
Norme internationale



6887

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION • МЕЖДУНАРОДНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ ПО СТАНДАРТИЗАЦИИ • ORGANISATION INTERNATIONALE DE NORMALISATION

Microbiologie — Directives générales pour la préparation des dilutions en vue de l'examen microbiologique

Microbiology — General guidance for the preparation of dilutions for microbiological examination

Première édition — 1983-06-01

ITeH STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

[ISO 6887:1983](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/4e6fca35-7803-419a-b68b-26e7b3e72442/iso-6887-1983)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/4e6fca35-7803-419a-b68b-26e7b3e72442/iso-6887-1983>

CDU 579.67 : 57.082.52

Réf. n° : ISO 6887-1983 (F)

Descripteurs : produit agricole, produit alimentaire, produit d'alimentation animale, analyse microbiologique, préparation de spécimen d'essai.

Prix basé sur 4 pages

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 confiée aux comités techniques de l'ISO. Chaque comité membre intéressé par une étude a le droit de faire partie du comité technique correspondant. Les organisations internationales, gouvernementales et non gouvernementales, en liaison avec l'ISO, participent également aux travaux.

Les projets de Normes internationales adoptés par les comités techniques sont soumis aux comités membres pour approbation, avant leur acceptation comme Normes internationales par le Conseil de l'ISO.

La Norme internationale ISO 6887 a été élaborée par le comité technique ISO/TC 34, *Produits agricoles alimentaires*, et a été soumise aux comités membres en novembre 1981.

Les comités membres des pays suivants l'ont approuvée: [ISO 6887:1983](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/4e6fca35-7803-419a-b68b-26e7b3e7442/iso-6887-1983)

Afrique du Sud, Rép. d'	Iraq	Royaume-Uni
Allemagne, R.F.	Israël	Sri Lanka
Australie	Italie	Tanzanie
Brésil	Mexique	Tchécoslovaquie
Canada	Nouvelle-Zélande	Thaïlande
Chili	Pays-Bas	URSS
Égypte, Rép. arabe d'	Philippines	Venezuela
Éthiopie	Pologne	Yougoslavie
France	Portugal	
Inde	Roumanie	

Aucun comité membre ne l'a désapprouvée.

Microbiologie — Directives générales pour la préparation des dilutions en vue de l'examen microbiologique

0 Introduction

La présente Norme internationale se propose de fournir des directives générales pour la préparation des dilutions en vue de l'examen microbiologique de produits non concernés dans les Normes internationales existant actuellement et pour être étudiées par les organismes élaborant des méthodes d'essai microbiologiques de référence destinées à être appliquées à des produits alimentaires ou à des aliments pour animaux. En raison de la grande diversité des produits entrant dans ce domaine d'application, il est possible que ces directives, dans tous leurs détails, ne conviennent pas exactement à certains produits et que, pour certains autres produits, il puisse être nécessaire d'employer des méthodes différentes. Néanmoins, il est à espérer que, dans tous les cas, tous les efforts seront faits pour appliquer chaque fois qu'il sera possible les directives données et qu'on n'aura recours à des dérogations que si cela est absolument nécessaire pour des raisons techniques.

Lorsque la présente Norme internationale sera réexaminée, il sera tenu compte de tous les renseignements disponibles à ce moment-là, à savoir dans quelle mesure les directives auront été suivies et les raisons pour lesquelles il aura été nécessaire d'y déroger dans le cas de produits particuliers.

L'harmonisation des méthodes d'essai ne peut pas être immédiate et, pour certains groupes de produits, des Normes internationales et/ou des normes nationales existent peut-être déjà, qui ne concordent pas avec ces directives. Dans le cas où des Normes internationales existent déjà pour le produit à contrôler, elles devront être appliquées, mais il serait souhaitable que, lorsqu'elles viendront en révision, elles soient modifiées de façon à se conformer à la présente Norme internationale si bien que, finalement, les seules divergences restantes seront celles qui auront été nécessaires pour des raisons techniques bien établies.

1 Objet et domaine d'application

La présente Norme internationale donne des directives générales pour la préparation des dilutions en vue des examens microbiologiques, réalisés en aérobiose, des produits destinés à la consommation humaine ou à l'alimentation animale. (Actuellement, ces directives devraient être utilisées conjointement avec les méthodes décrites dans l'ISO 4831, l'ISO 4832, l'ISO 4833 et l'ISO 6579.)

La présente Norme internationale est applicable aux produits mentionnés, à condition de se conformer aux paragraphes appropriés du chapitre 9.

2 Références

ISO 4831, *Microbiologie — Directives générales pour le dénombrement des coliformes — Technique du nombre le plus probable après incubation à 30 °C.*

ISO 4832, *Microbiologie — Directives générales pour le dénombrement des coliformes — Méthode par comptage des colonies obtenues à 30 °C.*

ISO 4833, *Microbiologie — Directives générales pour le dénombrement des micro-organismes — Méthode par comptage des colonies obtenues à 30 °C.*

ISO 6579, *Microbiologie — Directives générales concernant les méthodes de recherche des Salmonella.*

3 Définitions

Dans le cadre de la présente Norme internationale, les définitions suivantes sont applicables:

3.1 suspension mère (première dilution): Suspension, solution ou émulsion obtenue après qu'une quantité pesée ou mesurée du produit à analyser (ou de l'échantillon pour essai préparé à partir de ce produit) a été mélangée, si nécessaire en utilisant un homogénéisateur et en observant des précautions appropriées (voir la note au chapitre 9), avec une quantité neuf fois égale de diluant (voir chapitre 5), en laissant se déposer les particules grossières, s'il y en a.

NOTE — Il peut être nécessaire dans certains cas, notamment pour les produits donnant une suspension mère 1 + 9 trop visqueuse ou trop épaisse, d'ajouter davantage de diluant. Il devra en être tenu compte dans la suite des opérations et/ou dans l'expression des résultats.

3.2 dilutions décimales suivantes: Suspensions ou solutions obtenues en mélangeant un volume déterminé de la suspension mère (3.1) avec un volume neuf fois égal de diluant (voir la note de 3.1), et en répétant cette opération sur chaque dilution ainsi préparée, jusqu'à obtention d'une gamme de dilutions décimales appropriée pour l'inoculation des milieux de culture.

3.3 norme spécifique: Norme internationale ou document de directive décrivant l'analyse d'un produit déterminé (ou d'un groupe de produits) en vue de la recherche ou du dénombrement d'un micro-organisme déterminé (ou d'un groupe de micro-organismes) et/ou décrivant les caractéristiques générales de l'échantillonnage et/ou la préparation des échantillons pour essai.

4 Principe

Préparation de la suspension mère (3.1), de façon à obtenir une répartition aussi uniforme que possible des micro-organismes contenus dans la prise d'essai.

Préparation, si nécessaire, de dilutions décimales (3.2) en vue de réduire le nombre de micro-organismes par unité de volume pour permettre, après incubation, d'observer leur développement (cas des tubes) ou d'effectuer le dénombrement des colonies (cas des boîtes).

Le nombre approprié de micro-organismes correspond, en général, à :

- pour la technique du nombre le plus probable avec 3 tubes : 1 micro-organisme dans 10 ml de la dilution décimale la plus élevée;
- pour la technique par comptage des colonies : 30 à 300 colonies (pour certains groupes comme les coliformes, 15 à 150 colonies).

5 Diluant

5.1 Composants de base

Pour améliorer la reproductibilité des résultats, il est recommandé d'utiliser, pour la préparation du diluant, des composants de base déshydratés ou une préparation complète déshydratée. Les instructions du fabricant doivent être suivies scrupuleusement.

Les produits chimiques doivent être de qualité analytique reconnue.

L'eau utilisée doit être de l'eau distillée avec un appareillage en verre, ou de l'eau déminéralisée. Elle doit être exempte de substances susceptibles d'inhiber la croissance des micro-organismes dans les conditions de l'essai. Cela doit être contrôlé périodiquement, en particulier dans le cas de l'eau déminéralisée.

5.2 Composition

À moins que des preuves irréfutables (par exemple données publiées ou essais comparatifs) témoignent de la supériorité d'autres diluants pour la préparation de produits particuliers, utiliser la composition suivante¹⁾ :

peptone	1,0 g
chlorure de sodium	8,5 g
eau	1 000 ml

5.3 Préparation

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

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

5.4 Répartition du diluant

Répartir le diluant (5.3) dans des tubes à essais (6.5) (pour les dilutions décimales) ou dans des fioles (6.4) (pour la suspension mère; cas des produits non liquides, voir 9.1.2) de capacités appropriées, en quantités telles qu'après stérilisation, chaque tube contienne 9,0 ml de diluant ou un multiple de 9,0 ml et chaque fiole contienne 90 ml de diluant ou un multiple de 90 ml (ou autres quantités requises). Boucher les tubes ou les fioles.

Stériliser à l'autoclave à 121 ± 1 °C durant 20 min.

Si le diluant n'est pas utilisé extemporanément, le conserver à l'obscurité entre 0 et 5 °C, pendant 1 mois au maximum, dans des conditions évitant toute modification de son volume ou de sa composition.

NOTE — Si l'on doit dénombrer plusieurs groupes de micro-organismes en utilisant des milieux de cultures différents, il peut être nécessaire de répartir toutes les dilutions (ou quelques-unes) en quantités supérieures à 9,0 ml. La dimension des tubes à essais et des fioles doit être prévue en conséquence.

6 Appareillage et verrerie

NOTE — Le matériel à usage unique est acceptable au même titre que la verrerie réutilisable, si ses spécifications sont convenables. La verrerie doit pouvoir résister à des stérilisations répétées et être chimiquement inerte.

Matériel courant de laboratoire de microbiologie, et notamment :

6.1 Appareils pour la stérilisation en chaleur sèche (four) ou en chaleur humide (autoclave) (autoclave autonome ou faisant partie d'un appareillage, pour préparer et répartir les milieux).

Le matériel destiné à entrer en contact avec le diluant, l'échantillon et les dilutions, sauf s'il est livré stérile (sacs en plastique, pipettes en plastique, etc.), doit être stérilisé par l'une des méthodes suivantes :

- au four, en le maintenant à une température de 170 à 175 °C durant au moins 1 h;
- à l'autoclave, en le maintenant à une température de 121 ± 1 °C durant au moins 20 min.

6.2 Appareillage pour l'homogénéisation (pour les produits non liquides, voir 9.1.2).

Un des appareils suivants doit être utilisé :

- un homogénéisateur rotatif, dont la fréquence de rotation est comprise entre 8 000 et 45 000 min⁻¹, avec des bols en verre ou en métal, munis de préférence de couvercles, résistant aux conditions de stérilisation;
- un homogénéisateur, de type péristaltique (stomacher), avec des sacs stériles en plastique.

1) Le paragraphe 7.2 de l'ISO 4831, l'ISO 4832 et l'ISO 4833 sera modifié en conséquence.

NOTE — Les bols et les sacs en plastique doivent avoir une capacité suffisante pour permettre de mélanger correctement l'échantillon avec la quantité appropriée de diluant. En général, le volume du récipient doit être égal à environ deux fois le volume de l'échantillon plus le diluant.

6.3 Agitateur, capable de mélanger 1 ou 2 ml de l'échantillon (cas des produits liquides) ou d'une dilution plus faible, dans un tube de dimensions suffisantes, avec 9 ou 18 ml de diluant, afin d'obtenir une suspension homogène, et dont le principe de fonctionnement est basé sur un mouvement de rotation excentré du contenu des tubes à essais (agitateur Vortex).

6.4 Fioles, de capacité suffisante pour contenir les 90 ml de diluant utilisés pour la suspension mère, ou des multiples de 90 ml (cas des produits non liquides, voir 9.1.2).

6.5 Tubes à essais (ou fioles), de capacité suffisante pour contenir, avec un espace suffisant pour permettre une agitation convenable, 10 ml (ou un multiple de 10 ml, si nécessaire) de l'échantillon s'il est liquide ou de la suspension mère (autre cas), ou des dilutions décimales suivantes.

6.6 Pipettes (bouchées avec du coton), de 1 ml de capacité nominale (ou si nécessaire 2 ml ; voir la note de 5.4) et ayant un orifice d'écoulement de 2 à 3 mm de diamètre.

6.7 Pipettes graduées (bouchées avec du coton), de grande capacité, par exemple 10 ou 20 ml.

6.8 pH-mètre, précis à $\pm 0,1$ unité de pH.

6.9 Balance, de portée suffisante, précise à 0,01 g près (cas des produits non liquides).

7 Échantillonnage

Effectuer l'échantillonnage conformément à la norme spécifique du produit concerné. S'il n'y a pas de norme spécifique disponible, il est recommandé que les parties concernées se mettent d'accord à ce sujet.

8 Préparation de l'échantillon pour l'essai.

Voir la norme spécifique du produit concerné. S'il n'y a pas de norme spécifique disponible, il est recommandé que les parties concernées se mettent d'accord à ce sujet.

9 Mode opératoire

NOTE — Pour un certain nombre de produits, il peut être nécessaire de prendre des précautions particulières lors de la préparation de la suspension mère, par exemple :

- utilisation de températures assez élevées pour la mise en suspension du cacao, de la gélatine, de la poudre de lait ;
- ajustement de la valeur du pH de l'échantillon ;

- reconstitution des produits déshydratés et revivification des micro-organismes endommagés au cours des divers traitements et du stockage du produit.

Ces précautions doivent être mentionnées dans la norme spécifique du produit concerné.

9.1 Prise d'essai et suspension mère (première dilution)

Utiliser le mode opératoire décrit en 9.1.1 dans les cas suivants :

- pour les échantillons liquides non visqueux (eau, lait, boissons sucrées, etc.) dans lesquels la répartition des micro-organismes est homogène ou facilement rendue homogène par des moyens mécaniques (agitation, etc.) ;
- pour la partie liquide d'un mélange hétérogène considérée comme suffisamment représentative de la totalité de l'échantillon (par exemple phase aqueuse des matières grasses d'origines animales ou végétales).

Dans les autres cas et en cas de doute, utiliser le mode opératoire décrit en 9.1.2.

Pour éviter d'endommager les micro-organismes par de brusques changements de température, la température du diluant pendant les opérations décrites ci-après doit être du même ordre que celle de l'échantillon pour essai (voir chapitre 8).

9.1.1 Échantillons liquides (pouvant être prélevés à la pipette)

Agiter manuellement l'échantillon pour essai (voir chapitre 8) en effectuant en 7 s 25 mouvements de haut en bas d'environ 30 cm d'amplitude ou en utilisant de préférence un moyen mécanique normalisé afin d'assurer une répartition uniforme des micro-organismes. Prélever 1 ml avec une pipette (6.6) et ajouter cette prise d'essai à 9 ml de diluant (5.4) en évitant tout contact entre la pipette et le diluant (voir la note de 5.4).

Mélanger soigneusement la prise d'essai et le diluant, soit par aspiration-refoulement, dix fois, avec une pipette différente, soit en utilisant un agitateur mécanique (6.3) durant 5 à 10 s. La fréquence de rotation de ce dernier doit être choisie de sorte que le liquide en tournoyant affleure à 2 ou 3 cm du bord du récipient.

NOTE — Lorsqu'on sait que, pour certains produits, des agglomérats de micro-organismes sont susceptibles d'être mieux dissociés par agitation mécanique que par l'emploi de la pipette, donnant ainsi des résultats significativement différents, il est nécessaire que la norme spécifique du produit concerné recommande seulement un de ces modes opératoires, de préférence celui qui préconise l'emploi de l'agitateur mécanique. Les conditions d'utilisation de l'agitateur doivent être spécifiées avec précision.

9.1.2 Autres échantillons

Dans un bol {cas de l'homogénéisateur rotatif [6.2a]} ou dans un sac en plastique {cas du stomacher [6.2b]}, peser, à 0,01 g près, une masse m (en général 10 g ou un multiple de 10 g) de l'échantillon pour essai (voir chapitre 8), suffisante pour que

tous les examens et toutes les dilutions successives prévus dans la norme spécifique du produit concerné puissent être exécutés.

Ajouter un volume, en millilitres, numériquement égal à $9 \times m$ de diluant (5.4) (voir la note de 3.1), à la température appropriée.

Faire fonctionner l'homogénéisateur rotatif pendant une durée telle que le nombre total de tours soit compris entre 15 000 et 20 000. Même avec l'homogénéisateur le plus lent, ce temps ne doit pas dépasser 2,5 min.

Faire fonctionner le stomacher durant 1 à 2 min, suivant la nature du produit (voir note 2).

Laisser les grosses particules se déposer si nécessaire durant 15 min au maximum, puis transvaser une certaine quantité de la couche supérieure de la suspension dans un tube ou une fiole (6.5) en utilisant une grande pipette (6.7) (s'il existe une couche huileuse, effectuer le prélèvement dans la partie aqueuse).

Cette quantité doit être suffisante pour que tous les examens et toutes les dilutions successives puissent être exécutés. Si l'on ne doit prélever qu'une seule portion de la suspension mère pour l'ensemencement ou la dilution suivante, ce transvasement peut être supprimé.

NOTES

1 Pour certains produits (par exemple les produits renfermant des particules pointues, ou des composants qui ne peuvent être facilement divisés), le stomacher peut ne pas être convenable. Il ne doit être utilisé que s'il a été démontré (données publiées ou essais comparatifs) que les résultats obtenus ne présentent pas de différence significative avec ceux obtenus à l'aide d'un homogénéisateur rotatif.

2 L'attention est attirée sur le fait que, pour certains produits, en particulier dans le cas des céréales, les temps fixés ci-dessus ne sont pas appropriés pour des micro-organismes tels que les levures et les moisissures.

Dans ce cas, le stomacher permet d'avoir des taux de récupération plus importants qu'avec l'homogénéisateur rotatif. Faire fonctionner le stomacher durant 10 min et ne pas laisser décanter, car des levures et moisissures provenant du liquide surnageant risqueraient d'être perdues.

9.2 Dilutions décimales suivantes

NOTE — Dans le cas de la recherche de la présence ou de l'absence d'un micro-organisme dans 0,1 ml ou 0,1 g de produit, il n'est pas nécessaire de préparer les dilutions suivantes.

Transvaser, à l'aide d'une nouvelle pipette (ou, si le mélange de la suspension mère a été obtenu avec une pipette, utiliser la même pipette), 1 ml de la suspension mère [première dilution $1 + 9 (10^{-1})$] (9.1.1 ou 9.1.2) dans un nouveau tube contenant 9 ml de diluant stérile à la température appropriée, en évitant tout contact entre la pipette et le diluant (voir les notes de 3.1 et 5.4).

Mélanger soigneusement la prise d'essai et le diluant, soit par aspiration-refoulement, dix fois, avec une nouvelle pipette ou en utilisant un agitateur mécanique (6.3) durant 5 à 10 s pour obtenir la dilution 10^{-2} . La fréquence de rotation de ce dernier doit être choisie de sorte que le liquide en tournoyant affleure à 2 ou 3 cm du bord du récipient.

Si nécessaire, répéter ces opérations sur la dilution 10^{-2} et les dilutions décimales suivantes afin d'obtenir les dilutions 10^{-3} , 10^{-4} , etc., jusqu'à obtention du nombre approprié de micro-organismes (voir chapitre 4).

9.3 Répétition des différentes opérations

Effectuer la suite complète des opérations décrites en 9.1 et 9.2 autant de fois qu'il est demandé (une seule fois, en double, etc.), suivant la norme spécifique du produit concerné.

NOTE — Il a été statistiquement établi que, pour réduire la variabilité des résultats de la technique par comptage des colonies, il était préférable de répéter les différentes opérations avec des quantités distinctes d'échantillons pour essai plutôt que de doubler le nombre de boîtes inoculées à partir de chaque tube d'une seule série de dilutions.

9.4 Durée des opérations

En général, les dilutions doivent être préparées à partir de l'échantillon pour essai immédiatement avant l'analyse; elles doivent être utilisées pour l'inoculation des milieux de culture dans les 30 min qui suivent leur préparation.

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.tetn.fr)
ISO 6887-1983
https://standards.tetn.fr/standards/iso/6887-1983
26e7b3e72442/iso-6887-1983