

TC 374

NORME INTERNATIONALE 4833

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

Microbiologie — Directives générales pour le dénombrement des micro-organismes — Méthode par comptage des colonies obtenues à 30 °C

Microbiology — General guidance for enumeration of micro-organisms — Colony count technique at 30 °C

Première édition — 1978-02-01

CDU 663.1

Réf. n° : ISO 4833-1978 (F)

Descripteurs : produit alimentaire, produit animal, analyse microbiologique, comptage, micro-organisme.

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 4833 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	Pologne
Allemagne, R.F.	Hongrie	Portugal
Australie	Inde	Roumanie
Autriche	Iran	Royaume-Uni
Canada	Irlande	Tchécoslovaquie
Chili	Israël	Turquie
Espagne	Mexique	U.S.A.
France	Pays-Bas	Yougoslavie

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

Nouvelle-Zélande
Thaïlande

Microbiologie — Directives générales pour le dénombrement des micro-organismes — Méthode par comptage des colonies obtenues à 30 °C

0 INTRODUCTION

La présente Norme internationale se propose de fournir des directives générales pour l'examen des 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.

1 OBJET ET DOMAINE D'APPLICATION

La présente Norme internationale donne des directives générales pour le dénombrement des micro-organismes dans les produits destinés à la consommation humaine ou à l'alimentation animale, par comptage des colonies obtenues en milieu solide, après incubation en aérobiose 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 ..., *Microbiologie — Directives générales pour la préparation des dilutions*.¹⁾

3 DÉFINITION

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

micro-organismes : Bactéries, levures et moisissures se développant en aérobies à 30 °C, dans les conditions opératoires décrites.

4 PRINCIPE

4.1 Ensemencement en profondeur d'un milieu de culture défini, 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'autre 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 durant 72 h à 30 °C en aérobiose.

4.3 Calcul du nombre de micro-organismes par millilitre ou par gramme d'échantillon, à partir du nombre de colonies obtenues dans les boîtes de Petri retenues (voir 10.1).

5 ÉCHANTILLONNAGE

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

1) En préparation.

une étuve est suffisante!
+ un oven is not a furnace

6 APPAREILLAGE ET VERRERIE

Matériel courant de laboratoire de microbiologie, et notamment :

6.1 Appareil pour la stérilisation en chaleur sèche (étuve) 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 à l'étuve en maintenant à une température comprise entre 170 et 175 °C durant au moins 1 h,
- soit à l'autoclave en 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.

6.8 Tubes à essais, de 18 × 180 mm, ou fioles de capacité convenable (voir 7.3 et 7.4).

7 MILIEUX DE CULTURE ET DILUANT

7.1 Composants de base

Pour améliorer la reproductibilité des résultats, il est recommandé d'utiliser, pour la préparation des milieux de culture, des composants de base déshydratés ou des milieux complets déshydratés. 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 micro-organismes dans les conditions de l'essai.

Si les milieux et le diluant ne sont pas utilisés extemporanément, ils doivent être conservés à l'obscurité entre 0 et + 5 °C durant 1 mois au maximum, dans des conditions évitant toute modification de leur composition.

pendant H

1) Ce terme n'est actuellement utilisé que par certains producteurs de milieu. Tout autre digestat de caséine donnant des résultats comparables peut être utilisé.

2) Selon les prescriptions du fabricant.

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).

7.3 Gélose pour dénombrement

Composition

tryptone ¹⁾	5,0 g
extrait de levure déshydraté	2,5 g
dextrose anhydre	1,0 g
agar-agar en poudre ou en paillettes	9 à 18 g ²⁾
eau	1 000 ml

Préparation

Dissoudre, dans l'eau à l'ébullition, les composants ou le milieu complet déshydraté. Si nécessaire, ajuster le pH (en contrôlant au pH-mètre) de sorte qu'après stérilisation, il soit de 7,0 ± 0,2 à 25 °C.

Répartir le milieu dans des tubes à essais (6.8), à raison de 15 ml par tube, ou dans des fioles dont la capacité ne dépasse pas 500 ml, à raison d'environ la moitié du volume de la fiole.

Stériliser à l'autoclave à 121 ± 1 °C durant 20 min. Si le milieu est utilisé extemporanément, le refroidir à 45 ± 0,5 °C au bain d'eau (6.5) avant emploi.

Dans le cas contraire, avant de commencer l'examen microbiologique, afin d'éviter toute attente au moment de couler la gélose, faire fondre complètement le milieu au bain d'eau bouillante, puis refroidir à 45 ± 0,5 °C au bain d'eau (6.5).

7.4 Gélose non nutritive, dite «gélose blanche» (si nécessaire — voir 9.2.1.4)

Composition

agar-agar en poudre ou en paillettes	9 à 18 g ²⁾
eau	1 000 ml

Préparation

Dissoudre l'agar-agar dans l'eau à l'ébullition. Si nécessaire, ajuster le pH (en contrôlant au pH-mètre) de sorte qu'après stérilisation, il soit de 7,0 ± 0,2 à 25 °C.

Répartir le milieu dans des tubes à essais (6.8), à raison de 4 ml par tube, ou dans des fioles de 150 ml, à raison de 100 ml par fiole.

Stériliser à l'autoclave à 121 ± 1 °C durant 20 min. Si le milieu est utilisé extemporanément, le refroidir à 45 ± 0,5 °C au bain d'eau (6.5) avant emploi.

Dans le cas contraire, avant de commencer l'examen microbiologique, afin d'éviter toute attente au moment de couler la gélose, faire fondre complètement le milieu au bain d'eau bouillante, puis refroidir à $45 \pm 0,5$ °C au bain d'eau (6.5).

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 15 ml de la gélose pour dénombrement (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 de culture (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.

9.2.1.4 Après solidification complète et uniquement dans le cas où l'on suspecte le produit à examiner de contenir des micro-organismes dont les colonies envahissent la surface des milieux, couler, à la surface du milieu ensemencé, 4 ml de la gélose blanche (7.4) à $45 \pm 0,5$ °C. Laisser se solidifier comme décrit ci-dessus.

Cette opération, si elle a été effectuée, doit être mentionnée dans le procès-verbal d'essai.

9.2.2 Incubation

Retourner les boîtes ainsi préparées et les placer dans l'étuve (6.2) à 30 ± 1 °C. Les laisser dans l'étuve durant 72 ± 3 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 pour chaque boîte ne contenant pas plus de 300 colonies.

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 30 et 300 colonies 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 micro-organismes 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 30 et 300 colonies aux niveaux de deux dilutions consécutives, calculer le nombre de micro-organismes 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.

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 30 colonies, donner le résultat sous la forme :

- moins de 30 micro-organismes par millilitre (produit liquide), ou
- moins de $30 \times s$ micro-organismes 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 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 micro-organisme par millilitre (produit liquide), ou
- moins de $1 \times s$ micro-organismes 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 uniquement statistique, dans 95 % des cas, les limites de confiance de cette méthode varient de $\pm 12\%$ à $\pm 37\%$ [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.

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO 4833:1978

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/99746fff-d206-4154-bd05-0594e12cb760/iso-4833-1978>