

NORME
INTERNATIONALE

ISO
6610

Première édition
1992-02-01

**Lait et produits laitiers — Dénombrement des
unités formant colonie de micro-organismes —
Comptage des colonies à 30 °C**

iTeh STANDARD PREVIEW

*Milk and milk products — Enumeration of colony-forming units of
micro-organisms — Colony-count technique at 30 °C*

ISO 6610:1992

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/f38be91d-8186-4f96-950a-c1761ebfe227/iso-6610-1992>



Numéro de référence
ISO 6610:1992(F)

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 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.

La Norme internationale ISO 6610 a été élaborée par le comité technique ISO/TC 34, *Produits agricoles alimentaires*, sous-comité SC 5, *Lait et produits laitiers*, en collaboration avec la Fédération internationale de laiterie (FIL) et l'Association des chimistes analytiques officiels (AOAC) et sera également publiée par ces organisations.

L'annexe A de la présente Norme internationale est donnée uniquement à titre d'information.

© ISO 1992

Droits de reproduction réservés. 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'éditeur.

Organisation Internationale de normalisation
Case Postale 56 • CH-1211 Genève 20 • Suisse

Imprimé en Suisse

Lait et produits laitiers — Dénombrement des unités formant colonie de micro-organismes — Comptage des colonies à 30 °C

1 Domaine d'application

La présente Norme internationale prescrit une méthode de dénombrement des unités formant colonie (UFC) de micro-organismes par la technique de comptage des colonies à 30 °C.

La méthode est applicable aux produits suivants:

- lait, produits laitiers liquides,
- lait sec, poudre de lactosérum non acide, babeurre en poudre, lactose,
- caséine acide, caséine lactique, caséine-présure,
- caséinate et poudre de lactosérum acide,
- fromage fondu,
- beurre,
- produits laitiers congelés (y compris les glaces de consommation),
- flans, desserts et crème.

2 Références normatives

Les normes suivantes contiennent des dispositions qui, par suite de la référence qui en est faite, constituent des dispositions valables pour la présente Norme internationale. Au moment de la publication, les éditions indiquées étaient en vigueur. Toute norme est sujette à révision et les parties prenantes des accords fondés sur la présente Norme internationale sont invitées à rechercher la possibilité d'appliquer les éditions les plus récentes des normes indiquées ci-après. Les membres de la CEI et de l'ISO possèdent le registre des Normes internationales en vigueur à un moment donné.

ISO 7218:1985, *Microbiologie — Directives générales pour les examens microbiologiques.*

ISO 8261:1989, *Lait et produits laitiers — Préparation des échantillons pour essai et des dilutions en vue de l'examen microbiologique.*

3 Définition

Pour les besoins de la présente Norme internationale, la définition suivante s'applique.

3.1 micro-organismes: Bactéries, levures et moisissures formant des colonies dénombrables dans les conditions spécifiées dans la présente Norme internationale.

4 Principe

4.1 Ensemencement en profondeur d'un milieu de culture sélectif défini, coulé dans des boîtes de Petri avec une quantité spécifiée de l'échantillon pour essai, si le produit à examiner est liquide, ou une quantité déterminée de la suspension mère, dans le cas d'autres produits.

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

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

4.3 Calcul du nombre d'unités formant colonie (UFC) de micro-organismes par gramme ou par millilitre d'échantillon à partir du nombre de colonies obtenues sur les boîtes choisies à des niveaux de dilution permettant d'obtenir un résultat significatif.

5 Diluants et milieu de culture

5.1 Généralités

Pour les pratiques courantes de laboratoire, voir ISO 7218.

5.2 Composants de base

Voir ISO 8261.

5.3 Diluants d'emploi général

Voir ISO 8261.

5.4 Diluants pour les besoins particuliers

Voir ISO 8261.

5.5 Répartition, stérilisation et conservation de diluant

Voir ISO 8261.

5.6 Milieu de culture

5.6.1 Composants

Tryptone	5,0 g
Extrait de levure	2,5 g
Glucose monohydrate (C ₆ H ₁₂ O ₆ ·H ₂ O)	1,0 g
Poudre de lait écrémé ¹⁾	1,0 g
Agar-agar	10 g à 15 g ²⁾
Eau	1 000 ml

1) La poudre de lait écrémé doit être exempte de substances inhibitrices. Ceci devrait être vérifié à l'aide d'essais comparatifs utilisant de la poudre de lait écrémé connue pour être exempte de telles substances.

2) Selon le pouvoir gélifiant de l'agar-agar.

5.6.2 Préparation

5.6.2.1 Préparation à partir du milieu complet déshydraté du commerce

Suivre les prescriptions du fabricant mais, dans tous les cas, ajouter de la poudre de lait écrémé, même si le fabricant considère qu'une telle adjonction n'est pas utile.

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

5.6.2.2 Préparation à partir des composants de base déshydratés

Dissoudre et disperser dans de l'eau dans l'ordre suivant, l'extrait de levure, la tryptone, le glucose et, en dernier lieu, la poudre de lait écrémé. Cette opération sera plus facile si l'eau est chauffée.

Ajouter ensuite l'agar-agar, porter à ébullition en agitant fréquemment jusqu'à ce que l'agar-agar soit complètement fondu ou chauffer à la vapeur pendant 30 min.

Filter sur papier filtre, si besoin est.

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

5.6.2.3 Répartition, stérilisation et conservation

Répartir le milieu (5.6) dans des tubes à essais (6.9) à raison de 12 ml à 15 ml par tube, ou dans des fioles ou flacons (6.9) par quantités de 100 ml ou 150 ml.

Stériliser à l'autoclave (6.1) réglé à 121 °C ± 1 °C pendant 15 min. Si le milieu est utilisé extemporanément, le refroidir à 45 °C au bain d'eau (6.5). Dans le cas contraire, avant de commencer l'examen microbiologique et, afin d'éviter toute attente au moment de couler la gélose, faire fondre complètement le milieu au bain d'eau bouillante (6.6) puis le refroidir à 45 °C au bain d'eau (6.5).

NOTES

1 Afin de contrôler la température de l'agar-agar, il est recommandé de placer un thermomètre dans un volume de solution d'agar-agar à 15 g/l contenue dans un autre récipient identique à celui utilisé pour le milieu. Cette solution de contrôle de la température devra subir les mêmes opérations de chauffage et de refroidissement que le milieu lui-même.

2 Le milieu ne doit pas être laissé sur le bain d'eau pendant plus de 3 h.

6 Appareillage et verrerie

ATTENTION — Le matériel destiné à entrer en contact avec l'échantillon pour essai, le diluant, les dilutions ou le milieu de culture doit être stérilisé conformément à l'ISO 8261:1989, 6.1.

NOTE 3 Le matériel à usage unique est acceptable au même titre que la verrerie réutilisable, si les spécifications sont similaires.

Matériel courant de laboratoire de microbiologie, matériel nécessaire à la préparation des échantillons pour essais et aux dilutions, comme spécifié dans l'ISO 8261, et notamment

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

Voir ISO 7218.

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

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

6.4 Pipettes graduées, bouchées avec du coton, étalonnées pour délivrer $1\text{ ml} \pm 0,02\text{ ml}$ ou $10\text{ ml} \pm 0,2\text{ ml}$.

6.5 Bain d'eau, réglable à $45\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$.

6.6 Bain d'eau, réglable à une température supérieure à 100 °C .

6.7 Appareil de comptage de colonies, comportant un système d'éclairage avec fond noir, équipé d'une loupe d'un grossissement de $\times 1,5$ et d'un compteur numérique mécanique ou électronique.

6.8 pH-mètre à température compensée, avec une précision de réglage de $\pm 0,1$ unité de pH à 25 °C .

6.9 Tubes à essais, d'environ 20 ml de capacité (ou fioles et flacons de capacité appropriée) et fioles et flacons, de 150 ml à 250 ml de capacité, pour la stérilisation et la conservation du milieu de culture.

NOTE 4 Des fioles ou des flacons munis de couvercles en métal non toxique peuvent être utilisés.

7 Échantillonnage

Il convient que l'échantillonnage soit effectué conformément à l'ISO 707.

8 Mode opératoire

NOTE 5 Afin d'améliorer la fidélité de la méthode, la préparation des dilutions devrait être soigneusement normalisée. Les facteurs influant sur la fidélité sont les suivants:

- type d'appareillage pour l'homogénéisation;
- temps d'homogénéisation;
- diluant;
- temps de décantation des grosses particules;
- temps d'agitation lors de la préparation des dilutions décimales.

ATTENTION — Prendre les précautions courantes d'asepsie. Ne pas effectuer les opérations décrites en 8.1 et 8.2 à la lumière directe du soleil.

8.1 Préparation de l'échantillon pour essai et de la suspension mère

Voir ISO 8261.

8.2 Dilutions décimales suivantes

Voir ISO 8261.

8.3 Durée des opérations

Voir ISO 8261:1989, 8.3.

8.4 Ensemencement et incubation

8.4.1 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.

8.4.2 Prendre deux autres boîtes de Petri stériles. À l'aide d'une nouvelle pipette stérile, transférer, dans chacune des boîtes, 1 ml de la dilution 10^{-1} (produit liquide) ou 1 ml de la dilution 10^{-2} (autres produits).

8.4.3 Si nécessaire, recommencer cette opération avec les dilutions décimales suivantes.

8.4.4 Couler dans chaque boîte de Petri, 12 ml à 15 ml du milieu de culture (5.6) préalablement fondu et maintenu dans le bain d'eau (6.5), réglé à 45 °C .

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

8.4.6 Il ne doit pas s'écouler plus de 15 min entre la préparation de la première dilution et le mélange de l'inoculum avec le milieu de culture.

8.4.7 Préparer un nombre suffisant de boîtes témoins pour vérifier la stérilité.

8.4.8 Retourner les boîtes ainsi préparées et les placer à l'étuve (6.2), réglée à 30 °C pendant $72\text{ h} \pm 3\text{ h}$.

NOTE 6 Prendre toutes précautions utiles pour éviter le risque d'envahissement, par exemple

- en plaçant un couvercle sur les boîtes de culture après solidification, ou
- en ajoutant une goutte de glycérol sur le papier-filtre dans le couvercle de la boîte.

8.4.9 Ne pas empiler plus de six boîtes. Les piles de boîtes ne doivent pas se toucher, ni être en contact avec les parois ou la partie supérieure de l'étuve.

8.5 Interprétation

8.5.1 Compter les colonies dans chaque boîte (voir 9.1) à l'aide de l'appareil de comptage des colonies (6.7).

Examiner les boîtes à la lumière tamisée. Il est important que les colonies de la taille d'une pointe d'épingle soient comptabilisées et il faut éviter de confondre des particules d'échantillon non dissoutes ou des matières précipitées dans les boîtes avec des colonies de la taille d'une pointe d'épingle. En cas de doute, les examiner avec attention, à l'aide d'une loupe à plus fort grossissement si nécessaire, afin de distinguer les colonies des matières étrangères.

8.5.2 Les colonies envahissantes doivent être considérées comme des colonies uniques. Si moins d'un quart de la surface est recouvert par des colonies envahissantes, compter les colonies sur la partie non affectée de la boîte et calculer le nombre correspondant pour la boîte entière. Si plus d'un quart de la surface est recouvert par des colonies envahissantes, rejeter le dénombrement.

9 Expression des résultats

9.1 Utiliser les dénombrements à partir des boîtes contenant au moins 10 et 300 colonies au plus.

Calculer le nombre *N* d'UFC de micro-organismes par gramme ou par millilitre de produit, à l'aide de la formule suivante:

$$N = \frac{\sum C}{(n_1 + 0,1n_2)d}$$

où

- $\sum C$ est la somme des colonies comptées dans toutes les boîtes retenues;
- n_1 est le nombre de boîtes retenues où l'on compte entre 10 et 300 colonies à la première dilution;
- n_2 est le nombre de boîtes retenues où l'on compte entre 10 et 300 colonies à la deuxième dilution;
- d est le facteur de dilution correspondant à la première dilution.

NOTE 7 S'il y a plus de deux dilutions retenues, donnant pour résultat de 10 à 300 colonies, la formule doit être modifiée pour prendre en compte la dilution suivante.

Pour trois dilutions, la formule devient

$$N = \frac{\sum C}{(n_1 + 0,1n_2 + 0,01n_3)d}$$

où n_3 est le nombre de boîtes retenues où l'on compte entre 10 et 300 colonies.

Arrondir le résultat obtenu à deux chiffres significatifs.

Lorsque le nombre à arrondir est 5 sans autres chiffres significatifs, arrondir de manière que le chiffre placé immédiatement à gauche soit pair. Par exemple, 28 500 est arrondi à 28 000; 11 500 est arrondi à 12 000.

Prendre comme résultat le nombre d'unités formant colonies (UFC) de micro-organismes par millilitre ou par gramme de produit, exprimé par un nombre compris entre 1,0 et 9,9 multiplié par 10^x , où x est la puissance appropriée de 10.

EXEMPLE

Un dénombrement de micro-organismes à 30 °C a donné les résultats suivants (deux boîtes de Petri par dilution ont été incubées):

- à la première dilution retenue (10^{-2}): 168 et 215 colonies,
- à la seconde dilution retenue (10^{-3}): 14 et 25 colonies

$$N = \frac{\sum C}{(n_1 + 0,1n_2)d} = \frac{168 + 215 + 14 + 25}{[2 + (0,1 \times 2)]10^{-2}} = \frac{422}{0,022} = 19\ 182$$

En arrondissant le résultat comme spécifié ci-dessus, on obtient 19 000 ou $1,9 \times 10^4$ UFC de micro-organismes par gramme ou millilitre de produit.

9.2 Si les deux boîtes correspondant à l'échantillon pour essais (produits liquides) ou à la suspension mère (autres produits) contiennent moins de 10 colonies, reporter les résultats comme suit:

- moins de 10 UFC de micro-organismes par millilitre (produits liquides)
- moins de $10 \times 1/d$ UFC de micro-organismes par gramme (autres produits), où d est le facteur de dilution correspondant à la première dilution.

9.3 S'il n'y a que des dénombrements supérieurs à 300, calculer un nombre estimé à partir des boîtes ayant un nombre de colonies proche de 300 et le multiplier par l'inverse de la valeur correspondant à la dilution la plus élevée. Exprimer ce résultat en tant que «nombre estimé d'unités formant colonie de micro-organismes par gramme ou par millilitre».

10 Répétabilité

La différence absolue entre deux résultats d'essai individuels, obtenus à l'aide de la même méthode, sur un matériau identique soumis à l'essai dans le même laboratoire par le même opérateur utilisant le même appareillage dans un court intervalle de temps, ne doit pas excéder 30 % du résultat le plus bas.

NOTES

8 Si les conditions de répétabilité ne sont pas remplies dans 5 % des cas ou plus, il est souhaitable de rechercher les sources d'erreurs possibles.

9 Voir, dans l'ISO 5725, la définition de la répétabilité.

11 Rapport d'essai

Le rapport d'essai doit indiquer la méthode utilisée, le résultat obtenu et la manière dont il est exprimé. Il doit, en outre, mentionner tous les détails opératoires non prévus dans la présente Norme internationale, ou facultatifs, ainsi que les incidents éventuels susceptibles d'avoir agi sur les résultats.

Le rapport d'essai doit donner tous les renseignements nécessaires à l'identification complète de l'échantillon.

iTeh STANDARD PREVIEW (standards.iteh.ai)

[ISO 6610:1992](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/f38be91d-8186-4f96-950a-c1761ebfe227/iso-6610-1992)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/f38be91d-8186-4f96-950a-c1761ebfe227/iso-6610-1992>

Annexe A
(informative)

Bibliographie

- [1] ISO 707:1985, *Lait et produits laitiers — Méthodes d'échantillonnage*.
- [2] ISO 5725:1986, *Fidélité des méthodes d'essai — Détermination de la répétabilité et de la reproductibilité d'une méthode d'essai normalisée par essais interlaboratoires*.

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

[ISO 6610:1992](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/f38be91d-8186-4f96-950a-c1761ebf227/iso-6610-1992)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/f38be91d-8186-4f96-950a-c1761ebf227/iso-6610-1992>

Page blanche

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO 6610:1992

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/f38be91d-8186-4f96-950a-c1761ebfe227/iso-6610-1992>