

# NORME INTERNATIONALE

**ISO**  
**6611**

Première édition  
1992-02-01

---

---

## Lait et produits laitiers — Dénombrement des unités formant colonie de levures et/ou moisissures — Comptage des colonies à 25 °C

### iTeh STANDARD PREVIEW

*Milk and milk products — Enumeration of colony-forming units of yeasts  
and/or moulds — Colony count technique at 25 °C*

[ISO 6611:1992](https://standards.iso.org/iso/6611-1992)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/d206f6a5-04ac-4c8e-8a65-5e365ebfa106/iso-6611-1992>



Numéro de référence  
ISO 6611:1992(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 6611 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 levures et/ou moisissures — Comptage des colonies à 25 °C

## 1 Domaine d'application

La présente Norme internationale prescrit une méthode de dénombrement des unités formant colonies (UFC) de levures et/ou moisissures dans le lait et les produits laitiers par la technique de comptage des colonies à 25 °C.

La méthode est applicable aux produits suivants:

- lait, produits laitiers liquides,
- lait sec, poudre de lactosérum non acide, beurre en poudre, lactose,
- fromages,
- caséine acide, caséine lactique, caséine-présure,
- caséinates, poudre de lactosérum acide,
- beurre,
- produits laitiers congelés (y compris les glaces de consommation),
- flans, desserts, laits fermentés, crème.

NOTE 1 La méthode n'est pas applicable à la détermination d'un très grand nombre de levures thermolabiles (dans le fromage frais). Dans ce cas, il est préférable d'utiliser la technique d'ensemencement en surface.

## 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 levures et moisissures:** Micro-organismes qui, à 25 °C, forment des colonies dans un milieu sélectif selon la méthode spécifiée 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 25 °C pendant 5 jours.

**4.3** Calcul du nombre d'unités formant colonie (UFC) et/ou moisissures par gramme ou par millilitre d'échantillon en se basant sur le nombre de colonies obtenues sur des 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 des diluants

Voir ISO 8261.

### 5.6 Milieu à l'extrait de levure, dextrose, oxytétracycline et agar-agar

#### 5.6.1 Milieu de base

##### 5.6.1.1 Composants

Extrait de levure en poudre	5,0 g
Glucose (C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub> )	20,0 g
Agar-agar	10 g à 15 g <sup>1)</sup>
Eau	900 ml

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

##### 5.6.1.2 Préparation

Dissoudre les composants du milieu de base (5.6) ou du milieu déshydraté en chauffant, si nécessaire.

Si nécessaire, ajuster le pH de sorte qu'après stérilisation, il soit de 6,6 à 25 °C.

Stériliser à l'autoclave (6.1) à 121 °C ± 0,1 °C pendant 15 min.

### 5.6.2 Solution à l'oxytétracycline

#### 5.6.2.1 Composants

Chlorhydrate d'oxytétracycline (C <sub>22</sub> H <sub>30</sub> N <sub>2</sub> O <sub>11</sub> )·HCl	50 mg
Eau	50 mg

#### 5.6.2.2 Préparation

Dissoudre l'oxytétracycline dans l'eau. La solution doit être préparée juste avant l'emploi. Stériliser la solution par filtration.

### 5.6.3 Milieu complet

#### 5.6.3.1 Composants

Chlorhydrate d'oxytétracycline	10 ml
Milieu de base	90 ml

#### 5.6.3.2 Préparation

Refroidir le milieu de base stérilisé (5.6.1) à 45 °C. Juste avant l'emploi, amener la solution d'oxytétracycline (5.6.2) à 45 °C et ajouter 10 ml de cette solution aseptiquement à 90 ml du milieu de base.

### 5.7 Gélose à l'extrait de levure, au glucose et au chloramphénicol

#### 5.7.1 Composants

Extrait de levure	5,0 g
Glucose (C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub> )	20,0 g
Chloramphénicol (C <sub>11</sub> H <sub>12</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub> )	0,1 g <sup>1)</sup>
Agar-agar	12 g à 15 g <sup>2)</sup>
Eau	1 000 ml

1) En vue d'obtenir une concentration finale de 100 µg/ml du milieu.  
2) Selon le pouvoir gélifiant de l'agar-agar.

#### 5.7.2 Préparation

Dissoudre les composants dans l'eau en chauffant, si nécessaire.

Si nécessaire, ajuster le pH de sorte qu'après stérilisation, il soit de 6,6 à 25 °C.

Répartir le milieu gélosé dans des récipients de capacité appropriée (6.8).

Stériliser à l'autoclave (6.1) à  $121\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$  pendant 15 min.

## 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 ISO 8261:1989, 6.1.

NOTE 2 Le matériel à usage unique est acceptable au même titre que la verrerie réutilisable, si ses spécifications sont adéquates.

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 $25\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$

### 6.3 Boîtes de Petri, 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 $10\text{ ml} \pm 0,2\text{ ml}$ ou $11\text{ ml} \pm 0,2\text{ ml}$ .

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

### 6.6 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.

### 6.7 ph-mètre à température compensée, précis à $\pm 0,1$ unité de pH à $25\text{ °C}$ .

### 6.8 Fioles ou flacons

NOTE 3 Des fioles ou flacons de culture munis de couvercle à vis en métal non toxique peuvent être utilisés.

## 7 Échantillonnage

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

NOTE 4 Dans les fromages affinés possédant une croûte de levure ou de moisissures, il peut s'avérer souhaitable d'exclure la croûte de l'échantillon pour l'analyse. Dans ce cas précis, la croûte peut être enlevée à

l'aide d'un scalpel ou d'un couteau stérile, avant de procéder à l'échantillonnage.

## 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 chaque boîte, 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, environ 15 ml de gélose à l'oxytétracycline (5.6) ou de gélose au chloramphénicol (5.7) à  $45\text{ °C}$ , préalablement fondue et maintenue dans le bain d'eau (6.5).

**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.

Préparer également une boîte témoin avec 15 ml du milieu afin de contrôler sa stérilité.

**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 25 °C pendant 4 jours.

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 et la partie supérieure de l'étuve.

## 8.5 Interprétation

**8.5.1** Compter les colonies dans chaque boîte, à l'exception de la colonie bactérienne éventuelle qui aurait pu se développer. Si nécessaire, distinguer les colonies de levures et les colonies de moisissures en se basant sur les caractéristiques morphologiques. Voir 8.6.

**8.5.2** Ne retenir que les boîtes contenant au moins 10 et 150 colonies au plus. Si des parties de boîtes sont envahies par des moisissures ou, s'il est difficile de compter des colonies bien isolées, compter les colonies dans des boîtes à la dilution suivante plus élevée, même si leur nombre risque d'être inférieur à 10. Dans ce dernier cas, procéder comme en 9.2.

## 8.6 Confirmation

L'identité de colonies de la taille d'une tête d'épingle ou douteuse doit être recherchée par un examen microscopique.

Si nécessaire, confirmer au moins  $\sqrt{n}$  des colonies à l'examen microscopique, où  $n$  représente le nombre des colonies dénombrées.

## 9 Expression des résultats

**9.1** Utiliser les dénombrements à partir des boîtes contenant au moins 10 et 150 colonies au plus.

Calculer le nombre  $N$  d'UFC de levures et/ou moisissures 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 les boîtes retenues;

$n_1$  est le nombre de boîtes retenues où l'on compte entre 10 et 150 colonies à la première dilution;

$n_2$  est le nombre de boîtes retenues où l'on compte entre 10 et 150 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 150 colonies, la formule peut 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 150 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, et 11 500 est arrondi à 12 500.

Prendre comme résultat le nombre d'UFC de levures et/ou de moisissures 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 d'UFC de levures et/ou de moisissures a donné les résultats suivants (deux boîtes de Petri par dilution ont été incubées);

- à la première dilution retenue ( $10^{-2}$ ): 83 et 97 colonies;

- à la seconde dilution retenue ( $10^{-3}$ ): 33 et 28 colonies;

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

$$= \frac{83 + 97 + 33 + 28}{[2 + (0,1 \times 2)]10^{-2}} = \frac{241}{0,022} = 10\,954$$

En arrondissant le résultat comme spécifié en 9.1 on obtient 11000 ou  $1,1 \times 10^4$  UFC de levures et/ou de moisissures par gramme ou par millilitre de produit.

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

- moins de 10 UFC de levures et/ou de moisissures par millilitre (produits liquides)
- moins de  $10 \times 1/d$  UFC de levures et/ou moisissures 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 150, calculer un nombre estimé à partir des boîtes ayant un nombre de colonies proche de 150 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 levures et/ou de moisissures 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 au 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 et les résultats obtenus et la manière dont ils sont exprimés. Il doit, en outre, mentionner tous les détails opératoires non prévus dans la présente Norme internationale, ou facultatifs, ainsi que les incidents susceptibles d'avoir agi sur les résultats.

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

**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 6611:1992](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/d206f6a5-04ac-4c8e-8a65-5e365ebfa106/iso-6611-1992)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/d206f6a5-04ac-4c8e-8a65-5e365ebfa106/iso-6611-1992>

Page blanche

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

ISO 6611:1992

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/d206f6a5-04ac-4c8e-8a65-5e365ebfa106/iso-6611-1992>