

NORME
INTERNATIONALE

ISO
7698

Première édition
1990-05-01

**Céréales, légumineuses et produits dérivés —
Dénombrement des bactéries, levures et
moisissures**

iTeh STANDARD PREVIEW

*Cereals, pulses and derived products — Enumeration of bacteria, yeasts
and moulds*

ISO 7698:1990

<https://standards.itih.ai/catalog/standards/sist/e5ea7b8f-dcd9-4bb4-b3ee-a312b0539d07/iso-7698-1990>



Numéro de référence
ISO 7698:1990(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 7698 a été élaborée par le comité technique ISO/TC 34, *Produits agricoles alimentaires*.

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

IT&S STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

[ISO 7698:1990](#)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/78f-dcd9-4bb4-b3ee-a312b0539d07/iso-7698-1990>

Introduction

Le dénombrement des bactéries, levures et moisissures des céréales, légumineuses et produits dérivés, permet d'évaluer leur richesse en micro-organismes et/ou suivant l'objectif poursuivi, de déterminer la nature de cette microflore dans le but: soit de juger de la qualité hygiénique d'un lot, soit de suivre l'évolution dynamique d'une flore pour apprécier l'efficacité de tel ou tel type de stockage ou pour évaluer l'impact d'un traitement physique ou chimique sur la microflore.

Avec ce type d'analyse, souvent effectuée après broyage, on prend en compte des fragments de thalle, mais ce sont surtout les spores fongiques qui sont dénombrées et ce d'autant plus que les espèces présentes sont particulièrement sporulantes. Cette méthode rend bien compte de la progression des micro-organismes (dans les céréales, légumineuses et dérivés) dans des séries évolutives déterminées, à la condition que soient effectuées les identifications d'espèces qui seules permettent de suivre l'évolution des populations en présence. Dans de telles conditions, qui relèvent plus de l'expérimentation que du contrôle de lots inconnus, les valeurs données par les dénombrements sont assez bien corrélées avec celles d'autres critères plus technologiques (acidité grasse, faculté germinative).

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/35a7b8c-d7d9-4d94-b3ee-a312b0539d07/iso-7698-1990>

Page blanche

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO 7698:1990

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/e5ea7b8f-dcd9-4bb4-b3ee-a312b0539d07/iso-7698-1990>

Céréales, légumineuses et produits dérivés — Dénombrement des bactéries, levures et moisissures

1 Domaine d'application

La présente Norme internationale prescrit une méthode de dénombrement des bactéries, levures et moisissures dans les céréales et légumineuses, ainsi que dans leurs produits dérivés immédiats (farines, semoules, sons etc.).

Elle prend en compte les normes de directives générales, notamment l'ISO 7954[1], élaborées par le sous-comité 9, *Microbiologie*, de l'ISO /TC 34, *Produits agricoles alimentaires*.

Il convient de se référer à l'ISO 7218[2] pour les bonnes pratiques de laboratoire lors des examens microbiologiques.

NOTE 1 Du fait de la nature même des levures et des moisissures, le dénombrement sera sujet à certaines imprecisions.

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 950:1979, *Céréales — Échantillonnage (des grains)*.

ISO 2170:1980, *Céréales et légumineuses — Échantillonnage des produits de mouture*.

ISO 6887:1983, *Microbiologie — Directives générales pour la préparation des dilutions en vue de l'examen microbiologique*.

3 Définitions

Pour les besoins de la présente Norme internationale, les définitions suivantes s'appliquent.

3.1 bactéries: Micro-organismes mésophiles, aérobies ou anaérobies facultatifs qui, à 30 °C, se développent à l'intérieur et à la surface d'un milieu gélosé, dans les conditions décrites dans la présente Norme internationale.

3.2 levures: Micro-organismes aérobies, mésophiles qui, à 25 °C et, en utilisant un milieu gélosé, dans les conditions décrites dans la présente Norme internationale,

- ou bien, se développent à la surface du milieu, en formant des colonies mates ou brillantes, présentant le plus souvent un contour régulier et une surface plus au moins convexe,
- ou bien, se développent en profondeur en formant des colonies rondes et lenticulaires.

3.3 moisissures: Micro-organismes mésophiles, aérobioses filamenteux qui, à la surface d'un milieu gélosé et dans les conditions décrites dans la présente Norme internationale, développent habituellement des colonies étendues, plates ou duveteuses, présentant souvent des fructifications colorées et des formes de sporulation.

4 Principe

4.1 Ensemencement en profondeur des deux milieux de culture (5.3.1 et 5.3.2) coulés dans deux boîtes de Petri, avec une quantité déterminée de la suspension mère.

Dans les mêmes conditions, ensemencement des dilutions décimales des autres boîtes, obtenues à partir de la suspension mère.

4.2 Incubation en aérobiose des boîtes contenant le milieu gélosé (5.3.1), pour le dénombrement des bactéries à 30 °C, pendant 3 jours.

Incubation en aérobiose des boîtes contenant le milieu gélosé (5.3.2), pour le dénombrement des levures et des moisissures à 25 °C, pendant 3 jours 4 jours ou 5 jours.

4.3 Calcul du nombre de bactéries, à partir du nombre de colonies obtenues dans les boîtes retenues de milieu gélosé (5.3.1).

Calcul du nombre de levures et/ou de moisissures, à partir du nombre de colonies obtenues dans les boîtes retenues de milieu gélosé (5.3.2).

5 Diluant, milieux de culture et autres produits

5.1 Composants de base

Pour améliorer la reproductibilité des résultats, il est recommandé d'utiliser, pour la préparation du diluant et des milieux de culture, des composants de base déshydratés ou des milieux complets déshydratés. De la même façon, des préparations commerciales de réactifs peuvent être utilisées. Les instructions du fabricant doivent être suivies scrupuleusement.

Les produits chimiques utilisés doivent être de qualité analytique reconnue.

L'eau utilisée doit être de l'eau distillée ou déionisée, exempte de substances susceptibles d'inhiber la croissance des micro-organismes (bactéries, levures et moisissures) dans les conditions de l'essai.

Si le diluant et les milieux ne sont pas utilisés extemporanément, ils doivent, sauf spécifications contraires, être conservés à l'obscurité entre 0 °C et + 5 °C pendant un mois maximum, dans les conditions évitant toute modification de leur composition.

5.2 Diluant

Solution de peptone-chlorure de sodium, voir ISO 6887.

NOTE 2 Afin d'améliorer l'homogénéisation des suspensions de spores, il est possible d'ajouter un agent de surface tel que l'ester oléique de sorbitol (Tween 80) à raison de 0,033 g par litre de diluant.

1) Ce terme n'est actuellement utilisé que par certains producteurs de milieu. Toute autre disgestat de caséine donnant des résultats comparables peut être utilisé.

2) Selon les prescriptions du fabricant.

5.3 Milieux de culture

5.3.1 Gélose pour dénombrer les bactéries

Composition

Tryptone ¹⁾	5,0 g
Extrait de levure déshydraté	2,5 g
Dextrose anhydre	1,0 g
Agar-agar	9 g à 18 g ²⁾
Eau	1 000 ml

NOTE 3 Pour éviter le développement de levures, ajouter éventuellement un produit inhibiteur tel que l'actidione (cycloheximide) ou la natamycine (pimaricine) au milieu de culture, à raison de 0,1 g/l.

Préparation

Dissoudre dans l'eau en portant à ébullition, les composants ou le milieu complet déshydraté. Si nécessaire, ajuster le pH de sorte qu'après stérilisation, il soit de 7,0 à 25 °C.

Répartir le milieu dans des tubes à essais (6.9) à raison de 15 ml par tube ou dans des ballons (6.9) de capacité appropriée, à raison d'environ la moitié du volume du ballon.

Stériliser le milieu dans l'autoclave (6.1), à 121 °C ± 1 °C pendant 20 min.

Si le milieu est utilisé extemporanément, le refroidir avant emploi au bain d'eau (6.7) réglé à 45 °C ± 0,5 °C.

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, puis le refroidir avant emploi au bain d'eau (6.7) réglé à 45 °C ± 0,5 °C.

5.3.2 Gélose pour dénombrer les levures et moisissures (Gélose à l'extrait de levure au dextrose et au chloramphénicol)

Composition

Extrait de levure	5 g
Dextrose (C ₆ H ₁₂ O ₆)	20 g
Chloramphénicol (C ₁₁ H ₁₂ Cl ₂ N ₂ O ₅)	0,1 g
Agar-agar	9 g à 18 g ²⁾

Eau 1 000 ml

Préparation

Dissoudre les composants dans l'eau, en portant à ébullition. Si nécessaire, ajuster le pH de sorte qu'après stérilisation, il soit de 6,6 à 25 °C.

Répartir le milieu dans des récipients (6.9) de capacité appropriée.

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

Si le milieu est utilisé extemporanément, le refroidir avant emploi au bain d'eau (6.7) réglé à $45\text{ °C} \pm 0,5\text{ °C}$.

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, puis le refroidir avant emploi au bain d'eau (6.7) réglé à $45\text{ °C} \pm 0,5\text{ °C}$.

NOTE 4 Le chloramphénicol peut être remplacé par de l'oxytétracycline ($\text{C}_{22}\text{H}_{30}\text{N}_2\text{O}_{11}$). Dans ce cas, préparer le milieu de base comme décrit ci-dessus, en omettant le chloramphénicol. Le répartir à raison de 100 ml et stériliser. Préparer également une solution à 0,1 % (m/m) de chlorhydrate d'oxytétracycline dans de l'eau et stériliser par filtration. Juste avant l'emploi, ajouter aseptiquement 10 ml de cette solution à 100 ml de milieu de base fondu et maintenu à $45\text{ °C} \pm 0,5\text{ °C}$.

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/e5ea7b8f-dcd9-4bb4-b3ee-a312b0539d07/iso-7698-1990>

6 Appareillage et verrerie

NOTE 5 Le matériel à usage unique est acceptable au même titre que la verrerie réutilisable, si ses spécifications sont convenables.

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, les milieux de culture et l'échantillon, sauf s'il est livré stérile (particulièrement le matériel en plastique), doit être stérilisé par l'une des méthodes suivantes:

- soit au four (6.1), en le maintenant à une température de 170 °C à 175 °C pendant au moins 1 h;
- soit à l'autoclave (6.1), en le maintenant à une température de $121\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ pendant au moins 20 min.

6.2 Appareillage pour l'homogénéisation.

Conformément à l'ISO 6887, l'un des appareils suivants doit être utilisé:

- un **homogénéisateur rotatif**, de préférence à entraînement par le haut, dont la fréquence de rotation est comprise entre $8\ 000\text{ min}^{-1}$ et $45\ 000\text{ min}^{-1}$, avec des bols en verre ou en métal, munis de préférence de couvercles, et résistant aux conditions de stérilisation;
- un **homogénéisateur, de type péristaltique** (Stomacher), avec des sacs stériles en plastique.

NOTE 6 Les bols et les sacs en plastique devraient avoir une capacité suffisante pour permettre de mélanger correctement l'échantillon avec la quantité appropriée de diluant. En général, le volume du récipient devrait être égal à environ deux fois le volume de l'échantillon plus le diluant.

6.3 Agitateur, produisant une agitation de type vortex, pour homogénéiser le contenu des tubes (dilutions de la suspension mère).

6.4 Étuves, réglables à $30\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ et à $25\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$.

6.5 Boîtes de Petri, d'un diamètre de 90 mm à 100 mm.

6.6 Pipettes graduées, étalonnées spécialement pour l'usage bactériologique, de capacités nominales de 10 ml et 1 ml, graduées en divisions de 0,5 ml et 0,1 ml, respectivement, et avec une ouverture nominale de 2 mm à 3 mm.

6.7 Bain d'eau, ou équipement similaire, réglable à $45\text{ °C} \pm 0,5\text{ °C}$.

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

6.9 Tubes à essais, notamment de 20 mm \times 200 mm, ou **foles**, ou **flacons** de 0,5 l ou de 1 l de capacité.

7 Échantillonnage

L'échantillonnage doit avoir été effectué conformément à l'ISO 950 ou à l'ISO 2170, selon le cas.

La quantité d'échantillon pour laboratoire doit être supérieure à la masse de la prise d'essai requise pour l'analyse comme indiqué au tableau 1 (9.1), afin de pouvoir répéter l'analyse le cas échéant.

Si l'analyse ne peut être réalisée dès réception des échantillons au laboratoire, une conservation à environ 10 °C pendant 48 h au maximum pourra être admise. Il en sera alors fait mention au rapport

d'essai. En aucun cas les échantillons ne seront placés au congélateur.

8 Préparation de l'échantillon pour essai

Mélanger soigneusement l'échantillon pour laboratoire avant de prélever des échantillons pour essai représentatifs.

NOTE 7 Compte tenu des produits couverts par la présente Norme internationale, on obtient souvent une distribution irrégulière des micro-organismes à partir de l'échantillon pour essai. Aussi est-il souhaitable de réaliser des déterminations distinctes sur au moins trois et de préférence cinq prises d'essai à partir de l'échantillon pour essai quand une évaluation précise de la population microbienne est demandée.

9 Mode opératoire

9.1 Prise d'essai

Peser, à 0,1 g près, la masse de la prise d'essai spécifiée au tableau 1, dans

- le bol d'un homogénéisateur rotatif [6.2 a)], pour les produits de la catégorie 1, ou
- un sac en plastique d'un Stomacher [6.2 b)] pour les produits de la catégorie 2.

Tableau 1

Catégorie	Produit	Masse de la prise d'essai g	Volume de diluant ml
1	Grains ou graines	40	360
2	Produits de mouture (farines, semoules, sons, ...)	20	180

9.2 Préparation de la suspension mère

Ajouter à la prise d'essai (9.1) le volume correspondant de diluant indiqué au tableau 1.

Laisser en contact la prise d'essai et le diluant pendant 30 min, puis

- ou bien faire fonctionner l'homogénéisateur rotatif [6.2 a)] pendant un temps suffisant pour avoir un nombre total de tours compris entre 15 000 et 20 000 (même avec l'homogénéisateur le plus lent, ce temps ne doit pas excéder 2,5 min),
- ou bien faire fonctionner le Stomacher [6.2 b)] pendant 2 min.

9.3 Préparation des dilutions

Préparer les dilutions conformément à l'ISO 6887.

Avant de prélever chaque partie aliquote pour effectuer l'ensemencement, homogénéiser le contenu du tube à l'aide de l'agitateur de type vortex (6.3).

9.4 Ensemencement

9.4.1 Prendre quatre boîtes de Petri stériles (6.5). Transférer dans chacune de ces boîtes, à l'aide d'une pipette stérile, 1 ml de la suspension mère (dilution 10^{-1}) (9.2).

9.4.2 Prendre quatre autres boîtes de Petri stériles. Transférer dans chacune de ces boîtes, à l'aide d'une nouvelle pipette stérile, 1 ml de la dilution 10^{-2} (9.3).

Recommencer les opérations décrites à l'alinéa précédent avec les dilutions suivantes, comme exigé (voir 9.6.1 et 9.6.2).

9.4.3 Pour chaque groupe de quatre boîtes, couler dans deux boîtes, environ 15 ml du milieu 5.3.1 et dans deux autres boîtes, environ 15 ml du milieu 5.3.2.

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

Préparer également deux boîtes témoins, l'une contenant environ 15 ml du milieu gélosé 5.3.1, et l'autre contenant environ 15 ml du milieu gélosé 5.3.2, en vue de contrôler leur stérilité.

9.5 Incubation

9.5.1 Bactéries

Retourner les boîtes de milieu 5.3.1 et les placer à l'étuve (6.4) réglée à $30\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ pendant 3 jours.

9.5.2 Levures et moisissures

Placer les boîtes de milieu 5.3.2 retournées ou non, dans l'autre étuve (6.4) réglée à $25\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ pendant 5 jours.

9.6 Interprétation

9.6.1 Comptage des colonies de bactéries

Examiner les boîtes après la période d'incubation prescrite (9.5.1).

Procéder au comptage des colonies pour chaque boîte de milieu 5.3.1 contenant moins de 300 colo-

nies. Il faut qu'une boîte renferme au moins 15 colonies.

9.6.2 Comptage des colonies de levures et/ou de moisissures

Compter les colonies sur chaque boîte après 3 jours, 4 jours et 5 jours d'incubation. Après 5 jours, retenir les boîtes contenant moins de 150 colonies. Si des parties de boîtes sont envahies par des moisissures ou s'il est difficile de compter des colonies bien isolées, retenir les comptages obtenus après 4 jours ou même 3 jours d'incubation. Dans ce cas, la durée d'incubation de 3 ou 4 jours doit être indiquée au rapport d'essai.

La distinction entre les colonies de levures et les thalles de moisissures est faite par examen macroscopique. Cependant, dans les cas douteux, procéder à un examen microscopique des «colonies»: les colonies de levures sont en général constituées de cellules ovoïdes ou rondes, tandis que les thalles présentent des filaments mycéliens.

Si cela est nécessaire, procéder à un examen microscopique pour distinguer, selon l'aspect morphologique, les colonies de levures et moisissures des colonies de bactéries.

10 Expression des résultats

10.1 Calcul

10.1.1 Calculer le nombre de micro-organismes, à savoir de bactéries, de levures et/ou de moisissures par gramme de produit, à l'aide de la formule

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

où

$\sum C$ est la somme des colonies sur toutes les boîtes comptées et retenues au niveau de deux dilutions successives;

d est la dilution à partir de laquelle les premiers dénombrements sont obtenus (par exemple, 10^{-2});

n_1 est le nombre de boîtes comptées et retenues à la première dilution;

n_2 est le nombre de boîtes comptées et retenues à la seconde dilution.

10.1.2 Arrondir le résultat obtenu en 10.1.1 à deux chiffres significatifs. Lorsque le nombre à arrondir est de 5, sans autres chiffres significatifs, l'arrondir de manière que le chiffre immédiatement à gauche soit pair, par exemple, 28 500 est arrondi à 28 000; 11 500 est arrondi à 12 000.

10.1.3 Exprimer le résultat par un nombre compris entre 1,0 et 9,9 multiplié par 10^x , x étant la puissance appropriée de 10.

S'il n'y a aucune colonie sur les boîtes au niveau de la suspension mère (9.4.1), le nombre de micro-organismes, à savoir de bactéries, de levures, et/ou de moisissures par gramme de produit doit être rapporté comme étant inférieur à 10.

10.2 Exemple de calcul

Un dénombrement de levures et de moisissures a donné les résultats suivants (deux boîtes de Petri par dilution furent incubées):

dilution 10^{-2} : 105 et 97 colonies

dilution 10^{-3} : 18 et 23 colonies

$$\frac{\sum C}{(n_1 + 0,1n_2)d} = \frac{105 + 97 + 18 + 23}{[2 + (0,1 \times 2)]10^{-2}} = \frac{243}{0,022}$$

ISO 7698:1990

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/e5ea7b8f-dcd9-4bb4-b3ee-a312b0539d07/iso-7698-1990>

= 11 045

En arrondissant le résultat comme spécifié en 10.1.2, on obtient 11 000.

Le nombre estimé de levures et de moisissures, par gramme, est donc de $1,1 \times 10^4$.

10.3 Fidélité

Pour des raisons d'ordre statistique, dans 95 % des cas, les limites de confiance de cette méthode varient de ± 16 % à ± 52 % [3]. En pratique, des variations plus importantes encore peuvent être observées et, en particulier, entre les résultats obtenus par différents microbiologistes.

11 Rapport d'essai

Le rapport d'essai doit indiquer la méthode utilisée, la durée d'incubation et les résultats obtenus. Il doit, en outre, mentionner tous les détails opératoires non spécifiés 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.