

---

---

**Microbiologie de la chaîne  
alimentaire — Méthode horizontale  
pour le dénombrement des micro-  
organismes —**

Partie 1:

**Comptage des colonies à 30 °C par  
la technique d'ensemencement en  
profondeur**

ISO 4833-1:2013  
<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/2dcb167b-8570-4e56-808d-a410d5c4b3bc/iso-4833-1-2013>

*Microbiology of the food chain — Horizontal method for the  
enumeration of microorganisms —  
Part 1: Colony count at 30 °C by the pour plate technique*



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

ISO 4833-1:2013

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/2dcb167b-8570-4e56-808d-a410d5c4b3bc/iso-4833-1-2013>



**DOCUMENT PROTÉGÉ PAR COPYRIGHT**

© ISO 2013

Droits de reproduction réservés. Sauf indication contraire, 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, l'affichage sur l'internet ou sur un Intranet, sans autorisation écrite préalable. Les demandes d'autorisation peuvent être adressées à l'ISO à l'adresse ci-après ou au 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](mailto:copyright@iso.org)  
Web [www.iso.org](http://www.iso.org)

Publié en Suisse

## Sommaire

Page

<b>Avant-propos</b> .....	<b>iv</b>
<b>1 Domaine d'application</b> .....	<b>1</b>
<b>2 Références normatives</b> .....	<b>1</b>
<b>3 Termes et définitions</b> .....	<b>2</b>
<b>4 Principe</b> .....	<b>2</b>
<b>5 Milieux de culture et diluants</b> .....	<b>2</b>
5.1 Généralités.....	2
5.2 Diluants.....	2
5.3 Milieu gélosé: gélose pour dénombrement (PCA).....	2
5.4 Milieu pour seconde couche (si nécessaire; voir <a href="#">9.2.7</a> ).....	3
<b>6 Appareillage</b> .....	<b>4</b>
<b>7 Échantillonnage</b> .....	<b>4</b>
<b>8 Préparation de l'échantillon pour essai</b> .....	<b>4</b>
<b>9 Mode opératoire</b> .....	<b>5</b>
9.1 Prise d'essai, suspension mère et dilutions.....	5
9.2 Ensemencement et incubation.....	5
9.3 Dénombrement des colonies.....	5
<b>10 Expression des résultats</b> .....	<b>6</b>
10.1 Méthode de calcul.....	6
10.2 Fidélité.....	6
10.3 Interprétation des résultats d'essai.....	6
<b>11 Rapport d'essai</b> .....	<b>7</b>
<b>Annexe A (informative) Utilisation de la différence critique pour l'interprétation des résultats</b> .....	<b>8</b>
<b>Bibliographie</b> .....	<b>9</b>

## 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 procédures utilisées pour élaborer le présent document et celles destinées à sa mise à jour sont décrites dans les Directives ISO/CEI, Partie 1. Il convient, en particulier, de prendre note des différents critères d'approbation requis pour les différents types de documents ISO. Le présent document a été rédigé conformément aux règles de rédaction données dans les Directives ISO/CEI, Partie 2, [www.iso.org/directives](http://www.iso.org/directives).

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. Les détails concernant les références aux droits de propriété intellectuelle ou autres droits analogues identifiés lors de l'élaboration du document sont indiqués dans l'Introduction et/ou sur la liste ISO des déclarations de brevets reçues, [www.iso.org/brevets](http://www.iso.org/brevets).

Les éventuelles appellations commerciales utilisées dans le présent document sont données pour information à l'intention des utilisateurs et ne constituent pas une approbation ou une recommandation.

Le comité chargé de l'élaboration du présent document est l'ISO/TC 34, *Produits alimentaires*, sous-comité SC 9, *Microbiologie*.

Cette première édition, conjointement avec l'ISO 4833-2, annule et remplace l'ISO 4833:2003.

L'ISO 4833 comprend les parties suivantes, présentées sous le titre général *Microbiologie de la chaîne alimentaire — Méthode horizontale pour le dénombrement des micro-organismes*:

- *Partie 1: Comptage des colonies à 30 °C par la technique d'ensemencement en profondeur*
- *Partie 2: Comptage des colonies à 30 °C par la technique d'ensemencement en surface*

# Microbiologie de la chaîne alimentaire — Méthode horizontale pour le dénombrement des micro-organismes —

## Partie 1: Comptage des colonies à 30 °C par la technique d'ensemencement en profondeur

### 1 Domaine d'application

La présente partie de l'ISO 4833 spécifie une méthode horizontale de dénombrement des micro-organismes capables de se développer et de former des colonies dans un milieu solide après incubation aérobie à 30 °C. La méthode est applicable:

- a) aux produits destinés à la consommation humaine et aux aliments pour animaux;
- b) aux échantillons d'environnement dans le domaine de la production d'aliments destinés à l'homme ou aux animaux et de la préparation des aliments.

La présente partie de l'ISO 4833 est applicable:

- 1) aux produits qui exigent un comptage fiable lorsqu'une limite inférieure de détection est spécifiée (inférieure à  $10^2$ /g ou  $10^2$ /ml pour des échantillons liquides ou inférieure à  $10^3$ /g pour des échantillons solides);
- 2) aux produits supposés contenir des colonies envahissantes qui masquent les colonies d'autres organismes, par exemple le lait et les produits laitiers susceptibles de contenir diverses espèces envahissantes de *Bacillus*.

La présente partie de l'ISO 4833 peut ne pas être adaptée à l'analyse de certains aliments fermentés et aliments pour animaux et d'autres milieux ou conditions d'incubation peuvent être plus appropriés. Toutefois, cette méthode peut être appliquée à de tels produits même si elle ne détecte pas totalement les micro-organismes présents en majorité dans ces produits.

Pour certaines matrices, la méthode spécifiée dans la présente partie de l'ISO 4833 peut donner des résultats différents de ceux obtenus avec la méthode spécifiée dans l'ISO 4833-2.

### 2 Références normatives

Les documents suivants, en tout ou partie, sont référencés de manière normative dans le présent document et sont indispensables pour son application. 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 — Exigences générales et recommandations*

ISO 11133, *Microbiologie des aliments et de l'eau — Préparation, production, stockage et 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 micro-organisme

entité de taille microscopique, comprenant les bactéries, les champignons, les protozoaires et les virus

[SOURCE: ISO/TS 11139:2006, 2.26]

Note 1 à l'article: Pour les besoins de la présente partie de l'ISO 4833, les micro-organismes sont des bactéries, levures et moisissures capables de produire des colonies dans les conditions spécifiées dans la présente partie de l'ISO 4833.

### 4 Principe

Une quantité déterminée de l'échantillon pour essai liquide, ou une quantité déterminée de suspension mère dans le cas d'autres produits, est déposée dans une boîte de Petri vide et mélangée à un milieu de culture gélosé fondu spécifié, constituant ainsi une boîte de gélose ensemencée en profondeur.

D'autres boîtes sont préparées dans les mêmes conditions, à partir de dilutions décimales de l'échantillon pour essai ou de la suspension mère.

Les boîtes sont incubées en conditions aérobies à 30 °C pendant 72 h.

Le nombre de micro-organismes par gramme d'échantillon ou le nombre de micro-organismes par millilitre d'échantillon est calculé à partir du nombre de colonies obtenues sur les boîtes contenant moins de 300 colonies.

ITEH STANDARD PREVIEW  
(standards.iteh.ai)

### 5 Milieux de culture et diluants

ISO 4833-1:2013

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/2dcb167b-8570-4e56-808d-a410d5c4b3bc/iso-4833-1-2013>

#### 5.1 Généralités

Suivre l'ISO 11133 pour la préparation, la production et les essais de performance du milieu de culture.

#### 5.2 Diluants

Utiliser le ou les diluants spécifiés dans l'ISO 6887 pour le produit concerné ou la Norme internationale spécifique du produit soumis à l'examen.

#### 5.3 Milieu gélosé: gélose pour dénombrement (PCA)

##### 5.3.1 Composition

Digestat enzymatique de caséine	5,0 g
Extrait de levure	2,5 g
Glucose anhydre (C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub> )	1,0 g
Gélose <sup>a</sup>	9 g à 18 g
Eau	1 000 ml

<sup>a</sup> En fonction du pouvoir gélifiant de la gélose.

Dans le cas d'analyse de produits laitiers, ajouter 1,0 g de poudre de lait écrémé par litre de milieu de culture. La poudre de lait écrémé doit être exempte de substances inhibitrices.

### 5.3.2 Préparation

Dissoudre, dans de l'eau, les composants ou le milieu complet déshydraté, en chauffant si nécessaire. Mélanger soigneusement et laisser reposer plusieurs minutes.

Ajuster le pH (6.4), si nécessaire, de sorte qu'après stérilisation, il soit de  $7,0 \pm 0,2$  à 25 °C.

Répartir le milieu dans des tubes, des fioles ou des flacons (6.8) de capacité appropriée.

Stériliser pendant 15 min à l'autoclave (6.1) à 121 °C.

Si le milieu est utilisé extemporanément, le refroidir dans un bain d'eau (6.3) maintenu entre 44 °C et 47 °C, avant utilisation. Sinon, stocker le milieu dans l'obscurité pendant 3 mois au plus, à une température de  $(5 \pm 3)$  °C, et dans des conditions qui n'altèrent ni sa composition ni ses propriétés.

Avant de commencer l'examen microbiologique, faire fondre complètement le milieu, puis le refroidir entre 44 °C et 47 °C dans un bain d'eau (6.3) avant utilisation. Voir l'ISO 11133.

Utiliser la gélose fondue dès que possible; il est recommandé de ne pas la conserver pendant plus de 4 h.

### 5.3.3 Essai de performance du milieu de culture

#### 5.3.3.1 Généralités

La gélose pour dénombrement (PCA) est un milieu non sélectif, utilisé dans la présente partie de l'ISO 4833 comme milieu ensemencé en profondeur. Les essais portant sur la productivité doivent être réalisés conformément à l'ISO 11133.

#### 5.3.3.2 Productivité

Incubation	(72 ± 3) h à (30 ± 1) °C
Souches témoins	<i>Escherichia coli</i> WDCM 00013 ou WDCM 00012 <sup>a</sup> [World Data Centre for Microorganisms (WDMC), Centre mondial de données pour les micro-organismes] <i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>spizizenii</i> WDCM 00003 <sup>a</sup> <i>Staphylococcus aureus</i> WDCM 00032 ou WDCM 00034
Milieu de référence	Gélose tryptone soja
Méthode de contrôle	Quantitative
Critère	Rapport de productivité (RP) ≥ 0,7

<sup>a</sup> Souches à utiliser au minimum par le laboratoire utilisateur. Voir la Référence [7] pour obtenir des informations sur les références des souches de collection et les coordonnées des centres concernés.

### 5.4 Milieu pour seconde couche (si nécessaire; voir 9.2.7)

#### 5.4.1 Composition

Gélose <sup>a</sup>	12 g à 18 g
Eau	1 000 ml

<sup>a</sup> En fonction du pouvoir gélifiant de la gélose.

## 5.4.2 Préparation

Ajouter la gélose dans l'eau et porter à ébullition, tout en mélangeant fréquemment de façon à dissoudre complètement la gélose, ou placer dans un flux de vapeur pendant environ 30 min.

Ajuster le pH (6.4), si nécessaire, de sorte qu'après stérilisation, il soit de  $7,0 \pm 0,2$  à  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ .

Répartir le milieu dans des tubes, des fioles ou des flacons (6.8) de capacité appropriée.

Stériliser dans un autoclave à  $121 \text{ }^\circ\text{C}$  pendant 15 min.

Si le milieu est utilisé extemporanément, le refroidir dans un bain d'eau (6.3) maintenu entre  $44 \text{ }^\circ\text{C}$  et  $47 \text{ }^\circ\text{C}$ , avant utilisation. Sinon, stocker le milieu dans l'obscurité pendant 3 mois au plus, à une température de  $(5 \pm 3) \text{ }^\circ\text{C}$ , et dans des conditions qui n'altèrent pas ni composition ni ses propriétés.

Avant de commencer l'examen microbiologique, faire fondre complètement le milieu, puis le refroidir entre  $44 \text{ }^\circ\text{C}$  et  $47 \text{ }^\circ\text{C}$  dans un bain d'eau (6.3) avant utilisation. Voir l'ISO 11133.

## 6 Appareillage

Le matériel à usage unique est acceptable au même titre que la verrerie et le matériel en plastique réutilisables, si ses spécifications sont appropriées.

Matériel courant de laboratoire de microbiologie (voir l'ISO 7218) et, en particulier, ce qui suit.

**6.1 Four** pour la stérilisation en chaleur sèche ou **autoclave** pour la stérilisation en chaleur humide, utilisé conformément à l'ISO 7218.

**6.2 Étuve**, pouvant être maintenue à une température de  $(30 \pm 1) \text{ }^\circ\text{C}$ .

**6.3 Bain d'eau**, pouvant maintenir une température comprise entre  $44 \text{ }^\circ\text{C}$  et  $47 \text{ }^\circ\text{C}$ .

**6.4 pH-mètre**, d'une précision de lecture de  $\pm 0,1$  unité pH à  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ .

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

**6.6 Pipettes graduées à écoulement total**, ayant une capacité nominale de 1 ml, avec des graduations de 0,1 ml, ISO 835[1] classe A, ou pipettes automatiques, ISO 8655-2[2], utilisant des embouts stériles.

**6.7 Appareil de comptage des colonies** (facultatif), constitué d'une base éclairée et, d'un compteur (facultatif) mécanique ou électronique à affichage numérique.

**6.8 Tubes, fioles ou flacons**, de capacité appropriée et ne dépassant pas 500 ml.

## 7 Échantillonnage

L'échantillonnage ne fait pas partie de la méthode spécifiée dans la présente partie de l'ISO 4833. Se reporter à la Norme internationale spécifique du produit concerné. S'il n'existe aucune Norme internationale spécifique, il est recommandé aux parties intéressées de convenir d'un accord à ce sujet.

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

## 8 Préparation de l'échantillon pour essai

Préparer l'échantillon pour essai conformément à la Norme internationale spécifique du produit concerné.

## 9 Mode opératoire

### 9.1 Prise d'essai, suspension mère et dilutions

Suivre les spécifications de l'ISO 6887 ou la Norme internationale spécifique appropriée au produit concerné.

### 9.2 Ensemencement et incubation

**9.2.1** Prendre deux boîtes de Petri stériles (6.5). Au moyen d'une pipette stérile (6.6), transférer, dans chaque boîte, 1 ml d'échantillon pour essai si le produit est liquide, ou 1 ml de la suspension mère dans le cas d'autres produits (dilution à  $10^{-1}$ ). Si des boîtes sont préparées à partir de plus d'une dilution, le nombre de boîtes par dilution peut être réduit à une boîte (voir l'ISO 7218).

**9.2.2** Prendre une autre boîte de Petri stérile (6.5). Utiliser une autre pipette stérile (6.6) pour déposer 1 ml de la dilution à  $10^{-1}$  (produit liquide) ou 1 ml de la dilution à  $10^{-2}$  (autres produits).

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

**9.2.4** S'il y a lieu et si possible, sélectionner uniquement les étapes de dilutions critiques (au moins deux dilutions décimales successives) afin d'ensemencer des boîtes de Petri sur lesquelles pourront être dénombrées entre 10 et 300 colonies par boîte.

**9.2.5** Verser, dans chaque boîte de Petri, environ 12 ml à 15 ml de gélose pour dénombrement (5.3) à une température comprise entre 44 °C et 47 °C. La durée entre la fin de la préparation de la suspension mère (ou de la dilution à  $10^{-1}$  dans le cas d'un produit liquide) et le moment où le milieu (5.3) est versé dans les boîtes 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 horizontale et fraîche.

**9.2.7** Après solidification complète, et uniquement dans le cas où le produit à examiner est suspecté de contenir des micro-organismes dont les colonies envahissent la surface du milieu, verser environ 4 ml du milieu pour seconde couche (5.4) ou de la gélose pour dénombrement (5.3) à une température comprise entre 44 °C et 47 °C en surface du milieuensemencé. Laisser se solidifier comme spécifié en 9.2.6.

**9.2.8** Retourner les boîtes ainsi préparées et les placer dans l'étuve (6.2) réglée à  $(30 \pm 1)$  °C, conformément à l'ISO 7218. Incuber pendant  $(72 \pm 3)$  h.

### 9.3 Dénombrement des colonies

**9.3.1** Après la période d'incubation spécifiée (voir 9.2.8), choisir les boîtes gélosées comportant, si possible, moins de 300 colonies. Compter toutes les colonies sur les boîtes, à l'aide d'un appareil de comptage (6.7), si nécessaire. Examiner les boîtes sous une lumière diffuse. Il est important d'inclure dans le comptage les colonies de la taille d'une tête d'épingle; toutefois il est indispensable que l'opérateur évite de confondre les particules non dissoutes ou les matières présentes sous forme de précipité avec ces colonies en tête d'épingle. Examiner avec attention les éléments douteux, en utilisant un grossissement plus fort si nécessaire, afin de distinguer les colonies des particules étrangères.

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