

---

---

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

Partie 2:

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

ISO 4833-2:2013  
<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/598d43a0-a267-47cb-8989-3ed47b1a751b/iso-4833-2-2013>

*Microbiology of the food chain — Horizontal method for the  
enumeration of microorganisms —*

*Part 2: Colony count at 30 °C by the surface plating technique*



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

ISO 4833-2:2013

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/598d43a0-a267-47cb-8989-3ed47b1a751b/iso-4833-2-2013>



**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

|  |           |
|--|-----------|
| Avant-propos.....  | iv        |
| <b>1</b> <b>Domaine d'application</b> .....  | <b>1</b>  |
| <b>2</b> <b>Références normatives</b> .....  | <b>1</b>  |
| <b>3</b> <b>Termes et définitions</b> .....  | <b>2</b>  |
| <b>4</b> <b>Principe</b> .....   | <b>2</b>  |
| <b>5</b> <b>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).....  | 3         |
| <b>6</b> <b>Appareillage</b> .....   | <b>4</b>  |
| <b>7</b> <b>Échantillonnage</b> .....  | <b>4</b>  |
| <b>8</b> <b>Préparation de l'échantillon pour essai</b> .....  | <b>5</b>  |
| <b>9</b> <b>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</b> <b>Expression des résultats</b> .....  | <b>6</b>  |
| <b>11</b> <b>Rapport d'essai</b> .....   | <b>6</b>  |
| <b>Annexe A (normative) Comptage des colonies en surface au moyen d'un dispositif d'ensemencement en spirale</b> ..... | <b>7</b>  |
| <b>Bibliographie</b> .....   | <b>13</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 4833-1, 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 2: Comptage des colonies à 30 °C par la technique d'ensemencement en surface

### 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 à la surface d'un milieu solide après incubation aérobie à 30 °C. La méthode est applicable:

- a) aux produits destinés à la consommation humaine ou 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 contenant des organismes sensibles à la chaleur susceptibles de former une partie significative de l'ensemble de la flore (par exemple des organismes psychrotrophes présents dans des aliments réfrigérés et congelés, des aliments secs, d'autres aliments pouvant contenir des organismes sensibles à la chaleur); <https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/598d43a0-a267-47cb-8989-7c45767571b1/iso-4833-2-2013>
- 2) aux produits contenant des bactéries aérobies susceptibles de former une partie significative de l'ensemble de la flore (par exemple *Pseudomonas* spp.);
- 3) aux produits contenant de petites particules qu'il peut se révéler difficile de distinguer des colonies dans une boîte ensemencée en profondeur;
- 4) aux produits dont la couleur intense empêche la reconnaissance des colonies dans une boîte ensemencée en profondeur;
- 5) aux produits pour lesquels il est nécessaire de faire la différence entre les différents types de colonies dans le cadre de l'évaluation de la qualité des aliments.

En plus de la technique d'ensemencement en surface manuelle, la présente partie de l'ISO 4833 spécifie également l'utilisation d'un dispositif d'ensemencement en spirale, méthode rapide de dénombrement des colonies en surface ([Annexe A](#)).

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 décrite dans la présente partie de l'ISO 4833 peut donner des résultats différents de ceux obtenus avec la méthode décrite dans l'ISO 4833-1.

### 2 Références normatives

Les documents ci-après, dans leur intégralité ou non, sont des références normatives indispensables à 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 — 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 ou une quantité déterminée de suspension mère dans le cas d'autres produits, estensemencée à la surface d'un milieu de culture gélosé solide contenu dans des boîtes de Petri.

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 dans des 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.

### 5 Milieux de culture et diluants

#### 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 examen.

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

#### 5.3.1 Composition

|  |            |
|--|------------|
| Digestat enzymatique de tissus d'animaux                         | 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 de l'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 (6.5), si nécessaire, de sorte qu'après stérilisation, il soit de  $7,0 \pm 0,2$  à 25 °C.

Répartir le milieu dans des fioles ou flacons (6.9) de capacité appropriée. Stériliser pendant 15 min à l'autoclave (6.1) à 121 °C.

Si le milieu est à utiliser extemporanément, le refroidir dans un bain d'eau (6.4) maintenu entre 47 °C et 50 °C, avant utilisation. Sinon, le laisser se solidifier dans une fiole ou dans un flacon. Avant utilisation, faire fondre complètement le milieu dans un bain d'eau bouillante, puis le refroidir dans un bain d'eau (6.4) maintenu entre 47 °C et 50 °C.

#### 5.3.3 Préparation des boîtes gélosées

Verser entre 15 ml et 20 ml de milieu dans des boîtes de Petri stériles (6.6) et laisser solidifier.

Les boîtes peuvent être stockées à  $(5 \pm 3)$  °C pendant 4 semaines au plus.

Immédiatement avant utilisation, il est recommandé de sécher les boîtes gélosées conformément à l'ISO 11133.

#### 5.3.4 Essai de performance du milieu de culture

##### 5.3.4.1 Généralités

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

### 5.3.4.2 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]<br><i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>spizizenii</i> WDCM 00003 <sup>a</sup><br><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 par le laboratoire utilisateur (au minimum). Voir la Référence [15] pour obtenir des informations sur les références des souches de collections et les coordonnées des centres concernés.

## 6 Appareillage

Le matériel à usage unique est acceptable au même titre que la verrerie et le matériel en plastique réutilisables, si leurs 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** ou **armoire de séchage**, ventilée par convection, pour sécher les boîtes, pouvant être maintenue entre 37 °C et 55 °C, ou **hotte à flux d'air laminaire**.

**6.3 Étuve**, pouvant être maintenue à (30 ± 1) °C.

**6.4 Bains d'eau**, l'un pouvant maintenir une température comprise entre 47 °C et 50 °C et l'autre pouvant maintenir l'eau au point d'ébullition.

**6.5 pH-mètre**, d'une précision de ± 0,1 unité pH à 25 °C.

**6.6 Boîtes de Petri**, en verre ou en plastique, de 90 mm à 100 mm, ou 140 mm de diamètre.

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

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

**6.9 Fioles** ou **flacons**, de capacité appropriée pour la préparation, la stérilisation et, si nécessaire, le stockage des milieux de culture.

**6.10 Spatules**, en verre, en plastique ou en métal, stériles, servant à étaler l'inoculum sur le milieu de culture.

## 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 traitant 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** Au moyen d'une pipette stérile (6.7), transférer 0,1 ml de l'échantillon pour essai si le produit est liquide, ou de la suspension mère dans le cas d'autres produits, au centre de deux boîtes de milieu gélosé (5.3). 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).

Si, pour certains produits, il est souhaitable de dénombrer de faibles quantités d'organismes, les limites de détection peuvent être augmentées d'un facteur de 10 en ensemençant 1,0 ml de l'échantillon pour essai s'il est liquide, ou 1,0 ml de la suspension mère pour d'autres produits, soit à la surface d'une grande boîte gélosée (140 mm), soit à la surface de trois petites boîtes gélosées (90 mm). Dans les deux cas, préparer des doubles en utilisant deux grandes boîtes ou six petites.

**9.2.2** Prendre une autre boîte gélosée (5.3). Utiliser une autre pipette stérile (6.7) pour déposer 0,1 ml de la dilution à  $10^{-1}$  (produits liquides) ou 0,1 ml de la dilution à  $10^{-2}$  (autres produits).

**9.2.3** Si nécessaire, répéter le mode opératoire avec d'autres dilutions décimales, en utilisant une nouvelle pipette stérile pour chaque dilution.

**9.2.4** Étaler uniformément et soigneusement l'inoculum aussi vite que possible à la surface de la gélose, sans toucher les parois de la boîte avec la spatule (6.10). Il est possible d'utiliser la même spatule pour toutes les dilutions d'un échantillon en commençant par la dilution la plus élevée et en poursuivant dans l'ordre jusqu'à la dilution contenant la plus grande quantité de matériau d'essai.

Laisser les boîtes en place, pendant environ 15 min, à température ambiante, pour absorption de l'inoculum dans la gélose.

**9.2.5** Retourner les boîtes ainsi préparées et les placer dans l'étuve (6.3) réglée à 30 °C, conformément à l'ISO 7218. Incuber pendant  $(72 \pm 3)$  h.

NOTE Voir l'Annexe A pour l'ensemencement au moyen d'un dispositif d'ensemencement en spirale.

### 9.3 Dénombrement des colonies

**9.3.1** Après la période d'incubation spécifiée (voir 9.2.3), choisir les boîtes gélosées comportant, si possible, moins de 300 colonies. Compter toutes les colonies à l'aide de l'appareil de comptage (6.8), si nécessaire. 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 d'aliments avec les colonies en tête d'épingle.

**9.3.2** Les colonies envahissantes doivent être considérées comme une seule colonie. Si l'on s'attend à trouver des colonies envahissantes, examiner les boîtes après 24 h ou 48 h et marquer les colonies visibles. Si moins d'un quart de la boîte est envahi par de telles colonies, compter les colonies de la partie non envahie et calculer le nombre de colonies correspondant à la boîte entière. Si plus d'un quart de la boîte