
**Microbiologie des aliments — Méthode
horizontale pour la recherche et le
dénombrement des coliformes —
Technique du nombre le plus probable**

*Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for
the detection and enumeration of coliforms — Most probable number
technique*

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

[ISO 4831:2006](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/c078bcdc-aed6-4e37-81b8-1d318cd399b6/iso-4831-2006)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/c078bcdc-aed6-4e37-81b8-1d318cd399b6/iso-4831-2006>



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 4831:2006](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/c078bcdc-aed6-4e37-81b8-1d318cd399b6/iso-4831-2006)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/c078bcdc-aed6-4e37-81b8-1d318cd399b6/iso-4831-2006>

© ISO 2006

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 4831 a été élaborée par le comité technique ISO/TC 34, *Produits alimentaires*, sous-comité SC 9, *Microbiologie*.

Cette troisième édition de l'ISO 4831 annule et remplace l'ISO 4831:1991 et l'ISO 5541-2:1986. Les Articles 4, 9 et 10 de l'ISO 4831:1991 ont fait l'objet d'une révision technique. Les principales modifications sont les suivantes:

- la technique alternative d'incubation à 35 °C a été supprimée;
- la méthode de recherche et la méthode de dénombrement des coliformes sont couvertes (Articles 4 et 9);
- la méthode de calcul du nombre le plus probable et de comptage des colonies a été supprimée (Article 10) et est référencée dans l'ISO 7218.

Étant donné la nature des modifications apportées à l'édition précédente de la présente Norme internationale, il est considéré que la validation des méthodes alternatives basée sur l'ISO 4831:1991 n'est pas affectée par la présente révision.

Introduction

En raison de la grande variété des produits alimentaires et des produits pour animaux, la méthode horizontale peut ne pas être totalement appropriée pour certains produits. Dans ce cas, des méthodes différentes spécifiques à ces produits peuvent être utilisées si cela est absolument nécessaire pour des raisons techniques justifiées. Néanmoins, tous les efforts doivent être faits pour appliquer cette méthode horizontale autant que faire se peut.

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 cette méthode horizontale a 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, des Normes internationales et/ou des normes nationales qui ne sont pas en conformité avec cette méthode horizontale peuvent exister. Il est souhaitable que, lorsqu'elles viendront en révision, elles soient alignées sur la présente Norme internationale pour que, finalement, les seules divergences restantes soient celles qui sont nécessaires pour des raisons techniques bien établies.

La technique décrite dans la présente Norme internationale est moins précise que celle décrite dans ISO 4832 ^[1], mais elle permet d'effectuer un examen microbiologique sur une prise d'essai plus importante et, par conséquent, de détecter un plus petit nombre de coliformes par gramme ou par millilitre de produit. D'autre part, la définition des «coliformes» adoptée dans les deux documents étant différente, on ne dénombre pas nécessairement les mêmes micro-organismes.

Pour chaque produit particulier, le choix de la technique sera précisé dans la Norme Internationale concernant ce produit.

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/c078bcdc-aed6-4e37-81b8-14318c13906/iso-4831-2006>

Pour les besoins d'une méthode d'essai efficace, la définition des «coliformes» donnée dans l'Article 3 et servant de base à la technique n'est pas nécessairement identique aux définitions correspondantes données dans d'autres textes publiés. Une certaine proportion de souches des micro-organismes désignés sous le nom de «coliformes» (y compris les *Escherichia coli*) dans d'autres textes publiés, ne produisent pas suffisamment de gaz pour pouvoir être décelées au moyen des cloches de Durham (c'est-à-dire des souches anaérogènes). C'est pourquoi la technique décrite dans la présente Norme Internationale ne détectera pas la totalité 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 Référence [2]).

Microbiologie des aliments — Méthode horizontale pour la recherche et le dénombrement des coliformes — Technique du nombre le plus probable

1 Domaine d'application

La présente Norme internationale donne des directives générales pour la recherche et le dénombrement des coliformes. La présente Norme internationale s'applique à

- des produits destinés à la consommation humaine et à l'alimentation des animaux, et
- des échantillons environnementaux au voisinage de la production et de la manipulation des aliments.

Le dénombrement est réalisé par calcul du nombre le plus probable (NPP) après incubation à 30 °C ou à 37 °C en milieu liquide.

NOTE Cette température faisant l'objet d'un accord entre les parties concernées. Dans le cas du lait et des produits laitiers, la température d'incubation est 30 °C.

La méthode de dénombrement est applicable lorsque le nombre attendu est compris entre 1 et 100 par millilitre ou par gramme d'échantillon soumis à l'essai.

Des limites sont imposées aux possibilités d'application de la présente Norme internationale, du fait que cette méthode est sujette à de grandes variations. Les informations données dans l'Article 11 donnent des indications sur l'applicabilité de la méthode et sur l'interprétation des résultats.

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, *Microbiologie des aliments — Recommandations et 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*

ISO/TS 11133-2:2003, *Microbiologie des aliments — Guide pour la préparation et la production des milieux de culture — Partie 2: Guide général pour les essais de performance des milieux de culture*

3 Termes et définitions

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

3.1 coliformes
bactéries qui, à la température spécifiée (c'est-à-dire 30 °C ou 37 °C, selon accord), fermentent le lactose avec production de gaz, lorsque l'essai est effectué dans les conditions spécifiées dans la présente Norme internationale

3.2 recherche des coliformes
mise en évidence de la présence ou de l'absence de ces bactéries, dans une certaine quantité de produit, lorsque les essais sont réalisés en accord avec la méthode spécifique de la présente Norme internationale

3.3 dénombrement des coliformes
nombre le plus probable de coliformes trouvés par millilitre ou par gramme de l'échantillon pour essai, lorsque les essais sont réalisés en accord avec la méthode spécifique de la présente Norme internationale

4 Principe

4.1 Recherche des coliformes

4.1.1 Ensemencement de la prise d'essai dans un tube de bouillon d'enrichissement sélectif, puis incubation à 30 °C ou 37 °C (selon accord des parties) pendant 24 h ou 48 h.

4.1.2 Ensemencement d'un milieu de confirmation à partir de la culture obtenue en 4.1.1 quand un trouble et/ou du gaz apparaissent, puis incubation à 30 °C ou 37 °C (selon accord des parties) pendant 24 h ou 48 h.

4.1.3 La présence de coliformes est confirmée dans le cas où un trouble ou la formation de gaz apparaissent dans les tubes obtenus en 4.1.2

4.2 Dénombrement par la technique du NPP

4.2.1 Ensemencement de trois tubes de milieu d'enrichissement sélectif liquide double concentration avec une quantité déterminée de l'échantillon pour essai, si le produit initial est liquide, ou avec une quantité déterminée de suspension mère dans le cas d'autres produits.

4.2.2 Ensemencement de trois tubes de milieu d'enrichissement sélectif liquide simple concentration avec une quantité déterminée de l'échantillon pour essai, si le produit initial est liquide, ou avec une quantité déterminée de suspension mère dans le cas d'autres produits. Puis, dans les mêmes conditions, ensemencement des tubes de milieu simple concentration suivants avec les dilutions décimales obtenues à partir de l'échantillon pour essai ou de la suspension mère.

4.2.3 Incubation à 30 °C ou 37 °C (selon accord) pendant 24 h des tubes de milieu d'enrichissement sélectif double concentration et pendant 24 h ou 48 h, des tubes de milieu simple concentration et examen de ces tubes pour déterminer la formation éventuelle de gaz ou d'une opacité empêchant la détection de formation de gaz.

4.2.4 Ensemencement d'une série de tubes du milieu de confirmation avec les cultures des tubes de milieu d'enrichissement sélectif double concentration, et avec des cultures provenant des tubes de milieu d'enrichissement sélectif simple concentration ayant donné lieu à la formation de gaz ou à une opacité empêchant la détection de formation de gaz.

4.2.5 Incubation des tubes de 4.2.4 à 30 °C ou 37 °C (selon accord) pendant 24 h à 48 h et examen de cette nouvelle série de tubes pour déterminer la formation éventuelle de gaz.

4.2.6 À partir du nombre de tubes de cette nouvelle série (4.2.5) présentant une production de gaz, détermination du nombre le plus probable de coliformes par millilitre ou par gramme d'échantillon (c'est-à-dire le NPP) au moyen de la table NPP.

5 Milieux de culture et diluants

5.1 Généralités

Voir l'ISO 7218, l'ISO/TS 11133-1 et l'ISO/TS 11133-2 pour la préparation, la production et les performances des milieux de culture.

5.2 Diluants

Voir l'ISO 6887 (partie appropriée), l'ISO 8261 et la Norme internationale spécifique traitant du produit à examiner.

5.3 Milieu d'enrichissement sélectif: Bouillon à la tryptose et au lauryle sulfate

5.3.1 Composition

	a) Milieu double concentration	b) Milieu simple concentration
Digestat enzymatique de lait et protéines animales	40 g	20 g
Lactose (C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁ , H ₂ O)	10 g	5 g
Hydrogénomonophosphate de potassium (K ₂ HPO ₄)	5,5 g	2,75 g
Dihydrogénophosphate de potassium (KH ₂ PO ₄)	5,5 g	2,75 g
Chlorure de sodium	10 g	5 g
Lauryle sulfate de sodium	0,2 g	0,1 g
Eau	1 000 ml	1 000 ml

5.3.2 Préparation

Dissoudre les différents 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 $6,8 \pm 0,2$ à 25 °C.

Répartir les milieux par quantités de 10 ml dans des tubes d'approximativement 16 mm × 160 mm (6.4) contenant des cloches de Durham (6.5) dans le cas du milieu simple concentration et dans des tubes d'approximativement 20 mm × 200 mm (6.4) [sans cloches de Durham (6.5)] dans le cas du milieu double concentration.

Stériliser à l'autoclave à 121 °C pendant 15 min. Les cloches de Durham ne doivent pas contenir de bulles d'air après stérilisation.

5.3.3 Essai de performance pour l'assurance qualité du milieu de culture

Pour la définition de la sélectivité et de la productivité, faire référence à l'ISO/TS 11133-1. Le Tableau 1 de l'ISO/TS 11133-2:2003 présente les essais de performance pour le bouillon à la tryptose et au lauryle sulfate.

5.4 Milieu de confirmation: Bouillon lactosé bilié au vert brillant

5.4.1 Composition

Digestat enzymatique de caséine	10 g
Lactose (C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁ ,H ₂ O)	10 g
Bile de bœuf déshydratée	20 g
Vert brillant	0,013 3 g
Eau	1 000 ml

5.4.2 Préparation

Dissoudre les composants du milieu complet déshydraté dans l'eau, en chauffant si nécessaire.

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

Répartir les milieux par quantités de 10 ml dans des tubes d'approximativement 16 mm × 160 mm (6.4) contenant des cloches de Durham (6.5).

Stériliser à l'autoclave à 121 °C pendant 15 min. Les cloches de Durham ne doivent pas contenir de bulles d'air après stérilisation.

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

5.4.3 Essai de performance pour l'assurance qualité du milieu de culture

Pour la définition de la sélectivité et de la productivité, faire référence à l'ISO/TS 11133-1. Le Tableau 1 de l'ISO /TS 11133-2:2003 présente les essais de performance pour le bouillon lactosé bilié au vert brillant.

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/c078bcdc-aed6-4e37-81b8-1d318cd399b6/iso-4831-2006>

6 Appareillage et verrerie

Matériel courant de laboratoire de microbiologie (voir l'ISO 7218) et, notamment, ce qui suit:

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

Voir l'ISO 7218.

6.2 Étuve, réglable à $30 \text{ °C} \pm 1 \text{ °C}$ ou $37 \text{ °C} \pm 1 \text{ °C}$.

6.3 Anse bouclée, en platine iridiée ou en nickel chrome ayant un diamètre de 3 mm environ ou anses bouclées jetables.

6.4 Tubes à essai, ayant pour dimensions 16 mm × 160 mm et 20 mm × 200 mm, environ.

6.5 Cloches de Durham, de dimensions appropriées en vue de leur utilisation dans les tubes de 16 mm × 160 mm (6.4).

6.6 Pipettes à écoulement total, ayant une capacité nominale de 1 ml et 10 ml.

6.7 pH-mètre, précis à $\pm 0,1$ unité de pH à 25 °C.

7 Échantillonnage

Il est recommandé que l'échantillonnage ait été effectué conformément à la Norme internationale spécifique du produit concerné. En l'absence 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 l'ISO 6887 (partie appropriée), l'ISO 8261 et la Norme internationale spécifique traitant du produit concerné. En l'absence de Norme internationale spécifique, il est recommandé que les parties concernées se mettent d'accord à ce sujet.

9 Mode opératoire (voir l'Annexe A)

9.1 Méthode de recherche (voir Figure A.1)

9.1.1 Prise d'essai, suspension mère et dilutions

Voir l'ISO 6887 (partie appropriée), l'ISO 8261 et la Norme internationale spécifique du produit concerné.

9.1.2 Ensemencement et incubation

9.1.2.1 En fonction de la limite de détection demandée, x ml de l'échantillon à tester, si liquide, ou x ml de la suspension mère, dans le cas des autres produits, est transféré dans un tube contenant 10 ml de milieu sélectif d'enrichissement double concentration [5.3.1a)] pour $1 \text{ ml} < x < 10 \text{ ml}$, ou dans un tube contenant 10 ml de milieu sélectif d'enrichissement simple concentration [5.3.1b)] pour $x \leq 1 \text{ ml}$.

9.1.2.2 Laisser le tube de milieu double concentration (9.1.2.1) dans l'étuve (6.2) à 30 °C ou 37 °C (selon accord des parties) pendant $24 \text{ h} \pm 2 \text{ h}$.

9.1.2.3 Laisser le tube de milieu simple concentration (9.1.2.1) dans l'étuve (6.2) à 30 °C ou 37 °C (selon accord des parties) pendant $24 \text{ h} \pm 2 \text{ h}$. Si ni la présence de production de gaz ni celle d'un trouble empêchant la détection de production de gaz n'est observée à ce stade, laisser incubé $24 \text{ h} \pm 2 \text{ h}$ supplémentaires.

9.1.3 Confirmation (voir Figure A.3)

9.1.3.1 À partir du tube incubé en 9.1.2.2, ensemercer un tube de milieu de confirmation (5.4) à l'aide d'une anse (6.3). Incuber dans l'étuve (6.2) à 30 °C ou 37 °C (selon accord des parties) pendant $24 \text{ h} \pm 2 \text{ h}$, ou, si la production de gaz n'est pas observée à ce stade, pendant $48 \text{ h} \pm 2 \text{ h}$.

9.1.3.2 Opérer de même qu'en 9.1.3.1 pour les tubes incubés de 9.1.2.3 présentant un dégagement gazeux ou un trouble empêchant la détection de formation de gaz, dès que l'un de ces phénomènes est observé (c'est-à-dire après $24 \text{ h} \pm 2 \text{ h}$ ou après $48 \text{ h} \pm 2 \text{ h}$).

9.1.4 Interprétation (voir Figure A.1)

Un tube provenant de 9.1.3.1 ou de 9.1.3.2 dans lequel on observe la production de gaz après $24 \text{ h} \pm 2 \text{ h}$ ou $48 \text{ h} \pm 2 \text{ h}$ est considéré comme un tube positif.