
**Microbiologie des aliments — Méthode
horizontale pour le dénombrement des
micro-organismes — Technique par
comptage des colonies à 30 °C**

*Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for
the enumeration of microorganisms — Colony-count technique at 30 °C*

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

[ISO 4833:2003](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/8a574a5d-fla0-4af3-ac88-f767595ee821/iso-4833-2003)

[https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/8a574a5d-fla0-4af3-ac88-
f767595ee821/iso-4833-2003](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/8a574a5d-fla0-4af3-ac88-f767595ee821/iso-4833-2003)



PDF – Exonération de responsabilité

Le présent fichier PDF peut contenir des polices de caractères intégrées. Conformément aux conditions de licence d'Adobe, ce fichier peut être imprimé ou visualisé, mais ne doit pas être modifié à moins que l'ordinateur employé à cet effet ne bénéficie d'une licence autorisant l'utilisation de ces polices et que celles-ci y soient installées. Lors du téléchargement de ce fichier, les parties concernées acceptent de fait la responsabilité de ne pas enfreindre les conditions de licence d'Adobe. Le Secrétariat central de l'ISO décline toute responsabilité en la matière.

Adobe est une marque déposée d'Adobe Systems Incorporated.

Les détails relatifs aux produits logiciels utilisés pour la création du présent fichier PDF sont disponibles dans la rubrique General Info du fichier; les paramètres de création PDF ont été optimisés pour l'impression. Toutes les mesures ont été prises pour garantir l'exploitation de ce fichier par les comités membres de l'ISO. Dans le cas peu probable où surviendrait un problème d'utilisation, veuillez en informer le Secrétariat central à l'adresse donnée ci-dessous.

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

[ISO 4833:2003](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/8a574a5d-fla0-4af3-ac88-f767595ee821/iso-4833-2003)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/8a574a5d-fla0-4af3-ac88-f767595ee821/iso-4833-2003>

© ISO 2003

Droits de reproduction réservés. Sauf prescription différente, 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'ISO à l'adresse ci-après ou du comité membre de l'ISO dans le pays du demandeur.

ISO copyright office
Case postale 56 • CH-1211 Geneva 20
Tel. + 41 22 749 01 11
Fax. + 41 22 749 09 47
E-mail copyright@iso.org
Web www.iso.org

Publié en Suisse

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 Normes internationales sont rédigées conformément aux règles données dans les Directives ISO/CEI, Partie 2.

La tâche principale des comités techniques est d'élaborer les Normes internationales. 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.

L'attention est appelée sur le fait que certains des éléments du présent document peuvent faire l'objet de droits de propriété intellectuelle ou de droits analogues. L'ISO ne saurait être tenue pour responsable de ne pas avoir identifié de tels droits de propriété et averti de leur existence.

L'ISO 4833 a été élaborée par le comité technique ISO/TC 34, *Produits alimentaires*, sous-comité SC 9, *Microbiologie*.

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

Cette troisième édition annule et remplace la deuxième édition (ISO 4833:1991). Les modifications techniques suivantes ont été apportées:

- <https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/8a574a5d-fla0-4af3-ac88-f767595ee821/iso-4833-2003>
Paragraphe 5.2, Gélose pour dénombrement: un examen des produits laitiers est inclus;
- Article 10, Expression des résultats: des données de fidélité sont données, ainsi qu'un exemple de données de fidélité concernant les produits laitiers.

Introduction

En raison de la grande diversité des produits alimentaires, il est possible que la présente méthode horizontale, dans tous ses détails, ne convienne pas exactement à certains produits. Dans ces cas, des méthodes différentes qui sont spécifiques à ces produits peuvent être utilisées si cela s'avère absolument nécessaire, pour des raisons techniques justifiées. Néanmoins, il est à espérer que, dans tous les cas, tous les efforts seront faits pour appliquer, chaque fois qu'il sera possible, la présente méthode horizontale.

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 la présente méthode horizontale aura été suivie 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, il se peut que des Normes internationales et/ou nationales, qui ne sont pas conformes à la présente méthode horizontale, existent déjà pour le produit à contrôler. Lorsque des Normes internationales existent déjà, il convient de les appliquer. Il serait souhaitable que, lorsque de telles normes sont revues, elles soient alignées sur la présente Norme internationale, si bien que finalement les seules divergences restantes par rapport à la présente méthode horizontale seront celles qui sont nécessaires pour des raisons techniques bien établies.

iTeh STANDARD PREVIEW (standards.iteh.ai)

[ISO 4833:2003](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/8a574a5d-fl a0-4af3-ac88-f767595ee821/iso-4833-2003)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/8a574a5d-fl a0-4af3-ac88-f767595ee821/iso-4833-2003>

Microbiologie des aliments — Méthode horizontale pour le dénombrement des micro-organismes — Technique par comptage des colonies à 30 °C

1 Domaine d'application

La présente Norme internationale spécifie une méthode horizontale pour le dénombrement des micro-organismes par comptage des colonies obtenues en milieu solide après incubation en aérobiose à 30 °C. En dehors des limitations exposées en introduction, la présente Norme internationale est applicable aux produits destinés à la consommation humaine ou à l'alimentation animale.

L'application de la présente Norme internationale à l'analyse de certains aliments fermentés est limitée. D'autres milieux et/ou conditions d'incubation peuvent être plus appropriés à l'analyse des aliments fermentés.

2 Références normatives

Les documents de référence suivants sont indispensables pour l'application du présent document. Pour les références datées, seule l'édition citée s'applique. Pour les références non datées, la dernière édition du document de référence s'applique (y compris les éventuels amendements).

ISO 6887 (toutes les parties), *Microbiologie des aliments — Préparation des échantillons, de la suspension mère et des dilutions décimales en vue de l'examen microbiologique*

ISO 7218:1996, *Microbiologie des aliments — Règles générales pour les examens microbiologiques*

ISO 8261, *Lait et produits laitiers — Lignes directrices générales pour la préparation des échantillons pour essai, de la suspension mère et des dilutions décimales en vue de l'examen microbiologique*

ISO/TS 11133-1, *Microbiologie des aliments — Guide pour la préparation et la production des milieux de culture — Partie 1: Guide général pour l'assurance de la qualité pour la préparation des milieux de culture en laboratoire*

3 Termes et définitions

Pour les besoins du présent document, les termes et définitions suivants s'appliquent.

3.1

micro-organisme

bactéries, levures ou moisissures formant des colonies dénombrables, se développant dans les conditions spécifiées 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.

Préparation d'autres paires de boîtes de Petri, dans les mêmes conditions, à partir de dilutions décimales de l'échantillon pour essai ou de la suspension mère.

4.2 Incubation en aérobiose des boîtes à 30 °C, pendant 72 h.

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 choisies (voir l'Article 10).

5 Milieux de culture et diluants

Pour les pratiques courantes de laboratoire, voir l'ISO 7218 et l'ISO/TS 11133-1.

5.1 Diluants

Voir la partie pertinente de l'ISO 6887.

5.2 Gélose pour dénombrement (PCA)

5.2.1 Composition

Digestat enzymatique de caséine	5,0 g
Extrait de levure	2,5 g
Glucose anhydre (C ₆ H ₁₂ O ₆)	1,0 g
Agar ¹⁾	9 g à 18 g
Eau	1 000 ml

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/8a574a5d-fla0-4af3-ac88-f767595ee821/iso-4833-2003>

Dans le cas d'analyse de produits laitiers, ajouter 1,0 g de lait écrémé en poudre par litre de milieu de culture. Le lait écrémé en poudre doit être exempt de substance inhibitrice.

5.2.2 Préparation

5.2.2.1 Préparation à partir de milieu commercial complet déshydraté

Suivre les instructions du fabricant et ajouter, si nécessaire, la poudre de lait écrémé (voir 5.2.1).

Ajuster le pH, si nécessaire, de façon qu'après stérilisation il soit de $7,0 \pm 0,2$ à 25 °C.

5.2.2.2 Préparation à partir de composants de base déshydratés

Dissoudre les composants dans l'eau, dans l'ordre suivant: l'extrait de levure, le digestat enzymatique de caséine, le glucose et, si nécessaire, le lait écrémé en poudre. Chauffer l'eau facilite la préparation.

Ajouter l'agar et amener à ébullition, tout en mélangeant fréquemment de façon à dissoudre complètement l'agar.

Ajuster le pH, si nécessaire, de façon qu'après stérilisation il soit de $7,0 \pm 0,2$ à 25 °C.

1) Selon le pouvoir gélifiant de l'agar.

5.2.2.3 Distribution, stérilisation et stockage

Répartir le milieu dans des tubes à essais (6.8), à raison de 12 ml à 15 ml par tube, ou dans des fioles (6.8) dont la capacité ne dépasse pas 500 ml.

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

Si le milieu est utilisé extemporanément, le refroidir entre 44 °C et 47 °C avant l'emploi dans un bain d'eau (6.5). Sinon, stocker le milieu à l'obscurité pendant 3 mois au plus, à une température de 3 °C ± 2 °C et dans des conditions qui n'altèrent pas sa composition ni ses propriétés.

Avant de commencer l'examen microbiologique, et afin d'éviter toute attente au moment de couler le milieu, faire fondre complètement le milieu, puis le refroidir entre 44 °C et 47 °C dans un bain d'eau (6.5) avant l'emploi.

Afin de vérifier la température de l'agar, il est recommandé de placer un thermomètre dans une solution de contrôle de l'agar à 15 g/l, dans un conteneur séparé identique à ceux utilisés pour le milieu. Il convient que la solution de contrôle de température soit exposée aux mêmes conditions de chauffage et de refroidissement que le milieu lui-même.

5.2.3 Contrôle de performance pour l'assurance de la qualité du milieu de culture

Se reporter à l'ISO/TS 11133-1 afin de contrôler la performance du milieu.

5.3 Milieu double couche (si nécessaire; voir 9.2.7)

5.3.1 Composition

Agar ¹⁾	12 g à 18 g ISO 4833:2003
Eau	1 000 ml https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/8af74a5d-fla0-4af3-ac88-f767595ee821/iso-4833-2003

5.3.2 Préparation

Ajouter l'agar dans l'eau et porter à ébullition, tout en mélangeant fréquemment de façon à dissoudre complètement l'agar, ou étuver pendant environ 30 min.

Ajuster le pH si nécessaire de sorte qu'après stérilisation, il soit de 7,0 ± 0,2 à 25 °C.

5.3.3 Distribution, stérilisation et stockage

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.

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

Si le milieu est utilisé extemporanément, le refroidir entre 44 °C et 47 °C avant l'emploi dans un bain d'eau (6.5). Sinon, stocker le milieu à l'obscurité pendant 3 mois au plus, à une température de 3 °C ± 2 °C, et dans des conditions qui n'altèrent pas sa composition ni ses propriétés.

Avant de commencer l'examen microbiologique, et afin d'éviter toute attente au moment de couler le milieu, faire fondre complètement le milieu, puis le refroidir entre 44 °C et 47 °C dans un bain d'eau (6.5) avant l'emploi.

6 Appareillage et verrerie

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

Matériel courant de laboratoire de microbiologie et, en particulier, ce qui suit.

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

Voir l'ISO 7218.

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

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

6.4 Pipettes, de 1 ml de capacité nominale.

6.5 Bain d'eau, réglable à une température comprise entre 44 °C et 47 °C .

6.6 Appareil de comptage de colonies, constitué par exemple d'une base éclairée avec un fond noir, muni d'une lentille grossissante de grossissement approprié d'environ $\times 1,5$ et d'un compteur numérique mécanique ou électronique.

6.7 pH-mètre, ayant une précision de lecture de $\pm 0,1$ unité de pH à 25 °C .

6.8 Tubes à essais ou fioles, de capacité appropriée et ne dépassant pas 500 ml.

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

7 Échantillonnage

ISO 4833:2003

Il est important que le laboratoire reçoive un échantillon réellement représentatif, non endommagé ou modifié pendant le transport ou le stockage.

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/8a574a5d-fla0-4af3-ac88-1767595ee821/iso-4833-2003>

L'échantillonnage ne fait pas partie de la méthode spécifiée dans la présente Norme internationale. Se reporter à la Norme internationale spécifique au produit concerné. S'il n'existe aucune 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 partie pertinente de l'ISO 6887, ou à l'ISO 8261, et à la Norme internationale spécifique au 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 la partie pertinente de l'ISO 6887 et la Norme internationale spécifique au produit concerné.

9.2 Ensemencement et incubation

9.2.1 Prendre deux boîtes de Petri stériles (6.3). À 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 (dilution à 10^{-1}).

9.2.2 Prendre deux autres boîtes de Petri stériles (6.3). À l'aide d'une nouvelle pipette stérile (6.4), transférer, dans chacune des boîtes, 1 ml de la première dilution décimale (10^{-1}) de l'échantillon pour essai (si le produit est liquide) ou 1 ml de la première dilution décimale (10^{-2}) de la suspension mère (dans le cas d'autres produits).

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

9.2.4 Si approprié et si possible, sélectionner les dilutions critiques (au moins deux dilutions décimales successives) afin d'ensemencer des boîtes de Petri sur lesquelles croîtront entre 15 et 300 colonies par boîte.

9.2.5 Couler, dans chaque boîte de Petri, environ 12 ml à 15 ml de la gélose pour dénombrement (5.2), entre 44 °C et 47 °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 coulées sur le milieu de culture (5.2) ne doit pas dépasser 45 min.

9.2.6 Mélanger soigneusement l'inoculum au milieu de culture en faisant tourner les boîtes de Petri et laisser le mélange se solidifier en posant les boîtes de Petri sur une surface fraîche et horizontale.

9.2.7 Après solidification complète et uniquement dans le cas où il est suspecté que le produit à examiner contient des micro-organismes dont les colonies envahissent la surface du milieu, couler à la surface du milieuensemencé environ 4 ml du milieu double couche (5.3), entre 44 °C et 47 °C. Laisser se solidifier comme décrit ci-dessus.

9.2.8 Retourner les boîtes ainsi préparées et les placer à l'étuve (6.2) à 30 °C \pm 1 °C pendant 72 h \pm 3 h. Ne pas empiler plus de 6 boîtes. Les piles de boîtes doivent être séparées les unes des autres, ainsi que des parois et du haut de l'étuve.

9.3 Comptage des colonies

9.3.1 Après la période d'incubation spécifiée (9.2.8), procéder, à l'aide de l'appareil de comptage (6.6), au comptage des colonies (10.1) si nécessaire. Examiner chaque boîte en lumière tamisée. Il est important d'inclure dans le comptage les colonies en tête d'épingle. Mais il est essentiel que l'opérateur évite de confondre les particules non dissoutes ou précipitées avec des colonies en tête d'épingle. Examiner avec attention les éléments douteux, en utilisant un fort grossissement si nécessaire, afin de distinguer les colonies des particules étrangères.

9.3.2 Les colonies envahissantes doivent être comptées comme une seule colonie. Si moins d'un quart de la boîte est envahi par de telles colonies, compter les colonies de la partie de la boîte non envahie et calculer le nombre de colonies correspondant à la boîte entière. Si plus d'un quart de la boîte est envahi, ne pas tenir compte de la boîte.

10 Expression des résultats

10.1 Mode de calcul

Voir l'Amendement 1 à l'ISO 7218:1996.

10.2 Fidélité

10.2.1 Généralités

Les données de fidélité ont été calculées pour des boîtes contenant plus de 15 colonies et moins de 300 colonies. Les données de fidélité dépendent des flores en association et de la matrice de l'échantillon. Les données présentées ici sont issues d'études collaboratives (voir les références [1], [2] et [3]) et sont valables