solidifier comme décrit ci-dessus.

### 9.2.2 Incubation

Retourner les boîtes ainsi préparées et les placer dans l'étuve (6.2) à  $30 \pm 1$  °C. Les laisser dans l'étuve durant  $24 \pm 2$  h.

### 9.2.3 Interprétation

Après la période d'incubation prescrite (voir 9.2.2), procéder, à l'aide du compteur (6.6), au comptage des colonies caractéristiques des coliformes pour chaque boîte ne contenant pas plus de 150 colonies<sup>1)</sup> caractéristiques ou non caractéristiques.

NOTE — Sont considérées comme caractéristiques les colonies violacées ayant 0,5 mm de diamètre ou plus, après 24 h d'incubation à 30 °C.

## 10 EXPRESSION DES RÉSULTATS

### 10.1 Mode de calcul

Opérer comme décrit en 10.1.1, 10.1.2, 10.1.3 ou 10.1.4, en fonction du nombre de colonies comptées en 9.2.3.

**10.1.1** S'il existe une ou deux boîtes contenant entre 15 et 150 colonies caractéristiques au niveau d'une seule et même dilution, calculer la moyenne arithmétique du nombre de colonies comptées dans les deux boîtes.

Ne retenir ensuite que deux chiffres significatifs, en opérant de la façon suivante :

- si le nombre est inférieur à 100, l'arrondir au plus proche multiple de 5;
- si le nombre est supérieur à 100 et se termine par un 5, l'arrondir au plus proche multiple de 20;
- si le nombre est supérieur à 100 et ne se termine pas par un 5, l'arrondir au plus proche multiple de 10.

Multiplier cette valeur par l'inverse du taux de dilution correspondant pour obtenir le nombre de coliformes par millilitre ou par gramme de produit selon le cas. Exprimer ce résultat par un nombre compris entre 1,0 et 9,9 multiplié par  $10^n$ ,  $n$  étant la puissance appropriée de 10.

**10.1.2** S'il existe des boîtes contenant entre 15 et 150 colonies caractéristiques aux niveaux de deux dilutions consécutives, calculer le nombre de coliformes pour chaque dilution en procédant comme spécifié en 10.1.1 et prendre comme résultat la moyenne arithmétique des deux valeurs obtenues, sauf si le rapport de la valeur la plus forte à la valeur la plus faible est supérieur à 2; dans ce dernier cas, retenir comme résultat la valeur la plus faible.

1) Au-delà de ce chiffre, les colonies de coliformes risquent de présenter des aspects atypiques.

**10.1.3** Si les deux boîtes, au niveau de l'échantillon pour essai (produit liquide) ou de la suspension mère (autres produits), contiennent moins de 15 colonies caractéristiques, donner le résultat sous la forme :

- moins de 15 coliformes par millilitre (produit liquide), ou
- moins de  $15 \times s$  coliformes par gramme (autres produits),  $1/s$  étant le taux de dilution de la suspension mère.

**10.1.4** S'il n'y a aucune colonie caractéristique au niveau de l'échantillon pour essai (produit liquide) ou de la suspension mère (autres produits), donner le résultat sous la forme :

- moins de 1 coliforme par millilitre (produit liquide), ou
- moins de  $1 \times s$  coliformes par gramme (autres produits),  $1/s$  étant le taux de dilution de la suspension mère.

## 10.2 Fidélité de la méthode

Pour des raisons d'ordre statistique, dans 95 % des cas, les limites de confiance de cette méthode varient de  $\pm 16\%$  à  $\pm 52\%$  [Cowell et Morisetti (1969), *J. Sci. Fd. Agric.* **20**, 573]. En pratique, des variations plus importantes encore peuvent être observées et, en particulier, entre les résultats obtenus par différents microbiologistes.

## 11 PROCÈS-VERBAL D'ESSAI

Le procès-verbal d'essai doit indiquer la méthode utilisée 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 procès-verbal d'essai doit donner tous les renseignements nécessaires à l'identification complète de l'échantillon.

