

NORME INTERNATIONALE

ISO
4832

Deuxième édition
1991-03-01

Microbiologie — Directives générales pour le dénombrement des coliformes — Méthode par comptage des colonies

iTeh STANDARD PREVIEW

*Microbiology — General guidance for the enumeration of coliforms —
Colony count technique*

ISO 4832:1991

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/11594d7b-fd5c-45d7-816b-8e35fd4d95/iso-4832-1991>



Numéro de référence
ISO 4832:1991(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 4832 a été élaborée par le comité technique ISO/TC 34, *Produits agricoles alimentaires*.

Cette deuxième édition annule et remplace la première édition (ISO 4832:1978), dont elle constitue une révision technique.

L'annexe A fait 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 destinés 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 internationale et/ou des normes nationales existent peut-être. Dans le cas où des Normes internationale 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 ci-après est plus précise que celle décrite dans ISO 4831:1990, *Microbiologie — Directives générales pour le dénombrement des coliformes — Technique du nombre le plus probable*, 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 internationale traitant des produits à examiner.

0.3 Pour les besoins d'une méthode d'essai efficace, la définition des «coliformes», donnée dans l'article 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)» (par exemple, certaines souches de

Citrobacter, Enterobacter, Klebsiella). (Voir Edwards, P.R. et Ewing, H.W. *Identification of Enterobacteriaceae*, 3e édition, Burgess Publishing Company, Minneapolis, Minnesota, USA, 1972.)

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO 4832:1991

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/11594d7b-fd5c-45d7-816b-8e35f1df4d95/iso-4832-1991>

Microbiologie — Directives générales 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 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, 35 °C ou 37 °C, 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.

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 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), forment des colonies caractéristiques dans la gélose lactosée biliée au cristal violet et au rouge neutre, lorsque l'essai est effectué selon la méthode spécifiée dans la présente Norme internationale.

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 des boîtes à 30 °C, 35 °C ou 37 °C (selon accord) pendant 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 les boîtes de Petri retenues (voir 10.1).

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 Milieu sélectif solide: gélose lactosée billée au cristal violet et au rouge neutre (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	12 à 18 g ¹⁾
eau	1 000 ml

Préparation

Opérer comme suit pour conserver au milieu son pouvoir sélectif et sa spécificité.

Mélanger vigoureusement les composants ou le milieu complet déshydraté dans l'eau et laisser reposer quelques minutes. Ajuster le pH de sorte qu'après ébullition, il soit de 7,4 à 25 °C. Amener à ébullition en agitant de temps en temps.

Laisser bouillir pendant 2 min. Refroidir immédiatement le milieu au bain d'eau (6.5) réglé à 45 °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 (voir 9.2.2).

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

6 Appareillage et verrerie

NOTE 2 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:

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

Voir l'ISO 7218.

1) Selon le pouvoir gélifiant de l'agar-agar.

6.2 **Étuve**, réglable à 30 °C ± 1 °C, 35 °C ± 1 °C ou 37 °C ± 1 °C.

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

6.4 **Pipettes à écoulement total**, de 1 ml de capacité nominale.

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

6.6 **Appareil de comptage de colonies**, comportant un système d'éclairage et un compteur numérique mécanique ou électronique.

6.7 **pH-mètre**, précis à ± 0,1 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

9.1 Prise d'essai, suspension mère et dilutions

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

9.2 Ensemencement et incubation

9.2.1 Prendre deux boîtes de Petri stériles (6.3). A l'aide d'une pipette stérile (6.4), transférer, dans chacune des boîtes, 1 ml de l'échantillon pour essai si le produit est liquide, ou 1 ml de la suspension mère dans le cas d'autres produits.

Prendre deux autres boîtes de Petri stériles. A l'aide d'une nouvelle pipette stérile, transférer, dans chacune des boîtes, 1 ml de la première dilution décimale de l'échantillon pour essai (10^{-1}) si le produit est liquide, ou 1 ml de la première dilution décimale de la suspension mère (10^{-2}) dans le cas d'autres produits.

Recommencer ces opérations avec les dilutions suivantes, à l'aide d'une nouvelle pipette stérile, pour chaque dilution décimale.

9.2.2 Couler, dans chaque boîte de Petri, environ 15 ml du milieu VRBL (5.3) à $45\text{ °C} \pm 0,5\text{ °C}$. Le temps qui s'écoule entre la fin de la préparation de la suspension mère (ou de la dilution 10^{-1} dans le cas d'un produit liquide) et le moment où les dilutions sont en contact avec le milieu de culture (5.3), ne doit pas dépasser 15 min.

Mélanger soigneusement l'inoculum au milieu de culture et laisser 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.

9.2.3 Après solidification complète, couler, à la surface du milieuensemencé, environ 4 ml du milieu VRBL (5.3) à $45\text{ °C} \pm 0,5\text{ °C}$. Laisser solidifier comme décrit ci-dessus.

9.2.4 Retourner les boîtes ainsi préparées et les incuber dans l'étuve réglée à 30 °C , 35 °C ou 37 °C (selon accord) pendant $24\text{ h} \pm 2\text{ h}$.

9.3 Comptage des colonies

Après la période d'incubation spécifiée (voir 9.2.4) procéder, à l'aide du compteur (6.6), au comptage des colonies caractéristiques de coliformes pour chaque boîte ne contenant pas plus de 150 colonies²⁾ caractéristiques et/ou non caractéristiques.

NOTE 3 Après 24 h d'incubation, les colonies caractéristiques sont violacées, d'un diamètre de 0,5 mm ou plus et parfois entourées d'une zone rougeâtre due à la précipitation de la bile.

10 Expression des résultats

10.1 Mode de calcul

10.1.1 Cas général — Boîtes contenant de 15 à 150 colonies caractéristiques

Retenir les boîtes contenant au plus 150 colonies, caractéristiques au niveau de deux dilutions successives. Il faut qu'une boîte contienne au moins 15 colonies caractéristiques.

Calculer le nombre N de coliformes par millilitre ou par gramme de produit, en tant que moyenne pondérée, à l'aide de l'équation suivante

$$N = \frac{\sum C}{(n_1 + 0,1n_2)d}$$

où

$\sum C$ est la somme des colonies caractéristiques comptées sur toutes les boîtes retenues;

n_1 est le nombre de boîtes retenues à la première dilution;

n_2 est le nombre de boîtes retenues à la seconde dilution;

d est le taux de dilution correspondant à la première dilution.

Arrondir les résultats calculés à deux chiffres significatifs.

Noter comme résultat le nombre de coliformes par millilitre ou par gramme de produit, exprimé par un nombre compris entre 1,0 et 9,9 multiplié par 10^x , où x est la puissance appropriée de 10.

EXEMPLE

Un dénombrement de micro-organismes à 30 °C a donné les résultats suivants:

— à la première dilution 10^{-2} retenue: 83 à 97 colonies caractéristiques

— à la seconde dilution 10^{-3} retenue: 13 à 8 colonies caractéristiques

$$N = \frac{\sum C}{(n_1 + 0,1n_2)d}$$

$$= \frac{83 + 97 + 13 + 8}{(2 + 0,1 \times 2) \times 10^{-2}}$$

$$= \frac{201}{0,022} = 9136$$

Arrondir à deux chiffres significatifs, soit 9 100 ou $9,1 \cdot 10^3$ coliformes par millilitre ou gramme de produit.

10.1.2 Cas où chaque boîte renferme moins de 15 colonies caractéristiques

Si chacune des boîtes retenues renferme moins de 15 colonies caractéristiques, calculer le nombre estimé N_E de coliformes au moyen de l'équation donnée en 10.1.1.

2) Au-delà de ce chiffre, les colonies de coliformes risquent de présenter des aspects non caractéristiques.

EXEMPLE

Un dénombrement de coliformes à 30 °C a donné les résultats suivants:

- à la dilution 10⁻⁴: 140 et 145 colonies, dont respectivement 5 et 3 colonies caractéristiques.
- à la dilution 10⁻⁵: 11 et 8 colonies, dont respectivement 0 et 1 colonie caractéristique.

$$N_E = \frac{5 + 3 + 0 + 1}{(2 + 0,1 \times 2) \times 10^{-4}}$$

$$= \frac{9}{2,2 \times 10^{-4}} = 40000$$

Arrondir à deux chiffres significatifs comme spécifié en 10.1.1, soit 4,0 × 10⁴ coliformes par millilitre ou gramme de produit.

10.1.3 Estimation des petits nombres

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 (produits liquides);
- moins de 15 × 1/*d* coliformes par grammes (autres produits), *d* étant le taux de dilution de la suspension mère.

10.1.4 Aucune colonie caractéristique

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 coliformes par millilitre (produits liquides);

- moins de 1 × 1/*d* coliformes par grammes (autres produits), *d* étant le taux de dilution de la suspension mère.

10.2 Fidélité

10.2.1 Cas des boîtes contenant de 15 à 150 colonies caractéristiques (voir 10.1.1)

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

10.2.2 Cas où chaque boîte contient moins de 15 colonies caractéristiques (voir 10.1.2)

Se reporter au tableau A.1. Pour obtenir les limites de confiance, multiplier les limites inférieures et supérieures par 1/*d*, *d* étant le taux de dilution.

10.2.3 Estimation des petits nombres (voir 10.1.3)

Les limites de confiance des estimations des petits nombres sont données au tableau A.1.

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.

Annexe A
(normative)

Limites de confiance des estimations des petits nombres de colonies

Les limites de confiance au niveau 95 % des estimations des petits nombres, lorsque le nombre de

colonies caractéristiques sur les boîtes retenues est inférieur à 15, sont données dans le tableau A.1.

Tableau A.1

Nombre de colliformes	Limites de confiance au niveau 95 %	
	Inférieure	supérieure
1	< 1	2
2	< 1	4
3	< 1	5
4	1	6
5	2	9
6	2	10
7	2	12
8	3	13
9	4	14
10	4	16
11	5	18
12	6	19
13	7	20
14	7	21
15	8	23

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)
ISO 4832:1991
<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/11594d7b-fd5c-45d7-816b-8e35fd4d95/iso-4832-1991>