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

iTeh STANDARD PREVIEW

(standards.iteh.ai)

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

ISO 4833:1991

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/5e28da6c-d2d2-4b5e-9b09-54aab72c348f/iso-4833-1991>



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 4833 a été élaborée par le comité technique ISO/TC 34, *Produits agricoles alimentaires*.

Cette deuxième édition annule et remplace la première édition (ISO 4833:1978), 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

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.

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/5e28da6c-d2d2-4b5e-9b09-344b12c3a080-iso-4833-1991>

L'harmonisation des méthodes d'essai ne peut pas être immédiate et, pour certains groupes de produits, 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.

Page blanche

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO 4833:1991

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/5e28da6c-d2d2-4b5e-9b09-54aab72c348f/iso-4833-1991>

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

1 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 °C¹⁾.

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.

1) La température de 30 °C est celle la plus couramment utilisée pour le dénombrement de la flore totale; aussi seule cette température a été retenue par le Sous-Comité 9 de l'ISO/TC 34. Néanmoins, si pour des raisons particulières une autre température était utilisée, il conviendrait de l'indiquer dans le rapport d'essai.

micro-organismes: Bactéries, levures et moisissures se développant en aérobiose, lorsque l'essai est effectué selon la méthode spécifiée dans la présente Norme internationale.

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'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, en aérobiose, pendant 72 h.

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

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 Gélose pour dénombrement

Composition

tryptone	5,0 g
extrait de levure déshydraté	2,5 g
glucose anhydre	1,0 g
agar-agar	12 g à 18 g ²⁾
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 7,0 à 25 °C.

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

Stériliser à l'autoclave réglé à 121 °C pendant 15 min. Si le milieu est utilisé extemporanément, le refroidir au bain d'eau (6.5) réglé à 45 °C avant emploi.

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

5.4 Gélose non nutritive, dite «gélose blanche» (si nécessaire — voir 9.2.3)

Composition

agar-agar	12 g à 18 g ²⁾
eau	1 000 ml

Préparation

Dissoudre l'agar-agar dans l'eau, en chauffant si nécessaire. Ajuster le pH si nécessaire de sorte qu'après stérilisation, il soit de 7,0 à 25 °C.

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

Stériliser à l'autoclave réglé à 121 °C pendant 15 min. Si le milieu est utilisé extemporanément, le refroidir au bain d'eau (6.5) réglé à 45 °C avant l'emploi.

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

6 Appareillage et verrerie

NOTE 1 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.

6.2 Étuve, réglable à 30 °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 unité de pH à 25 °C.

6.8 Tubes à essais, de 20 mm × 200 mm ou fioles de capacité 150 ml ou ne dépassant pas 500 ml.

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.

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

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 de la gélose pour dénombrement (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.

9.2.3 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 milieuensemencé, 4 ml de la gélose blan-

che (5.4), à $45\text{ °C} \pm 0,5\text{ °C}$. Laisser solidifier comme décrit ci-dessus.

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

9.2.4 Retourner les boîtes ainsi préparées et les incuber à l'étuve (6.2) réglée pendant $72\text{ h} \pm 3\text{ h}$.

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 pour chaque boîte contenant au plus 300 colonies.

10 Expression des résultats

10.1 Mode de calcul

10.1.1 Cas général — Boîtes contenant de 15 à 300 colonies

Retenir les boîtes contenant au plus 300 colonies, au niveau de deux dilutions successives. Il faut qu'une boîte renferme au moins 15 colonies.

Calculer le nombre N de micro-organismes 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 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 deuxième 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 micro-organismes 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: 168 à 215 colonies
- à la seconde dilution 10^{-3} retenue: 14 à 25 colonies

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

$$= \frac{168 + 215 + 14 + 25}{[2 + (0,1 \times 2)] \times 10^{-2}}$$

$$= \frac{422}{0,022} = 19182$$

Arrondir à deux chiffres significatifs, soit 19 000 ou $1,9 \times 10^4$ micro-organismes par millilitre ou gramme de produit.

10.1.2 Estimation des petits nombres

Si les deux boîtes, au niveau de l'échantillon pour essai (produits liquides) ou de la suspension mère (autres produits), contiennent moins de 15 colonies, faire la moyenne m des colonies comptées sur les deux boîtes.

Donner le résultat sous la forme:

- nombre estimé de micro-organismes par millilitres:

$$N_E = m \text{ (produits liquides)}$$

- nombre estimé de micro-organismes par gramme:

$$N_E = m \times d^{-1} \text{ (autres produits), } d \text{ étant le taux de dilution de la suspension mère.}$$

10.1.3 Aucune colonie

Si les deux boîtes au niveau de l'échantillon pour essai (produits liquides) ou de la suspension mère (autres produits), ne contiennent aucune colonie, donner le résultat sous la forme:

- moins de 1 micro-organisme par millilitre (produits liquides);
- moins de $1 \times d^{-1}$ micro-organisme par gramme (autres produits), d étant le taux de dilution de la suspension mère.

10.2 Fidélité**10.2.1 Boîtes contenant de 15 à 300 colonies (voir 10.1.1)**

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, *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 Estimation des petits nombres (voir 10.1.2)

Les limites de confiance pour les estimations des petits nombres de micro-organismes sont données au tableau A.1.

11 Rapport d'essai

Le rapport 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 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 retenues sur les boîtes est inférieur à 15

micro-organismes, sont données dans le tableau A.1.

Tableau A.1

Nombre de micro-organismes	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 4833:1991

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/5e28da6c-d2d2-4b5e-9b09-54aab72c348f/iso-4833-1991>