
**Microbiologie des aliments — Méthode
horizontale pour le dénombrement des
coliformes — Méthode par comptage des
colonies**

*Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for
the enumeration of coliforms — Colony-count technique*

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

[ISO 4832:2006](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/bc47d97d-e2f6-448b-b0ce-6c3658f6ff0f/iso-4832-2006)

[https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/bc47d97d-e2f6-448b-b0ce-
6c3658f6ff0f/iso-4832-2006](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/bc47d97d-e2f6-448b-b0ce-6c3658f6ff0f/iso-4832-2006)



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 4832:2006](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/bc47d97d-e2f6-448b-b0ce-6c3658f6ff0f/iso-4832-2006)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/bc47d97d-e2f6-448b-b0ce-6c3658f6ff0f/iso-4832-2006>

© 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 4832 a été élaborée par le comité technique ISO/TC 34, *Produits alimentaires*, sous-comité SC 9, *Microbiologie*.

Cette troisième édition de l'ISO 4832 annule et remplace l'ISO 4832:1991 et l'ISO 5541-1:1986. Les modifications sont les suivantes:

- la méthode alternative d'incubation à 35 °C a été supprimée (voir 4.2);
- un test de confirmation sur bouillon lactosé bilié au vert brillant a été introduit (voir 5.4 et 9.4).

Étant donné la nature des modifications à l'édition précédente de la présente Norme internationale, il est considéré que cette révision n'a pas de conséquences sur la validation des méthodes alternatives basées sur l'ISO 4832:1991.

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 plus précise que celle décrite dans l'ISO 4831^[1], mais elle ne permet pas d'effectuer un examen microbiologique sur une prise d'essai aussi importante. C'est donc la méthode à utiliser de préférence lorsqu'un grand nombre de coliformes est présent. D'autre part, la définition des «coliformes» adoptée dans les deux documents étant différente, on ne dénombre pas nécessairement les mêmes microorganismes. Pour chaque produit particulier, le choix de la technique sera précisé dans la Norme internationale concernant ce produit.

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. La méthode décrite dans la présente Norme internationale ne détectera, en moyenne, 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*, d'*Enterobacter* et de *Klebsiella*). (Voir Référence [2]).

Microbiologie des aliments — Méthode horizontale 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. La présente Norme internationale s'applique à

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

par comptage des colonies après incubation à 30 °C ou 37 °C en milieu solide.

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.

Cette méthode est recommandée lorsque le nombre attendu est supposé être supérieur à 100 par millilitre ou par gramme d'échantillon testé.

(standards.iteh.ai)

2 Références normatives

ISO 4832:2006

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:—¹⁾, *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*

1) À publier.

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), forment des colonies caractéristiques en gélose lactosée biliée au cristal violet et au rouge neutre et qui, lors de l'essai de confirmation, fermentent le lactose avec production de gaz, lorsque l'essai est effectué dans les conditions spécifiées dans la présente Norme internationale

4 Principe

4.1 Préparation de deux boîtes de Petri, en utilisant un milieu de culture sélectif solide et une quantité spécifiée de l'échantillon pour essai si le produit initial est liquide ou une quantité spécifiée de suspension mère dans le cas d'autres produits.

Préparation d'autres boîtes de Petri, dans les mêmes conditions, en utilisant des dilutions décimales de l'échantillon pour essai ou de la suspension mère.

4.2 Incubation des boîtes à 30 °C ou 37 °C (selon accord) pendant 24 h.

4.3 Comptage des colonies caractéristiques et, si nécessaire, confirmation du nombre de colonies par fermentation du lactose.

4.4 Calcul du nombre de coliformes par millilitre ou par gramme d'échantillon à partir du nombre de colonies caractéristiques dénombrées par boîte de Petri (voir l'ISO 7218).

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

5 Milieux de culture et diluants

ISO 4832:2006
<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/bc47d97d-e2f6-448b-b0ce-6c3658f6ff0f/iso-4832-2006>

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 sélectif solide: gélose lactosée biliée au cristal violet et au rouge neutre (VRBL)

5.3.1 Composition

Digestat enzymatique de tissus animaux	7 g
Extrait de levure	3 g
Lactose (C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁ ·H ₂ O)	10 g
Chlorure de sodium	5 g
Sels biliaires	1,5 g
Rouge neutre	0,03 g
Cristal violet	0,002 g
Agar-agar ^a	12 g à 18 g
Eau	1 000 ml

^a Selon le pouvoir gélifiant de l'agar-agar.

5.3.2 Préparation

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

Mélanger soigneusement les composants ou le milieu complet déshydraté dans l'eau et laisser reposer plusieurs minutes. Ajuster le pH de sorte qu'après ébullition, il soit de $7,4 \pm 0,2$ à $25\text{ }^{\circ}\text{C}$. Chauffer jusqu'à ébullition en agitant de temps en temps.

Laisser bouillir 2 min. Mettre le milieu à refroidir immédiatement au bain d'eau (6.5) de $44\text{ }^{\circ}\text{C}$ à $47\text{ }^{\circ}\text{C}$.

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 4 h qui suivent sa préparation.

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

Pour la définition de la sélectivité et de la productivité, se reporter à l'ISO/TS 11133-1. L'essai de performance relatif à la gélose lactosée biliée au cristal violet et au rouge neutre (VRBL) est donné dans le Tableau B.1 de l'ISO/TS 11133-2:2003.

5.4 Milieu de confirmation: bouillon lactosé bilié au vert brillant

5.4.1 Composition

Digestat enzymatique de caséine	10 g
Lactose ($\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}, \text{H}_2\text{O}$)	10 g
Bile de boeuf 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 doucement si nécessaire dans un bain d'eau (6.5). Si nécessaire, ajuster le pH de sorte qu'après stérilisation, il soit $7,2 \pm 0,2$ à $25\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Répartir les milieux par quantités de 10 ml dans des tubes à essai (6.7) contenant des cloches de Durham (6.8). Stériliser à l'autoclave (6.1) à $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ pendant 15 min. Les cloches de Durham ne doivent pas contenir de bulles d'air après stérilisation.

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 $30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ ou $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$.

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

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

6.5 Bain d'eau, ou dispositif similaire, capable de fonctionner de $44\text{ }^{\circ}\text{C}$ à $47\text{ }^{\circ}\text{C}$ ou à $100\text{ }^{\circ}\text{C}$.

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

6.7 Tubes à essai, d'approximativement 16 mm × 160 mm.

6.8 Cloches de Durham, de dimensions appropriées en vue de leur utilisation dans les tubes à essai (6.7).

6.9 Flacons, pour porter à ébullition et conserver les milieux de culture.

6.10 pH-mètre, précis à 0,1 unité de pH à 25 °C.

6.11 Anse bouclée, en platine iridiée ou en nickel chrome ayant un diamètre de 3 mm environ ou **anses** à usage unique.

7 Échantillonnage

Il est recommandé que l'échantillonnage soit 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), à l'ISO 8261 et 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.

9 Mode opératoire

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/bc47d97d-e2f6-448b-b0ce-6c3658f6ff0f/iso-4832-2006>

9.1 Prise d'essai, suspension mère et dilutions

Préparer la prise d'essai, la suspension mère (dilution primaire) et les autres dilutions conformément à l'ISO 6887 (partie appropriée), à l'ISO 8261 et à la Norme internationale spécifique du produit concerné.

9.2 Ensemencement et incubation

9.2.1 Prendre deux boîtes de Petri stériles pour le produit liquide et/ou pour chaque dilution choisie. Transférer à l'aide d'une pipette stérile (6.4) 1 ml de liquide ou les dilutions appropriées au centre de chaque boîte. Utiliser une nouvelle pipette stérile pour inoculer chaque dilution dans les boîtes.

9.2.2 Verser environ 15 ml du milieu VRBL (5.3), de 44 °C à 47 °C, dans chaque boîte de Petri. 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 le milieu est versé dans les boîtes ne doit pas dépasser 15 min.

Mélanger soigneusement l'inoculum au milieu de culture et laisser le mélange 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 milieu ensemencé environ 4 ml du milieu VRBL (5.3), de 44 °C à 47 °C. Laisser solidifier comme décrit ci-dessus.

9.2.4 Retourner les boîtes ainsi préparées et les incuber dans l'étuve (6.2) réglée à 30 °C ou 37 °C (selon accord) pendant 24 h ± 2 h.

9.3 Dénombrement

Après la période d'incubation spécifiée (voir 9.2.4), sélectionner les boîtes de Petri ayant, si possible, 10 ou plus de 10 et moins de 150 colonies. Procéder au comptage à l'aide du compteur (6.6) des colonies violacées ayant un diamètre minimal de 0,5 mm (parfois entourées d'une zone rougeâtre due à la précipitation de la bile). Ces colonies sont considérées comme des colonies typiques de coliformes et ne nécessitent pas de confirmation.

Pour les détails du comptage des colonies, voir l'ISO 7218.

Dénombrer également et confirmer les colonies atypiques (par exemple celles de taille plus petite) et toutes les colonies dérivées des produits laitiers contenant des sucres autres que le lactose immédiatement après la période d'incubation, selon 9.4. La conversion des sucres autres que le lactose peut entraîner la formation de colonies, ayant une apparence similaire aux colonies typiques de coliformes.

NOTE L'aspect de la zone rougeâtre dû à la précipitation de bile entourant les colonies est fonction du type de coliformes et de la qualité du milieu.

9.4 Confirmation

Si nécessaire, inoculer cinq colonies atypiques dans des tubes de bouillon lactosé bilié au vert brillant (5.4). Mettre les tubes à incuber dans l'étuve (6.2) réglée à 30 °C ou 37 °C (selon accord des parties) pendant 24 h \pm 2 h. Considérer les colonies présentant une formation de gaz dans le cloches de Durham comme des coliformes. Tenir compte des résultats dans le calcul (Article 10).

10 Expression des résultats

Voir l'ISO 7218.

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/bc47d97d-e2f6-448b-b0ce-6c3658f6ff0f/iso-4832-2006>

11 Fidélité

En fonction d'une distribution de Poisson des microorganismes dans le substrat, les limites de confiance de cette méthode varient selon le dénombrement des colonies examinées de $\pm 16\%$ à $\pm 52\%$ (voir Référence [3]). En pratique, des variations plus importantes encore peuvent être observées. Dans différentes études comparatives, l'écart-type de la répétabilité (s_r) semble être 0,20 unités log, l'écart-type de reproductibilité (s_R) semble être 0,35 unités log (voir Références [4] et [5]).

D'autres informations concernant les limites de confiance sont données dans l'ISO 7218.

12 Rapport d'essai

Le rapport d'essai doit spécifier:

- toutes les informations nécessaires pour l'identification complète de l'échantillon;
- la méthode d'échantillonnage utilisée, si connue;
- la méthode utilisée, avec référence à la présente Norme internationale;
- tous les détails opératoires non spécifiés dans la présente Norme internationale, ou considérés comme facultatifs, ainsi que les incidents éventuels susceptibles d'avoir agi sur le(s) résultat(s);
- le(s) résultat(s) d'essai obtenu(s);
- si la répétabilité a été vérifiée, les résultats cités définitifs obtenus.