

NORME
INTERNATIONALE

ISO
6730

Première édition
1992-02-01

Lait — Dénombrement des unités formant
colonie de micro-organismes psychrotrophes —
Technique par comptage des colonies à 6,5 °C

iTeh STANDARD PREVIEW

(standards.iteh.ai)
*Milk — Enumeration of colony-forming units of psychrotrophic
micro-organisms — Colony-count technique at 6,5 °C*

[ISO 6730:1992](https://standards.iteh.ai)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/ef3015d9-453f-4ba8-b7b5-72f4dbb0c608/iso-6730-1992>



Numéro de référence
ISO 6730:1992(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 6730 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 (AOAC) et sera également publiée par ces organisations.

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

Lait — Dénombrement des unités formant colonie de micro-organismes psychrotrophes — Technique par comptage des colonies à 6,5 °C

1 Domaine d'application

La présente Norme internationale prescrit une méthode de dénombrement des unités formant colonie de micro-organismes psychrotrophes dans le lait cru et le lait traité thermiquement par la technique de comptage de colonies à 6,5 °C.

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 psychrotrophes: 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 défini, coulé dans des boîtes de Petri avec une quantité spécifiée d'échantillon pour essai. Ensemencement d'autres boîtes, dans les mêmes conditions, en utilisant des dilutions décimales de l'échantillon pour essai.

4.2 Incubation des boîtes en aérobiose à 6,5 °C pendant 10 jours.

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

5 Diluant et milieu de culture

5.1 Généralités

Pour les pratiques courantes de laboratoire, voir ISO 7218.

5.2 Composant de base

Voir ISO 8261.

5.3 Diluants d'emploi général

Voir ISO 8261.

5.4 Répartition, stérilisation et conservation

Voir ISO 8261.

5.5 Milieu de culture

5.5.1 Composants

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

1) La poudre de lait écrémé doit être exempte de substances inhibitrices. Ceci devrait être vérifié par des 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.

5.5.2 Préparation

5.5.2.1 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 cette adjonction comme superflue.

Si nécessaire, ajuster le pH de façon qu'après stérilisation, il soit de 7,0 à 25 °C.

5.5.2.2 Préparation à partir des composants de base déshydratés

Dissoudre et disperser dans l'eau, dans l'ordre suivant, l'extrait de levure, la tryptone, le glucose et, en dernier lieu, la poudre de lait écrémé.

NOTE 1 Le chauffage de l'eau facilite cette opération.

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

NOTE 2 Si la solution n'est pas claire, filtrer sur papier filtre.

Si nécessaire, ajuster le pH de façon qu'après stérilisation, il soit de 7,0 à 25 °C.

5.5.2.3 Répartition, stérilisation et conservation

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

Stériliser à l'autoclave (6.1) à 121 °C ± 1 °C pendant 15 min. Si le milieu doit être utilisé immédiatement, 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). (Voir également 8.4.4.)

Conserver le milieu à l'obscurité à une température située entre 0 °C et +5 °C pendant une durée maximale de 3 mois après la préparation.

NOTE 3 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 contenu 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.

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 4 La 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 6,5 °C ± 0,5 °C.

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

6.4 Pipettes graduées, bouchées avec du coton, étalonnées pour délivrer 1 ml ± 0,02 ml ou 10 ml ± 0,2 ml ou 11 ml ± 0,2 ml.

6.5 Bain d'eau, réglable à 45 °C ± 1 °C.

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

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

6.8 pH-mètre à compensation de température, précis à $\pm 0,1$ unité de pH à 25 °C.

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

NOTE 5 Des flacons ou des fioles munis de bouchons métalliques à vis non toxiques peuvent être utilisés.

7 Échantillonnage

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

8 Mode opératoire

NOTE 6 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 précaution 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 dilution primaire

Voir ISO 8261:1989, 8.1.1.

8.2 Dilutions décimales suivantes

Voir ISO 8261:1989, 8.2.

NOTE 7 D'autres séries de dilutions peuvent être utilisées, par exemple, en commençant par une dilution primaire de 10 ml d'échantillon pour essai dans 90 ml de diluant, ou 11 ml d'échantillon pour essai dans 99 ml de diluant. La précision et la fidélité de la méthode sont supérieures lorsque de plus grandes quantités d'échantillon et de diluant sont utilisées.

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). Transférer dans chacune des boîtes, 1 ml de l'échantillon pour essai à l'aide d'une pipette stérile (6.4).

8.4.2 Prendre deux autres boîtes de Petri stériles. Transférer dans chacune des boîtes, 1 ml de la dilution 10^{-1} de l'échantillon pour essai à l'aide d'une nouvelle pipette stérile.

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

8.4.4 Contrôler que la température du milieu de culture (5.5) ne dépasse pas 46 °C.

NOTE 8 Si le milieu de culture est à une température supérieure à 46 °C, cela peut endommager ou tuer la microflore psychrotrophe de l'échantillon. Si l'on suspecte des dommages, pratiquer un ensemencement en surface à basse température.

Verser 12 ml à 15 ml du milieu de culture (5.5) dans chaque boîte de Petri.

NOTE 9 Si le volume de 15 ml est insuffisant pour obtenir une répartition homogène des micro-organismes, il est conseillé d'utiliser un volume de 20 ml.

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

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 dans l'étuve (6.2) à 6,5 °C pendant 10 jours.

NOTE 10 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 sur 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 millilitre de lait 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 11 S'il y a plus de deux dilutions retenues donnant pour résultat de 10 à 300 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 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 psychrotrophes par millilitre de lait, 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'unités formant colonie de micro-organismes 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

iTeh STANDARD PREVIEW

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

ISO 6730:1992
$$= \frac{168 + 215 + 14 + 25}{[2 + (0,1 \times 2)] \times 10^{-2}} = \frac{422}{0,022} = 19\ 182$$

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

9.2 Si les deux boîtes correspondant à l'échantillon pour essai contiennent moins de 10 colonies, reporter le résultat comme «moins de $10 \times 1/d$ UFC de micro-organismes psychrotrophes par millilitre de lait», où d est le facteur de dilution correspondant à la dilution la plus faible.

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'UFC de micro-organismes psychrotrophes par millilitre de lait».

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

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

13 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 6730:1992](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/ef3015d9-453f-4ba8-b7b5-72f4dbb0c608/iso-6730-1992)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/ef3015d9-453f-4ba8-b7b5-72f4dbb0c608/iso-6730-1992>

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 6730:1992](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/ef3015d9-453f-4ba8-b7b5-72f4dbb0c608/iso-6730-1992)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/ef3015d9-453f-4ba8-b7b5-72f4dbb0c608/iso-6730-1992>

Page blanche

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO 6730:1992

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/ef3015d9-453f-4ba8-b7b5-72f4dbb0c608/iso-6730-1992>